

NA DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO. IBA NA EXPORT.

Zamýšľané použitie

Súprava Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit je súpravou činidiel a spotrebného materiálu, ktorá sa používa na prípravu knižníc vzoriek z genomickú DNA odvodenej z ľudských buniek a tkanív na vývoj diagnostických analýz *in vitro*. Na prípravu knižníc so zameraním sa na špecifické genomické oblasti záujmu sa vyžadujú používateľom dodávané panely sond. Generované knižnice vzoriek sú určené na používanie v sekvenčných systémoch od spoločnosti Illumina. Súčasťou systému Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx je softvér na sekvenovanie nastavenia cyklu, monitorovanie a analýzu.

Zásady postupu

Súprava Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je určená na manuálnu prípravu knižníc sekvenovania DNA obohatených o cieľové oblasti z genomickú DNA získanej z ľudských buniek a tkaniva.

Na obohatenie cieľov sú potrebné používateľom dodávané biotinylované oligonukleotidové panely. Súprava Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilný s radom veľkostí panelov vrátane malých panelov (< 20 000 sond) až po veľké panely (> 200 000 sond). Vytvorené obohatené knižnice sú určené na sekvenovanie na sekvenovacích systémoch Illumina.

Postup práce so súpravou Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit pozostáva z nasledujúcich krokov:

- **Tagmentácia genómovej DNA** – používa Enrichment BLT Small sa (eBLTS) natagmentáciu vstupnej DNA. Počas tagmentácie sa gDNA v jednom kroku fragmentuje a označí adaptérmi. Vyžaduje sa minimálne vstupné množstvo DNA 50 ng na saturáciu eBLTS v tagmentačnej reakcii. Po saturácii eBLTS fragmentuje stanovený počet molekúl DNA a vytvára normalizované knižnice s konzistentnou distribúciou veľkosti fragmentov.
- **Prečistenie po tagmentácii** – prečistí adaptérmi označenú DNA na eBLTS, aby sa mohla použiť pri amplifikácii.
- **Amplifikácia tagmentovanej DNA** – amplifikuje tagmentovanú DNA použitím PCR programu s limitovanými cyklami. Jedinečné duálne (UD) indexy sa pripoja na konce fragmentov DNA, čo umožní jedinečné duálne označenie vytvorenia knižníc DNA a klastrov počas sekvenovania.
- **Prečistenie knižnice** – používa postup purifikácie na guľôčkach na purifikáciu a výber veľkosti amplifikovaných knižníc DNA.
- **Združovanie knižníc** – spája knižnice DNA s jedinečnými indexmi do jedného súboru, ktorý obsahuje do 12 knižníc. Združovať knižnice môžete na základe objemu alebo podľa hmotnosti.
- **Hybridizácia sond** – skladá sa z hybridizačnej reakcie, počas ktorej sa knižnice dvojvláknovej DNA denaturujú a panel biotinylovaných sond DNA sa hybridizuje na cieľové genómové oblasti.

- Súprava Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilná s viacerými panelmi. Súprava Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit neobsahuje panel na obohatenie. Panely sond si musí zabezpečiť používateľ a musia spĺňať požadované parametre. Reagencie súpravy Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sú kompatibilné s oligonukleotidovými panelmi na obohatenie DNA vyrobenými spoločnosťou Illumina alebo tretími stranami, pokiaľ spĺňajú požadované parametre. Informácie o požadovaných parametroch panelov tretích strán nájdete v časti [Požiadavky na panel obohacovacej sondy na strane 10](#).
- **Zachytenie hybridizovaných sond** – používa Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) na zachytenie biotinylovaných sond hybridizovaných na požadované cieľové oblasti.
- **Amplifikácia obohatených knižníc** – používa PCR na amplifikáciu obohatených knižníc.
- **Prečistenie amplifikovaných obohatených knižníc** – používa postup purifikácie na guľôčkach na purifikáciu obohatených knižníc pripravených na sekvenovanie.
- **Sekvenovanie** – sekvenovanie obohatených knižníc sa vykonáva v sekvenovacích systémoch MiSeqDx, NextSeq 550Dx alebo NovaSeq 6000Dx. Na nastavenie sekvenovacieho chodu, monitorovanie chodu a vytvorenie FASTQ z volaní bázy v systémoch MiSeqDx a NextSeq 550Dx sa používa integrovaný modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager (Správca lokálnych chodov). V systéme NextSeq 550Dx so serverom DRAGEN a NovaSeq 6000Dx sa na nastavenie chodu a sekundárnu analýzu s viacerými dostupnými pracovnými postupmi používa aplikácia DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Obmedzenia postupu

- Na diagnostické použitie *in vitro*.
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilná s genomickou DNA získanou z ľudských buniek a tkaniva.
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilná so vstupmi gDNA s dvomi vláknami s veľkosťou 50 – 1 000 ng. Výkon nie je zaručený pri vstupoch mimo týchto prahových hodnôt.
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit neobsahuje reagencie na extrakciu DNA. Výsledky analytického testovania vrátane testovania interferencie uvedené v časti [Výkonnostné charakteristiky na strane 58](#) boli získané s plnou krvou a FFPE ako reprezentatívnymi typmi vzoriek s reprezentatívnymi súpravami na extrakciu DNA. Všetky diagnostické testy vyvinuté na použitie s reagentami Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit si vyžadujú úplné overenie všetkých hľadísk výkonu s vybratou súpravou na extrakciu DNA.
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Neodporúča sa pre vzorky FFPE nízkej kvality s $\Delta Cq > 5$. Použitie vzoriek s $\Delta Cq > 5$ môže zvýšiť pravdepodobnosť zlyhania prípravy knižnice a znížiť výkon analýzy.
- Reagencie Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit boli nakonfigurované a testované na vstup vzorky, obohacujúce reakcie a plexitu uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Vstup vzorky	Obohacujúce reakcie	Obohacujúca plexita
Súprava so 16 vzorkami	Nízka kvalita (FFPE)	16 reakcií	1 plex
Súprava s 96 vzorkami	Vysoká kvalita (napr. plná krv)	8 reakcií	12 plexov

- Spracovanie vstupu FFPE bolo testované a odporúča sa výlučne pre 1-plexové obohacovacie reakcie s použitím súpravy so 16 vzorkami.
- V prípade súpravy s 96 vzorkami sú možné neštandardné plexity (2 až 11 plexov), ale majú nasledujúce obmedzenia:
 - Spracovanie vzoriek v 2-plexových až 11-plexových obohacovacích reakciách znižuje priepustnosť súpravy.
 - Optimálne výsledky nie sú zaručené. Získanie vhodnej obohacujúcej výťažnosti pre neštandardné plexity si môže vyžadovať dodatočnú optimalizáciu.
 - V prípade stratégií združovania s nízkou plexitou (2- až 8-plexové) sa na optimalizáciu vyváženého farebného usporiadania na úspešné sekvenovanie a analýzu údajov vyžaduje výber indexových adaptérov s rôznymi sekvenciami. DNA GenerateFASTQ Dx Modul MiSeqDx a NextSeq 550Dx poskytuje možnosti pre kombinácie farebne vyvážených indexov počas nastavenia cyklu. Ďalšie informácie o stratégiách zoskupovania nájdete v časti [Metódy združovania na strane 34](#).
- Súprava Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je obmedzená na dodávanie obohatených knižníc, ktoré sú sekvenované iba moduloch na MiSeqDx, NextSeq 550Dx a NovaSeq 6000Dx. Použitie iných sekvenčných systémov si vyžaduje úplné overenie všetkých hľadísk výkonu.
- Obohacujúce panely nie sú súčasťou tohto produktu. Výsledky analytických testov uvedené v časti [Výkonnostné charakteristiky na strane 58](#) boli získané s reprezentatívnymi obohacujúcimi panelmi a slúžia len na informačné účely. Charakteristiky analytického výkonu slúžia na ilustráciu všeobecných schopností analýzy a nestanovujú schopnosti ani vhodnosť týkajúce sa akýchkoľvek špecifických nárokov na analýzu. Všetky diagnostické testy vyvinuté na použitie s týmito reagensiami si vyžadujú úplné overenie všetkých aspektov výkonu.
- Súprava Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilná s obohacovacími panelmi Illumina aj panelmi tretích strán. Výkon s obohacujúcimi panelmi tretích strán, ktoré nespĺňajú požiadavky panela, však nie je zaručený. Informácie o požiadavkách na panel nájdete v časti [Požiadavky na panel obohacovacej sondy na strane 10](#).
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit používa 2-hodinový čas hybridizácie. Využitie dlhšieho času hybridizácie môže ovplyvniť metriky výkonnosti.
- Moduly DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) pre MiSeqDx a NextSeq 550Dx poskytujú iba súbory FASTQ. Ak používate tieto moduly, musíte vykonať overenie sekundárnej analýzy.

- Aplikácia DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je k dispozícii na NextSeq 550Dx so serverom DRAGEN a NovaSeq 6000Dx. Aplikácia podporuje viaceré pracovné postupy sekundárnej analýzy vrátane generovania FASTQ, generovania FASTQ a VCF na detekciu zárodočných variantov a generovania FASTQ a VCF na somatickú detekciu variantov. Ak používate aplikáciu na generovanie VCF, nemusíte vykonávať overenie sekundárnej analýzy. Medzi obmedzenia aplikácie patria:
 - dĺžka zavedení > 18 bp a dĺžka delécií > 21 bp neboli validované;
 - veľké varianty vrátane multikleotidových variantov (MNV) a veľkých indelov sa môžu vo výstupnom súbore VCF vykazovať ako samostatné menšie varianty;
 - malé MNV sa vo výstupnom súbore VCF uvádzajú ako samostatné varianty;
 - delécie sa v súbore VCF vykážu na súradnici predchádzajúcej bázy podľa formátu VCF. Preto v prípade susediacich variantov treba pred vykazovaním zvážiť, či je každá primárna analýza báz homozygotnou referenciou;
 - obmedzenia špecifické pre modul Germline:
 - prístroj používajúci postupy analýzy generovania súborov Germline FASTQ a VCF aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je navrhnutý tak, aby poskytoval kvalitatívne výsledky analýz variantov Germline (t. j. homozygotné, heterozygotné, štandardné);
 - variácia v počte kópií môže ovplyvniť to, či sa variant identifikuje ako homozygotný alebo heterozygotný;
 - systém nebude hlásiť viac ako dva varianty na jednom mieste, a to ani v prítomnosti variácie počtu kópií;
 - obmedzenia špecifické pre modul Somatic:
 - prístroj používajúci postupy analýzy generovania súborov Somatic FASTQ a VCF aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je navrhnutý tak, aby poskytoval kvalitatívne výsledky analýz variantov Somatic (t. j. prítomnosť variantov Somatic);
 - pracovný postup analýzy generovania súborov Somatic FASTQ a VCF nedokáže rozlišovať medzi Germline a Somatic variantmi. Pracovný postup je určený na detekciu variantov v celom rozsahu frekvencií variantov, frekvenciu variantov však nie je možné použiť na odlíšenie Somatic variantov od Germline variantov;
 - normálne tkanivo vo vzorke ovplyvňuje detekciu variantov. Vykazovaný limit detekcie je založený na frekvencii variantov vzhľadom na celkovú DNA extrahovanú z nádorového aj normálneho tkaniva;
 - ak sa na rovnakom mieste analyzuje viac ako jedna variantná alela, žiadna z alel nebude hlásená ako prechádzajúci variant. Namiesto toho bude hlásená celá množina alel, ale filtrovaná cez multialelický tag.

Komponenty produktu

Súprava Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sa skladá z nasledujúcich súčastí.

- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, katalógové č. 20051354 (16 vzoriek) alebo č. 20051352 (96 vzoriek)
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, katalógové č. 20051355 (16 vzoriek) alebo č. 20051353 (96 vzoriek)
- Modul Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) DNA GenerateFASTQ Dx pre NextSeq 550Dx, katalógové č. 20063024
- Modul Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) DNA GenerateFASTQ Dx pre MiSeqDx, katalógové č. 20063022
- Aplikácia DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pre NovaSeq 6000Dx, katalógové č. 20074609
- Aplikácia DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pre NextSeq 550Dx, katalógové č. 20074730

Dodávané reagensie

Na dokončenie testu sa Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vyžaduje príprava súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A a alebo súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Pomocou 16 vzoriek alebo 96 súprav vzoriek môžete vykonať nasledujúci počet knižničných prípravných a obohatených reakcií.

Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Vstup vzorky	Obohacujúce reakcie	Obohacujúca plexita
Súprava so 16 vzorkami	Nízka kvalita (FFPE)	16 reakcií	1 plex
Súprava s 96 vzorkami	Vysoká kvalita (napr. plná krv)	8 reakcií	12 plexov

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

Tagmentačné reagenty Illumina Prep Dx 1, skladujte pri teplote 15 °C až 30 °C

Nasledujúce reagenty sa dodávajú pri izbovej teplote. Reagenty okamžite uskladnite pri uvedenej teplote skladovania, aby sa zabezpečil ich riadny výkon.

Názov reagentu	Množstvo skúmaviek		Farba uzáveru	Objem plnenia	Aktívne látky
	16 vzoriek (č. 20050020)	96 vzoriek (č. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Červená	350 µl	Roztok čistiaceho prostriedku vo vode.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Zelená	41 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci detergent a soľ.
Cleanup Beads (CB)	1	Nevzťahuje sa*	Červená	10 ml	Paramagnetické guľôčky v pevnej fáze v pufrovanom vodnom roztoku.

* Cleanup Beads pre 96 vzoriek je súčasťou Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (č. 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 vzoriek), skladujte pri teplote 15 °C až 30 °C

Pri súpravách na 96 vzoriek sú Cleanup Beads zahrnuté vo výrobku Illumina Prep Dx Cleanup Beads (katalógové č. 20050030). Nasledujúce reagenty sa dodávajú pri izbovej teplote. Reagenty okamžite uskladnite pri uvedenej teplote skladovania, aby sa zabezpečil ich riadny výkon. Pri súpravách na 16 vzoriek sú Cleanup Beads zahrnuté vo výrobku Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (katalógové č. 20050020).

Názov reagentu	Množstvo	Farba uzáveru	Objem plnenia	Aktívne látky
Cleanup Beads (CB)	4	Červená	10 ml	Paramagnetické guľôčky v pevnej fáze v pufrovanom vodnom roztoku.

Reagenty Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, skladujte pri teplote 2 °C až 8 °C

Nasledujúce balenia reagentov sa dodávajú chladené. Reagenty okamžite uskladnite pri uvedenej teplote skladovania, aby sa zabezpečil ich riadny výkon. Zásobnú skúmavku eBLTS uchovávajte v zvislej polohe tak, aby boli guľôčky vždy ponorené do pufra.

Názov reagensie	Množstvo skúmaviek		Farba uzáveru	Objem plnenia		Aktívne látky
	16 vzoriek (č. 20050021)	96 vzoriek (č. 20050026)		16 vzoriek	96 vzoriek	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Žltá	200 µl	290 µl	Streptavidin Magnetic Beads spojené s transpozómami v pufovanom vodnom roztoku obsahujúcom glycerol, EDTA, ditiotriitol, soľ a detergent.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Číra	1,8 ml	1,8 ml	Pufovaný vodný roztok.

Reagencie Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C

Nasledujúce balenia reagensí sa dodávajú zmrazené. Reagencie okamžite uskladnite pri uvedenej teplote skladovania, aby sa zabezpečil ich riadny výkon.

Názov reagensie	Množstvo skúmaviek		Farba uzáveru	Objem plnenia		Aktívne látky
	16 vzoriek (č. 20050022)	96 vzoriek (č. 20050027)		16 vzoriek	96 vzoriek	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Číra	290 µl	290 µl	Pufovaný vodný roztok obsahujúci horčíkovú soľ a dimetylformamid.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Číra	200 µl	610 µl	DNA polymeráza a dNTP v pufovanom vodnom roztoku.

Reagencie Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 vzoriek), skladujte pri teplote od 2 °C do 8 °C

V prípade 16 súprav vzoriek sú nasledujúce reagencie zahrnuté v reagensiach Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalógové č. 20050023). V prípade 96 súprav vzoriek sú reagencie zahrnuté v reagensiach Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalógové č. 20050028).

Nasledujúce balenia reagensí sa dodávajú chladené. Reagencie okamžite uskladnite pri uvedenej teplote skladovania, aby sa zabezpečil ich riadny výkon.

Názov reagensie	Množstvo skúmaviek	Farba uzáveru	Objem plnenia	Aktívne látky
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Číra	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads v pufrovanom vodnom roztoku obsahujúcom formamid, detergent a soľ.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Číra	1,8 ml	Pufrovaný vodný roztok.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Číra	200 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci detergent a soľ.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Číra	200 µl	Pufrovaný vodný roztok.

Reagencie Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 vzoriek), skladujte pri teplote od 2 °C do 8 °C

V prípade 96 súprav vzoriek sú nasledujúce reagencie zahrnuté v reagensiach Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalógové č. 20050028). V prípade 16 súprav vzoriek sú reagencie zahrnuté v reagensiach Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalógové č. 20050023).

Nasledujúce balenia reagensí sa dodávajú chladené. Reagencie okamžite uskladnite pri uvedenej teplote skladovania, aby sa zabezpečil ich riadny výkon.

Názov reagensie	Množstvo skúmaviek	Farba uzáveru	Objem plnenia	Aktívne látky
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Číra	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads v pufrovanom vodnom roztoku obsahujúcom formamid, detergent a soľ.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Číra	1,8 ml	Pufrovaný vodný roztok.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Číra	200 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci detergent a soľ.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Číra	200 µl	Pufrovaný vodný roztok.

Reagencie Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, skladujte pri teplote od -25 °C do -15 °C

Nasledujúce balenia reagencií sa dodávajú zmrazené. Reagencie okamžite uskladnite pri uvedenej teplote skladovania, aby sa zabezpečil ich riadny výkon.

Názov reagentu	Množstvo skúmaviek		Farba uzáveru	Objem plnenia	Aktívne látky
	16 vzoriek (č. 20050024)	96 vzoriek (č. 20050029)			
Obohatený elučný pufer 1 (EE1)	1	1	Číra	580 µl	Roztok čistiaceho prostriedku vo vode.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Jantárová	4,1 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahujúci soľ a detergent.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Číra	320 µl	PCR primery (oligonukleotidy) zmiešané.
2N NaOH (HP3)	1	1	Číra	200 µl	2N roztok hydroxidu sodného (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Modrá	480 µl	Pufrovaný vodný roztok s DNA Cot-1, stláčacím činidlom a formamidom.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Číra	200 µl	DNA polymeráza a dNTP v pufrovanom vodnom roztoku.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, skladujte pri teplote od -25 °C do -15 °C

Nasledujúce balenia reagencií sa dodávajú zmrazené. Reagencie okamžite uskladnite pri uvedenej teplote skladovania, aby sa zabezpečil ich riadny výkon. Sekvencie indexových adaptérov nájdete v [Appendix: Sekvencie adaptérov indexov Illumina UD na strane 63](#).

Komponent	Množstvo
Illumina Unique Dual Index Dx Set (96 indexov), č. 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 indexov), č. 20050039	1

Nedodávané reagensie

Požadované reagensie, ktoré sa nedodávajú

- Reagensie na extrakciu a čistenie DNA
- Reagensie na kvantifikáciu DNA
- Etanol (kategória 200 vhodná na molekulárnu mikrobiológiu)
- Voda bez nukleáz
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 1N NaOH roztok, trieda vhodná na molekulárnu mikrobiológiu
- Ak používate sekvenovací systém NextSeq 550Dx:
 - 200 mM Tris, pH 7,0 (možno zriediť z 1 M Tris-HCl, pH 7,0)
 - Súprava reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) (katalógové číslo 20028871)
- Ak používate sekvenovací systém MiSeqDx:
 - súprava reagensí MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalógové č. 20037124)
- Ak používate sekvenovací systém NovaSeq 6000Dx:
 - 400 mM Tris, pH 8,0 (možno zriediť z 1 M Tris-HCl, pH 8,0)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cyklov) (katalógové číslo 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cyklov) (katalógové číslo 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalógové číslo 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalógové číslo 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalógové číslo 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (katalógové číslo 20062291)

Požiadavky na panel obohacovacej sondy

Reagensie Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sú kompatibilné s panelmi Illumina aj oligonukleotidovými panelmi obohacujúcimi DNA tretej strany. Ak používate biotinylované sondy DNA tretích strán (fixné alebo vlastné panely), uistite sa, že spĺňajú požadované špecifikácie.

Súprava Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit bola optimalizovaná a overená pomocou nasledujúcich špecifikácií panelu tretích strán. Porovnateľný výkon nie je zaručený pri používaní panelov tretích strán, ktoré nespĺňajú špecifikácie.

- Dĺžka sondy 80 bp alebo 120 bp
- Medzi 500 až 675 000 sondami
- Jednovláknová alebo dvojitá DNA
- Celkový vstup sondy ≥ 3 pmol pre obohatenie pri násobnostiach od 1-násobných po 12-násobné

Skladovanie a manipulácia

- Izbová teplota je stanovená na 15 °C až 30 °C.
- Reagencie sú stabilné až do dátumu expirácie uvedeného na označení súprav, ak sa skladujú podľa pokynov. Teploty skladovania nájdete v časti [Dodávané reagencie na strane 5](#).
- Zmrazené reagencie sú stabilné maximálne štyri cykly zmrazenia a rozmrazenia, ktoré sa uskutočňujú pred špecifikovaným dátumom expirácie.
- Postup Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit obsahuje nasledujúce bezpečné body zastavenia:
 - Po [Amplifikácia tagmentovanej DNA na strane 29](#) sú zosilnené knižnice stabilné až 30 dní, ak sa skladujú pri teplote -25 °C až -15 °C.
 - Po [Čistenie knižníc na strane 31](#) sú vyčistené amplifikované knižnice stabilné až 30 dní pri skladovaní pri teplote -25 °C až -15 °C.
 - Po [Združovanie knižníc pred obohatením na strane 33](#) sú združené knižnice stabilné až 30 dní, ak sa skladujú pri teplote -25 °C až -15 °C.
 - Po [Amplifikácia obohatenej knižnice na strane 44](#) môže obohatená platnička z amplifikovaných knižníc zostať na tepelnom cyklovači až 24 hodín. Prípadne možno platničku skladovať pri teplote 2 °C až 8 °C až 48 hodín.
 - Konečné očistené obohatené knižnice sú stabilné až 7 dní, ak sa skladujú pri teplote -25 °C až -15 °C.
- Ak je niektorý z obalov alebo obsahu Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit poškodený alebo narušený, obráťte sa na Illumina oddelenie zákazníckeho servisu.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) môžu tvoriť viditeľné zrazeniny alebo kryštály. Ak spozorujete zrazeniny, zohrievajte ich 10 minút pri teplote 37 °C, a potom miešajte, kým sa zrazeniny nerozpustia.
- Hybridizačné oligonukleotidy (HYB) a Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) sa musia predhriať na rovnakú teplotu ako teplota uchovania hybridizácie podľa typu vzorky a panela sondy. Ďalšie informácie o manipulácii s NHB2 a EEW nájdete v časti [Poznámky k procedúre na strane 16](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) a blokátory HYB Buffer+IDT NXT (NHB2) môžu vytvárať kryštály a zakalenie. Ak spozorujete kryštály a zakalenie, vírením premiešajte alebo pipetujte nahor a nadol, aby sa roztok premiešal, až kým nebude číry. Pred pipetovaním nezabudnite NHB2 predhriať.
- Pri manipulácii s Cleanup Beads (CB) dodržiavajte nasledujúce osvedčené postupy:
 - guľôčky nikdy nezmrazujte,
 - tesne pred použitím rozvrite guľôčky, kým sa neodstredia a farba nebude vyzeráť homogénne.

- Pri manipulácii s Enrichment BLT Small (eBLTS) dodržiavajte nasledujúce osvedčené postupy:
 - skúmavku eBLTS uchovávajte v zvislej polohe tak, aby boli guľôčky vždy ponorené do pufra,
 - eBLTS dôkladne rozvίrte, kým sa guľôčky úplne neresuspendujú. Aby sa zabránilo opätovnému usadeniu guľôčok, pred pipetovaním sa neodporúča odstredovanie,
 - Ak sa guľôčky prilepia na bočnú alebo vrchnú časť 96-jamkovej platničky, odstredujte ju rýchlosťou 280 × g počas 3 sekúnd, a potom pipetou resuspendujte.
- Pri manipulácii s platničkami adaptéra indexu dodržiavajte nasledujúce osvedčené postupy:
 - na platničku adaptéra indexu nepridávajte vzorky,
 - každá jamka indexovej platničky je určená len na jedno použitie.

Požadované, ale nedodávané vybavenie a materiály

Okrem Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sa pred začatím protokolu uistite, že máte požadované vybavenie a materiály.

Zariadenia

Pred spustením protokolu sa uistite, že máte požadované zariadenia.

Protokol bol optimalizovaný a overený pomocou položiek s uvedenými špecifikáciami. Porovnateľný výkon nie je zaručený pri používaní zariadenia mimo špecifikácií.

Niektoré položky sú potrebné iba pre konkrétne pracovné postupy. Tieto položky sú uvedené v samostatných tabuľkách.

- Tepelný cyklovač s nasledujúcimi špecifikáciami:
 - vyhrievané veko
 - minimálny rozsah regulácie teploty od 10 °C do 98 °C
 - minimálna presnosť teploty $\pm 0,25$ °C
 - maximálny reakčný objem 100 μ l
 - kompatibilný s 96-jamkovými platničkami PCR s plným okrajom
- Inkubátor s mikrovzorkou s nasledujúcimi špecifikáciami:
 - Teplotný rozsah okolia +5,0 °C až 99,0 °C
 - Kompatibilné s 96-jamkovými platničkami MIDI
- Inkubátor na mikrovzorky s vložkami kompatibilnými s platničkami MIDI s 96 jamkami,
- Vysokorýchlostný vytriasač mikroplatničiek s rozsahom rýchlosti miešania 200 – 3 000 ot./min.
- Magnetický stojan kompatibilný s 96-jamkovými platničkami PCR

- Magnetický stojan kompatibilný s 96-jamkovými platničkami MIDI
- Fluorometer je kompatibilný s vašou metódou kvantifikácie
- Analyzátor fragmentov DNA
- Presné pipety:
 - Jednokanálové alebo multikanálové pipety s objemom 10 µl
 - Jednokanálové alebo multikanálové pipety s objemom 20 µl
 - Jednokanálové alebo multikanálové pipety s objemom 200 µl
 - Jednokanálové pipety s objemom 1 000 µl
 - Presné pipety zabezpečujú presné podávanie reagentie a vzorky. Jednokanálové alebo viackanálové pipety sa môžu použiť, ak sú pravidelne kalibrované a presné v rámci 5 % uvedeného objemu.
- Centrifúga mikropatničky
- Mikroodstredivka
- Jeden z nasledujúcich sekvenovacích systémov Illumina:
 - Nástroj MiSeqDx, katalógové č. DX-410-1001
 - Zariadenie NextSeq 550Dx, katalógové č. 20005715 s voliteľným serverom Illumina DRAGEN pre NextSeq 550Dx, katalógové č. 20086130
 - Prístroj NovaSeq 6000Dx, katalógové č. 20068232
- **[Voliteľné]** Vákuový koncentrátor
- **[FFPE]** Detekčný systém PCR v reálnom čase

Materiály

Pred spustením protokolu sa uistite, že máte požadované materiály.

Niektoré položky sú potrebné iba pre konkrétne pracovné postupy. Tieto položky sú uvedené v samostatných tabuľkách.

Protokol bol optimalizovaný a overený pomocou uvedených položiek. Porovnateľný výkon nie je zaručený pri použití alternatívnych materiálov.

- Filtrované pipetové špičky
- Kónické centrifugačné skúmavky, 15 ml alebo 50 ml
- 1,5 ml mikrocentrifugačné skúmavky
- Multikanálové zásobníky na reagentie bez obsahu RNáz/DNáz, na jedno použitie
- Strip 8 skúmaviek s viečkami bez obsahu RNáz/DNáz
- Sérologické pipety
- 96-jamková polypropylénová skladovacia doštička s hlbokými jamkami (MIDI platnička), 0,8 ml
- 96-jamkové tvrdé PCR platničky s obrubou

- [FFPE] qPCR platničky kompatibilné s prístrojom na qPCR
- Adhezívne plomby pre 96-jamkové platničky s nasledujúcimi špecifikáciami:
 - Opticky číry polyester so zlupovacím filmom
 - Vhodný pre PCR platničky s obrubou
 - Odolné adhezívum, ktoré vydrží viaceré zmeny teploty v rozsahu -40 °C až 110 °C
 - Bez obsahu DNázy/RNázy
- Plastový spotrebný materiál kompatibilný s vybranou kvantifikačnou metódou
- Súprava na fluorometrickú kvantifikáciu dsDNA kompatibilná s vybraným kvantifikačným systémom:
 - Na kvantifikáciu amplifikovaných knižníc pred obohatením sa môže použiť širokospektrálna kvantifikačná súprava.
 - Pri kvantifikácii obohatených knižníc závisí rozsah kvantifikačnej súpravy od použitého panela sond.
- Súprava na analýzu fragmentov na kvalifikáciu knižníc s vybraným kvalifikačným systémom:
 - Na kvalifikáciu amplifikovaných knižníc pred obohatením možno použiť súpravu so širokým rozsahom.
 - Pri kvalifikácii obohatených knižníc závisí rozsah kvalifikačnej súpravy od použitého panela sond.
- [Voliteľné] Súprava na extrakciu DNA z ľudských buniek a tkaniva. Môžete použiť ktorúkoľvek validovanú extrakčnú metódu.

Odber, preprava a skladovanie vzoriek



UPOZORNENIE

So všetkými vzorkami zaobchádzajte ako s potenciálne infekčnými látkami.

- Tento test je kompatibilný s genomickou DNA získanou z ľudských buniek a tkaniva.
- V prípade komerčne dostupnej purifikovanej gDNA sa uistite, že vzorky boli prepravované za správnych podmienok a skladované podľa pokynov výrobcu. Dodržiavajte osvedčené postupy pre cykly skladovania a rozmrazovania a zmrazovania gDNA.
- Pri vstupe plnej krvi dodržiavajte požiadavky na odber, prepravu a uchovávanie krvi platné pre zvolenú metódu extrakcie DNA. Môžete použiť ľubovoľnú overenú extrakčnú metódu. Preprava plnej krvi musí byť v súlade s národnými, federálnymi, štátnymi a miestnymi predpismi pre prepravu etiologických látok.
- Na extrakciu DNA z FFPE tkaniva možno použiť akúkoľvek overenú extrakčnú metódu. Pri určovaní nasledujúcich postupov postupujte podľa pokynov a odporúčaní platných pre zvolený spôsob odsávania:
 - metóda fixácie vo formalíne a zalievania do parafínu pre tkanivá, aby sa zabezpečila najlepšia kvalita extrahovanej DNA.
 - skladovanie FFPE vzoriek,
 - požiadavky na počiatočný materiál, ako je počet a hrúbka sekcií FFPE. Väčšina metód čistenia odporúča použiť čerstvo narezané rezy.

Varovania a preventívne opatrenia

- Reagencie Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit obsahujú potenciálne nebezpečné chemikálie. V dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami môže dôjsť k zraneniam. Používajte ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho pláštá, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagentami manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, štátnymi a miestnymi zákonmi a predpismi. Ďalšie informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete na kartách bezpečnostných údajov (SDS) na stránke support.illumina.com/sds.html.
- Ihneď nahláste akékoľvek závažné udalosti spojené s týmto výrobkom spoločnosti Illumina a príslušným úradom v členskom štáte, v ktorom sa nachádzajú používateľ aj pacient.
- So všetkými krvnými vzorkami zaobchádzajte ako s infekčným materiálom obsahujúcim vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV), vírus ľudskej hepatitídy B (HBV) a iné krvou prenášané patogény (univerzálne preventívne opatrenia).
- Použite bežné laboratórne bezpečnostné opatrenia. Pipetovanie nevykonávajte ústami. Nejedzte, nepite ani nefajčite v oblastiach určených na prácu. Pri manipulácii so vzorkami a súpravami reagentov noste jednorazové rukavice a laboratórny plášť. Po manipulácii so vzorkami a reagentami zo súpravy si dôkladne umyte ruky.
- Pred spustením protokolu sa uistite, že všetky výpary chlórnanu sodného sú úplne rozptýlené, aby sa zabránilo degradácii vzorky alebo činidla.
- Kontaminácia vzoriek inými produktmi/amplikónmi PCR môže spôsobiť nepresné a nespoľahlivé výsledky. Aby ste predišli kontaminácii, používajte nasledujúce osvedčené postupy:
 - Dodržiavajte správnu laboratórnu prax a laboratórnu hygienu.
 - Kroky pracovného postupu vykonajte v určených oblastiach pred amplifikáciou alebo po nej.
 - Použité reagenty skladujte pred čistením knižníc v predamplifikačnej oblasti.
 - Oddel'te predamplifikačné reagenty od postamplifikačných.
 - Dbajte na to, aby mali priestory pred amplifikáciou a po amplifikácii špecializované vybavenie, ako napr. pipety, špičky pipiet, vortexery a centrifúgy.
- Dbajte na to, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii. Pri spracovaní jednotlivých vzoriek a pri dávkovaní nových reagentov používajte zakaždým nové pipetové špičky. Použitie filtrovaných špičiek znižuje riziko prenosu amplikónu a krížovej kontaminácie medzi vzorkami.
 - Pri pridávaní alebo prenose vzoriek alebo hlavných zmesí reagentov zmeňte špičky medzi jednotlivými vzorkami.
 - Pri pridávaní indexových adaptérov s viackanálovou pipetou vymieňajte špičky medzi každým riadkom alebo každým stĺpcom. Ak používate jednokanálovú pipetu, vymeňte špičky medzi každou vzorkou.
 - Z pracovného priestoru odstráňte nepoužité dosky indexového adaptéra.
- Pri krokoch premývania etanolom dodržiavajte nasledujúce osvedčené postupy:

- vždy pripravte čerstvý 80 % etanol. Etanol dokáže absorbovať vodu zo vzduchu, čo môže ovplyvňovať výsledky;
 - dbajte na to, aby sa počas krokov premývania odstránil všetok roztok etanolu z dolnej časti jamiek. Zvyškový etanol môže ovplyvniť výsledky;
 - dodržiavajte stanovený čas sušenia krokov magnetického stojana, aby ste zabezpečili úplné odparovanie. Zvyškový etanol môže ovplyvniť účinnosť následných reakcií.
- Pred použitím vždy pripravte hlavné zmesi a nikdy neskladujte kombinované pracovné roztoky.
 - Výkonnosť súpravy Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nie je zaručená, ak sa postupy nedodržiavajú, ako je uvedené v príbalovom letáku.
 - Nepoužívajte žiadne súčasti súpravy po uplynutí dátumu expirácie uvedenom na štítku súpravy.
 - Nezamieňajte komponenty súpravy z rôznych súprav Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Súpravy sú označené na štítku súpravy.

Poznámky k procedúre

Odporúčania pre vstup DNA

Protokol Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilný s vysokokvalitnými, dvojvláknovými vstupmi genómovej DNA (gDNA) s veľkosťou 50 – 1 000 ng.

Uistite sa, že počiatočná vzorka gDNA neobsahuje > 1 mM EDTA a neobsahuje organické kontaminanty, ako je fenol a etanol. Tieto látky môžu narušiť reakciu označovania a viesť k zlyhaniu analýzy.

Vstup gDNA \geq 50 ng

Pre vstupy gDNA medzi 50 – 1 000 ng sa nevyžaduje kvantifikácia a normalizácia počiatočnej vzorky gDNA.

Vstup gDNA < 50 ng

Je možné použiť vstupy DNA 10 – 50 ng s nasledujúcimi úpravami:

- Ak používate vstup 10 – 49 ng gDNA, odporúča sa kvantifikácia počiatočnej vzorky gDNA na stanovenie počtu PCR cyklov potrebných po označení. Na kvantifikáciu dvojvláknového vstupu gDNA použite metódu založenú na fluorometrii. Vyhnite sa metódam, ktoré merajú celkový počet nukleových kyselín, ako je NanoDrop alebo iné metódy absorbančie UV žiarenia.
- Tento protokol nenormalizuje konečné výťažky vopred obohatenej knižnice z 10 – 49 ng gDNA, a preto sa vyžaduje kvantifikácia a normalizácia knižníc pred a po potrebe obohatenia.
- Súprava Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit bola charakterizovaná a overená pre vstupy DNA 50 – 1 000 ng. Ekvivalentný výkon produktu nie je možné zaručiť pre vstupy gDNA < 50 ng.

Odporúčania týkajúce sa vkladania krvi

Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilná s gDNA extrahovanou z periférnej plnej krvi. Môžete použiť ľubovoľnú overenú extrakčnú metódu. Keď sa extrahuje gDNA z plnej krvi, nevyžaduje sa úvodná kvantifikácia vlozenej DNA a súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vytvára normalizované výťažky knižnice pred obohatením.

Nasledujúce faktory môžu negatívne ovplyvniť množstvo DNA získanej zo vzoriek plnej krvi, a teda aj normalizáciu knižnice:

- Vek krvnej vzorky
- Podmienky skladovania
- Základný zdravotný stav, ktorý ovplyvňuje počet bielych krviniek

Odporúčania pre vstup vzorky tkaniva FFPE

Použite nasledujúce kritériá kvality DNA FFPE na určenie vhodného vstupu pre úspešnú prípravu knižnice:

- Pre vzorky FFPE s hodnotou $\Delta Cq \leq 5$ je odporúčaný vstup DNA 50 – 1 000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sa neodporúča pre vzorky FFPE nízkej kvality s $\Delta Cq > 5$. Použitie vzoriek s $\Delta Cq > 5$ je možné, ale môže zvýšiť pravdepodobnosť zlyhania prípravy knižnice alebo znížiť výkon analýzy.

Extrakcia FFPE

Použite metódu izolácie nukleovej kyseliny, ktorá vytvára vysoké výťažky záchytu, minimalizuje spotrebu vzorky a zachováva integritu vzorky. Na extrakciu DNA zo vzoriek FFPE môžete použiť ľubovoľnú overenú metódu. V prípade gDNA extrahovanej z FFPE tkaniva sa vyžaduje počiatočná kvantifikácia vstupnej DNA a Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit neprodukuje normalizované vopred obohatené výťažnosti knižnice.

Kvalifikácia FFPE DNA

Pred použitím sa musí použiť gDNA extrahovaná z FFPE tkaniva. Pre optimálny výkon vyhodnoťte kvalitu vzorky DNA overenou extrakčnou metódou na kvalifikáciu DNA extrahovanej zo vzoriek FFPE. Protokol Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilný so vzorkami FFPE DNA s hodnotou $\Delta Cq \leq 5$. Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sa neodporúča pre vzorky FFPE nízkej kvality s $\Delta Cq > 5$. Použitie vzoriek s $\Delta Cq > 5$ je možné, ale môže zvýšiť pravdepodobnosť zlyhania prípravy knižnice alebo znížiť výkon analýzy.

[Voliteľné] Referenčné vzorky FFPE

Pri vykonávaní protokolu používajte charakterizované referenčné materiály, ako je Horizon HD799 (DNA), ako pozitívnu kontrolu. Ako referenčné vzorky je možné použiť aj kvalifikované materiály FFPE zo xenograftov odvodených od bunkovej línie. Na kvantifikáciu referenčných materiálov pred použitím použite metódu založenú na fluorometrii.

POZNÁMKA Pri spracovaní pozitívnej kontrolnej referenčnej vzorky alebo žiadnej šablóny kontroly sa spotrebujú reagenty a zníži sa celkový počet neznámych vzoriek, ktoré je možné spracovať.

Odporúčania pre vstup vzorky

Odporúčania pre vstup vzorky pre Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 1 Odporúčania pre vstup vzorky

Typ vstupu vzorky	Množstvo vstupu vzorky	Vyžaduje sa kvantifikácia vstupnej DNA	Požadovaná kvalita vstupu DNA	Výťažnosť normalizovanej vopred obohatenej knižnice
gDNA	10 – 49 ng	Áno	Pomer 260/280 1,8 – 2,0	Nie
gDNA	50 – 1 000 ng	Nie	Pomer 260/280 1,8 – 2,0	Áno
gDNA z krvi	50 – 1 000 ng	Nie	Pomer 260/280 1,8 – 2,0	Áno
gDNA z FFPE	50 – 1 000 ng	Áno	Hodnota $\Delta Cq \leq 5$	Nie

Odporúčané cykly PCR pre program eBLTS PCR sa upravujú na základe vstupnej koncentrácie a kvality vzorky. Ďalšie informácie nájdete v časti [Amplifikácia tagmentovanej DNA na strane 29](#).

Tipy a techniky

Dbajte na to, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii.

- Pri pridávaní alebo prenášaní vzoriek vymieňajte špičkami medzi *jednotlivými vzorkami*.
- Pri pridávaní indexových adaptérov s viackanálovou pipetou vymieňajte špičky medzi *každým riadkom* alebo *každým stĺpcom*. Ak používate jednokanálovú pipetu, vymeňte špičky medzi každou vzorkou.

Zapečatenie platničky

- Pred nasledujúcimi krokmi v protokole vždy utesnite 96-jamkovú platňu novým lepiacim tesnením pomocou gumového valčeka na zakrytie platničky:
 - kroky pretrepávania;
 - kroky inkubácie. Nesprávne utesnenie platničky môže viesť k odparovaniu počas inkubácie;

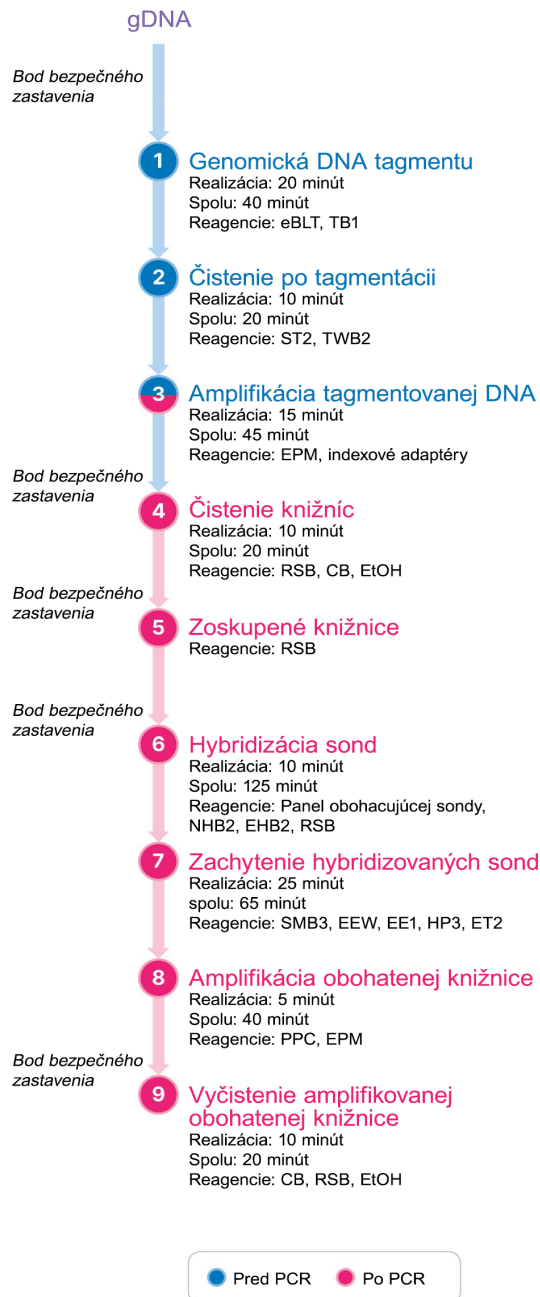
- kroky centrifúgy;
- kroky hybridizácie.
- Na obmedzenie rizika krížovej kontaminácie a odparovania overte, či sú okraje a jamky úplne utesnené.
 - Ak spozorujete akékoľvek tekutiny alebo kondenzáciu na tesnení alebo bokoch jamiek platničky, pred odtesnením odstreďujte podľa potreby.
- Než začnete pomaly odstraňovať tesnenie, položte platničku na rovný povrch.

Manipulácia Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Zásobnú skúmavku eBLTS uchovávajte vo zvislej polohe v chladničke tak, aby boli guľôčky vždy ponorené do pufra.
- Bezprostredne pred použitím dôkladne rozvίrte zásobnú skúmavku eBLTS, až kým sa guľôčky znovu nerozpustia. Aby sa zabránilo opätovnému usadeniu guľôčok, pred pipetovaním sa neodporúča odstreďovanie.
- Ak sa guľôčky prilepia na bočnú alebo vrchnú časť 96-jamkovej platničky, odstreďujte ju rýchlosťou 280 × g počas 3 sekúnd, a potom pipetou resuspendujte.
- Pri premývaní eBLTS:
 - Použite vhodný magnetický stojan pre dlahu.
 - Ponechajte platničku na magnetickom stojane dovtedy, kým pokyny neuvádzajú, že ju máte odobrať.
 - Ak aspirujete guľôčky do pipetových špičiek, guľôčky nadávajte späť na platničku v magnetickom stojane a počkajte, kým nebude kvapalina priehľadná (2 minúty).

Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Pracovný postup

Nasledujúci diagram znázorňuje pracovný postup Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Medzi jednotlivými krokmi sú vyznačené body bezpečného zastavenia. Odhady času sú založené na spracovaní 12 vzoriek pri 12-plexovom obohatení.



Návod na použitie

Táto kapitola opisuje protokol Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Skontrolujte plánovaný úplný postup sekvenovania, od vzorky až po analýzu, aby ste zaistili kompatibilitu produktov a parametrov experimentu.
- Pred pokračovaním potvrdte obsah súpravy a uistite sa, že máte potrebné komponenty, vybavenie a materiály.
 - Biotinylované sondy tretích strán musia spĺňať špecifické požiadavky. Pozrite si časť [Požiadavky na panel obohacovacej sondy na strane 10](#), aby ste sa uistili, že vaše sondy tretích strán spĺňajú požiadavky.
- Postupujte podľa protokolu v uvedenom poradí pomocou špecifikovaných objemov a inkubačných parametrov.
- Ak sa v protokole neurčí bod bezpečného zastavenia, ihneď prejdite na ďalší krok.
- Pri vytváraní mastermixu sa prebytok započíta do poskytnutých objemov.
- Uistite sa, že používate vhodný magnetický stojan pre typ doštičky.

Príprava na združenie

Tento krok je potrebný na zabezpečenie úspešného sekvenovania obohatených knižníc. K združeniu knižníc môže dôjsť pred obohatením a pred sekvenovaním.

Pred obohatením – jednotlivé indexované amplifikované knižnice sa združia dohromady, aby sa obohatili o zvolený panel sond. Tým sa vytvorí viacnásobný súbor obohatených knižníc. Pre vstup vzorky FFPE bolo spracovanie testované a odporúča sa výlučne pre 1-násobné obohacovacie reakcie. Pri vysokokvalitnej gDNA sa testovali 12-násobné reakcie, ale možné sú aj 2-násobné až 11-násobné.

Pred sekvenovaním – sa pred sekvenovaním spoja 1-násobné obohatené knižnice a/alebo multiplexom obohatené knižnice. Počet obohatených knižníc, ktoré je možné sekvenovať, závisí od cieľovej hĺbky čítania pre každú vzorku v sekvenovacom systéme.

Jedinečné duálne indexovanie

Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit používa jedinečné duálne indexy.

- Knižnice s duálnym indexovaním pridávajú sekvencie indexu 1 (i7) a indexu 2 (i5) na generovanie jedinečne označených knižníc.
- Indexy UD majú odlišné nesúvisiace indexové sekvencie pre načítanú hodnotu indexu i7 a i5. Indexy majú dĺžku 10 báz.

Výber indexových adaptérov s rôznymi sekvenciami pre združené knižnice optimalizuje vyváženie farieb pre úspešné sekvenovanie a analýzu údajov. Skupiny zložitosti s ≥ 10 plexmi sú prirodzene vyvážené farbami, takže môžete použiť ľubovoľnú kombináciu indexového adaptéra. Počas sekvenovania poskytuje modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager (Správca lokálnych chodov) možnosti pre kombinácie indexov s vyváženými farbami a upozorní vás, ak nie je vo vybraných kombináciách indexov dostatočná rozmanitosť.

Informácie o sekvenciách adaptérov indexu UD Illumina a rozloženiach doštičiek nájdete v [Appendix: Sekvencie adaptérov indexov Illumina UD na strane 63](#)

Podporované obohacovacie násobnosti

Reagencie Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sa konfiguruje a testujú pri 1-násobnej a 12-násobnej obohacujúcej násobnosti. Hoci sú možné ďalšie obohacujúce násobnosti, niektoré násobnosti si vyžadujú ďalšiu prípravu predobohacovacej knižnice a reagencie panelu obohacujúcej sondy.

Získanie vhodnej obohacujúcej výťažnosti pre neštandardné obohacovacie násobnosti si môže vyžadovať dodatočnú optimalizáciu. Optimálne výsledky nie sú zaručené.

- **Obohacovacia násobnosť** – počet vopred obohatených knižníc (1 – 12) spojených do jednej obohatenej reakcie na hybridizáciu s panelmi obohacovacej sondy. Napríklad kombinácia 12 vopred obohatených knižníc spolu vytvorí 12-násobný obohacujúci súbor.
- **Reakcia obohacovania** – počet jedinečných obohacovacích reakčných prípravkov bez ohľadu na počet vopred obohatených knižníc združených na reakciu. Napríklad jedna obohacovacia reakcia môže pripraviť 1-násobný alebo 12-násobný obohacujúci súbor.

Ak chcete vypočítať celkový počet následne obohatených knižníc, vynásobte obohacujúcu násobnosť na reakciu počtom obohatených reakcií. Napríklad jedna obohatená reakcia 12-násobného obohacovacieho súboru produkuje súbor 12 následne obohatených knižníc.

Pri zoskupovaní vopred obohatených knižníc reagencie Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit podporujú nasledujúce obohatené reakcie a násobnosť.

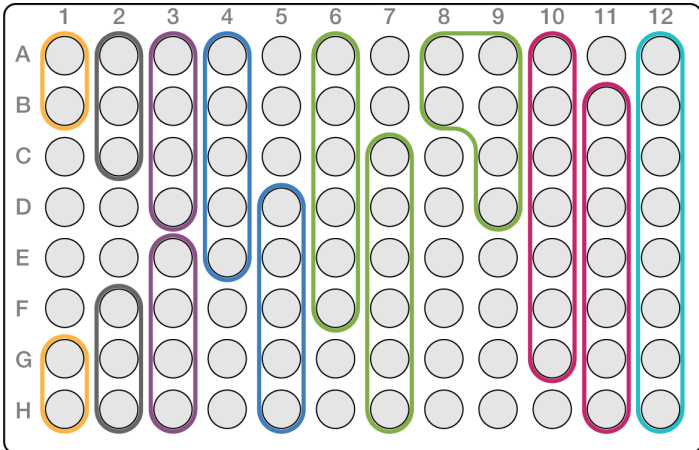
Reagencie Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Obohacujúce reakcie	Obohacujúca plexita
Súprava so 16 vzorkami	16 reakcií	1 plex
Súprava s 96 vzorkami	8 reakcií	12-násobné

Stratégie dvoj- až osemnásobného združovania

Nasledujúca tabuľka zobrazuje adaptéry indexov (jamky), ktoré možno kombinovať v 2- až 8-násobných súboroch, zatiaľ čo farebne kódovaný obrázok zobrazuje každú kombináciu.

Združte akúkoľvek násobnosť ≥ 2 z hornej alebo dolnej časti stĺpca. Nezdužujte v jednom riadku.

Násobnosť	Kombinácie	Farba na obrázku
2	Prvé dve alebo posledné dve jamky v stĺpci: <ul style="list-style-type: none"> • A a B • G a H Riadky C – F sa nepoužívajú.	Oranžový
3	Prvé tri alebo posledné tri jamky v stĺpci: <ul style="list-style-type: none"> • A – C • F – H Riadky D a E sa nepoužívajú.	Sivá
4	Prvé štyri alebo posledné štyri jamky v stĺpci: <ul style="list-style-type: none"> • A – D • E – H 	Fialová
5	Prvých päť alebo posledných päť jamiek v stĺpci: <ul style="list-style-type: none"> • A – E • D – H 	Modrá
6	[Možnosť 1] Prvých šesť alebo posledných šesť jamiek v stĺpci: <ul style="list-style-type: none"> • A – F • C – H [Možnosť 2] Prvé dve jamky (A a B) alebo posledné dve jamky (G a H) v jednom stĺpci a všetky štyri jamky v susednom stĺpci.	Zelená
7	Prvých sedem alebo posledných sedem jamiek v stĺpci: <ul style="list-style-type: none"> • A – G • B – H 	Ružová
8	Celý stĺpec.	Modrozelená

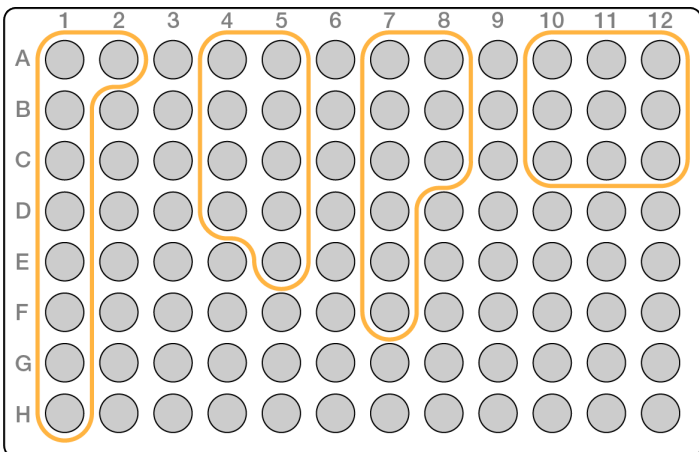


Stratégie deväťnásobného združovania

Použite adaptéry indexov z akýchkoľvek jamiek, ktoré optimalizujú vyváženie farieb počas sekvenovania, napríklad:

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

Nasledujúci obrázok znázorňuje všetky štyri príklady.



Genomická DNA tagmentu

Tento krok používa Enrichment BLT Small (eBLTS) na označenie DNA, čo je proces, ktorý fragmentuje a označuje DNA pomocou sekvencií adaptérov.

Spotrebný materiál

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (žltý uzáver)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Voda bez nukleáz
- 96-jamková PCR platnička
- Lepiace tesnenie
- 1,7 ml mikrocentrifugačné skúmavky
- Prúžok s 8 skúmavkami
- Špičky pipety
 - 200 µl viackanálové pipety



UPOZORNENIE

Táto súprava reagentov obsahuje potenciálne nebezpečné chemikálie. V dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami môže dôjsť k zraneniam. Používajte ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho pláštia, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagensiami manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, štátnymi a miestnymi zákonmi a predpismi. Ďalšie informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete na kartách bezpečnostných údajov (SDS) na stránke support.illumina.com/sds.html.

Informácie o reagensiach

- eBLTS sa musí skladovať pri teplote 2 °C až 8 °C. eBLTS nepoužívajte, ak je teplota skladovania nižšia ako 2 °C.
- eBLTS neodstred'ujte.

Príprava

1. Pripravte nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
eBLTS (žltý uzáver)	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou. Tesne pred použitím premiešajte vírením. Pred pipetovaním neodstred'ujte.
TB1	-25 °C až -15 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou. Vírením premiešajte.

2. Rozvίrte alebo pipetujte DNA, a potom krátko odstred'ujte.
3. Na tepelnom cykleri uložte nasledujúci program TAG:
 - Vyberte voliteľnú funkciu veka predhrievania a nastavte na 100 °C.

- Nastavte reakčný objem na 50 µl
- 55 °C na 5 minút
- Uchovávajte pri teplote 10 °C

Postup

1. Pridajte 2 – 30 µl DNA do každej jamky z 96-jamkovej platničky PCR tak, aby celkové vstupné množstvo bolo 50 – 1 000 ng.
Ak je objem DNA < 30 µl, pridajte do vzoriek DNA vodu bez nukleázy, aby celkový objem dosiahol 30 µl.
2. Dôkladne rozvίrte eBLTS, kým sa guľôčky úplne nerozpustia.
3. V skúmavke skombinujte nasledujúce objemy, aby ste pripravili Tagmentation Master Mix. Vynásobte každý objem počtom združených knižníc, ktoré sa spracúvajú.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Nadbytočný prebytok reagensie je zahrnutý v objeme.
4. Dôkladne napipetujte Tagmentation Master Mix, aby sa premiešala.
5. Objem Tagmentation Master Mix rovnomerne rozdeľte do prúžku s 8 skúmavkami.
6. Pomocou 200 µl multikanálovej pipety preneste 20 µl Tagmentation Master Mix do každej jamky platničky PCR obsahujúcej vzorku. Pre každý stίpec alebo riadok vzorky použite nové špičky.
7. Prúžok s 8 skúmavkami zlikvidujte po nadávkovaní Tagmentation Master Mix.
8. Pomocou 200 µl viackanálovej pipety nastavenej na 40 µl pipetou premiešajte každú vzorku 10-krát. Pre každý stίpec vzorky použite nové špičky.
Prípadne utesnite platničku PCR a 1 minútu používajte trepačku platničky rýchlosťou 1 600 ot./min.
9. Utesnite platničku, a potom ju umiestnite na vopred naprogramovaný tepelný cyklovač a spustite program TAG.
10. Počkajte, kým program TAG dosiahne teplotu 10 °C, a potom platničku okamžite odstráňte.
11. Nechajte 96-jamkovú platničku PCR postáť pri izbovej teplote 2 minúty, a potom pokračujte ďalším krokom.

Čistenie po tagmentácii

Tento krok premýva DNA označenú adaptérom na prístroji eBLTS pred amplifikáciou PCR.

Spotrebný materiál

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96-jamkový magnetický stojan na PCR platničky
- Lepiace tesnenie

- Průžok s 8 skúmavkami
- Špičky pipety
 - 20 µl viackanálové pipety
 - 200 µl viackanálové pipety
- Pripravte sa na neskorší postup:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Platnička s adaptérmí indexov

Informácie o reagentoch

- Uistite sa, že používate vhodný magnetický stojan pre svoju platničku. Použitie magnetického stojana MIDI na PCR platničku môže zabrániť TWB2 prilepeniu na guľôčky.
- Pomaly napipetujte TWB2, aby sa minimalizovalo penenie, aby sa zabránilo nesprávnej aspirácii objemu a neúplnému zmiešaniu.

Príprava

1. Pripravte nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte na ľade 1 hodinu. Prevrátením premiešajte, a potom krátko odstred'te.
ST2	15 °C až 30 °C	Ak spozorujete zrazeniny, zohrievajte ich 10 minút pri teplote 37 °C, a potom miešajte, kým sa zrazeniny nerozpustia. Používajte pri izbovej teplote.
TWB2	15 °C až 30 °C	Používajte pri izbovej teplote.
Platnička s adaptérmí indexov	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote 30 minút.

Postup

1. Pridajte 10 µl ST2 ku každej tagmentačnej reakcii. Ak používate viackanálovú pipetu, pipetu preneste ST2 do průžku s 8 skúmavkami, a potom preneste príslušné objemy do PCR dosičky. Pre každý stĺpec alebo riadok vzorky použite nové špičky.
2. Pomocou 200 µl pipety nastavenej na 50 µl pomaly napipetujte každú jamku 10-krát, aby sa guľôčky resuspendovali.
Prípadne doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 600 ot./min. Opakujte podľa potreby.
3. Zaplombujte doštičku a odstred'ujte ju 10 sekúnd v centrifúge pri 280 × g.
4. Inkubujte 5 minút pri izbovej teplote.

5. Umiestnite doštičku na magnetický stojan na PCR doštičky a čakajte, kým nebude tekutina číra (3 minúty).
6. [\leq 48 vzoriek] Prepláchnite trikrát, ako je uvedené ďalej.
 - a. Pomocou 200 μ l viackanálovej pipety nastavenej na 60 μ l odstráňte a zlikvidujte supernatant. Dbajte nato, aby ste pritom nepoškodili obal guľôčok.
 - b. Odstráňte z magnetického stojana.
 - c. Hneď potom pomaly pridajte 100 μ l TWB2 priamo na guľôčky.
 - d. Pipetujte pomaly, až kým sa guľôčky celkom resuspendujú. Prípadne doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 600 ot./min.
 - e. Ak dôjde k rozstrekovaniu, odstred'ujte 10 sekúnd pri 280 \times g.
 - f. Umiestnite doštičku na magnetický stojan na PCR doštičky a čakajte, kým nebude tekutina číra (3 minúty).

Počas tretieho preplachovania ponechajte doštičku na magnetickom stojane a TWB2 v jamkách, aby sa predišlo nadmernému vysušeniu. Po príprave hlavnej PCR zmesi odstráňte a zlikvidujte supernatant.
 - g. Pomocou 200 μ l viackanálovej pipety nastavenej na 100 μ l odstráňte a zlikvidujte supernatant.
 - h. Zopakujte kroky c – f dvakrát, pričom celkovo vykonajte tri prepláchnutia.
7. [$>$ 48 vzoriek] Prepláchnite trikrát, ako je uvedené ďalej.
 - a. Vykonajte kroky b a c v prírastkoch o 1 – 2 stĺpce, až kým nebudú všetky stĺpce spracované tak, aby sa predišlo nadmernému vysušeniu.
 - b. Pomocou 200 μ l viackanálovej pipety nastavenej na 60 μ l odstráňte a zlikvidujte supernatant.
 - c. Odstráňte z magnetického stojana.
 - d. Hneď potom pomaly nadávkujte 100 μ l TWB2 priamo na guľôčky.
 - e. Pipetujte pomaly, až kým sa guľôčky celkom resuspendujú. Prípadne doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 600 ot./min.
 - f. Ak dôjde k rozstrekovaniu, odstred'ujte 10 sekúnd pri 280 \times g.
 - g. Umiestnite doštičku na magnetický stojan na PCR doštičky a čakajte, kým nebude tekutina číra (3 minúty).

Počas tretieho preplachovania ponechajte doštičku na magnetickom stojane a TWB2 v jamkách, aby sa predišlo nadmernému vysušeniu. Po príprave hlavnej PCR zmesi odstráňte a zlikvidujte supernatant.
 - h. Pomocou 200 μ l viackanálovej pipety nastavenej na 100 μ l odstráňte a zlikvidujte supernatant.
 - i. Odstráňte z magnetického stojana a pomaly pridajte 100 μ l TWB2 priamo na guľôčky.
 - j. Opakujte kroky h a i v prírastkoch o 1 alebo 2 stĺpce, až kým nebudú všetky stĺpce spracované.
 - k. Zopakujte kroky e – h dvakrát, pričom celkovo vykonajte tri prepláchnutia.
8. Nechajte doštičku na magnetickom stojane, až kým neprejdete na krok 4 v odseku *Postup* v časti *Amplifikácia tagmentovanej DNA*.

TWB2 má ostať v jamkách, aby sa predišlo nadmernému vysušeniu guľôčok.

Amplifikácia tagmentovanej DNA

Tento krok amplifikuje tagmentovanú DNA použitím PCR programu s limitovanými cyklami. Krok PCR pridáva adaptéry Index 1 (i7), adaptéry Index 2 (i5) a sekvencie potrebné na sekvenovanie generovania klastra.

Spotrebný materiál

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Platnička s adaptérmi indexov
- 96-jamková PCR platnička
- Voda bez nukleáz
- Lepiace tesnenie
- 1,5 ml mikrocentrifugačné skúmavky
- Špičky pipety
 - 20 µl viackanálové pipety
 - 200 µl viackanálové pipety

Informácie o reagensiach

- Platničky s adaptérmi indexov
 - jamka môže obsahovať > 10 µl adaptérov indexov,
 - na platničku adaptéra indexu nepridávajú vzorky,
 - každá jamka indexovej platničky je určená len na jedno použitie.

Príprava

1. Pripravte nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri teplote 4 °C alebo na ľade 1 hodinu. Prevrátením premiešajte, a potom krátko odstred'ite.
Platnička s adaptérmi indexov	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote 30 minút.

2. Uložte si nasledujúci PCR program pre eBLTS v termálnom cykléri a použite správny počet cyklov PCR podľa uvedenej tabuľky.
- Vyberte voliteľnú funkciu veka predhrievania a nastavte na 100 °C.
 - Nastavte reakčný objem na 50 µl
 - 72 °C 3 minúty
 - 98 °C 3 minúty
 - X cyklov:
 - 98 °C 20 sekúnd
 - 60 °C 30 sekúnd
 - 72 °C 1 minútu
 - 72 °C 3 minúty
 - Uchovávajúte pri teplote 10 °C

Celkový čas chodu je ~38 minút pri 9 cykloch a ~46 minút pri 12 cykloch.

Typ vstupu vzorky	Počet cyklov PCR (X)
10 – 49 ng gDNA	12
50 – 1 000 ng gDNA	9
50 – 1 000 ng gDNA extrahovanej z FFPE	12
gDNA extrahovaná z krvi	9

Postup

1. Na prípravu hlavnej zmesi PCR skombinujte nasledujúce. Vynásobte každý objem počtom združených knižníc, ktoré sa spracúvajú.
 - EPM (23 µl)
 - Voda bez nukleáz (23 µl)
 Nadbytočný prebytok reagentie je zahrnutý v objeme.
2. Napipetujte hlavnú PCR zmes 10-krát, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstredujte v centrifúge.
3. Viackanálovou pipetou s objemom 200 µl odstráňte TWB2 a zlikvidujte ho, pričom platnička musí byť umiestnená na magnetickom stojane.
Pena, ktorá ostane na stenách jamky, nemá nežiaduci vplyv na knižnicu.
4. Odstráňte z magnetického stojana.
5. Ihneď pridajte 40 µl hlavnej PCR zmesi priamo na guľôčky v každej jamke.
6. Ihneď napipetujte, aby ste látku zmiešali, až kým sa guľôčky celkom resuspendujú. Prípadne platničku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 600 ot./min.

7. Zaplombujte platničku so vzorkami a odstred'ujte ju v centrifúge 10 sekúnd pri 280 × g.
8. Odstred'ujte platničku s adaptérmi indexov 1 minútu pri 1 000 × g.
9. Pripravte si platničku s adaptérmi indexov.
 - [< 96 vzoriek] Prepichnete fóliovú plombu na platničke s adaptérmi indexov novou pipetovou špičkou pri každej jamke len pre ten počet vzoriek, ktorý sa spracúva.
 - [96 vzoriek] Zarovnajzte novú PCR platničku s polovičnou obrubou nad platničkou s adaptérmi indexov a zatlačte smerom nadol, aby ste prepichli fóliovú plombu. Zlikvidujte PCR platničku, ktorú ste použili na prepichnutie fóliovej plomby.
10. Pomocou novej pipetovej špičky pridajte 10 µl vopred spárovaných adaptérov indexov do každej jamky.
11. Použite pipetovú súpravu na 40 µl a pipetujte 10-krát, aby sa obsah premiešal. Prípadne platničku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 600 ot./min.
12. Zaplombujte platničku a odstred'ujte ju 10 sekúnd v centrifúge pri 280 × g.
13. Umiestnite ju do termálneho cykléra a spustíte PCR program pre eBLTS.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, skladujte v prostredí s teplotou -25 °C až -15 °C max. 30 dní.

Čistenie knižníc

Tento krok využíva na čistenie zosilnených knižníc postup čistenia obojstranných guľôčok.

Spotrebný materiál

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Čerstvo pripravený 80 % etanol (EtOH)
- 96-jamková 0,8 ml polypropylénová skladovacia platnička s hlbokými jamkami (MIDI platnička)
- 96-jamková PCR platnička
- Magnetický stojan na platničky MIDI
- Magnetický stojan na PCR platničky
- 1,5 ml mikrocentrifugačné skúmavky
- Voda bez nukleáz

Informácie o reagensiach

- Cleanup Beads
 - Pred každým použitím premiečajte.
 - Často premiešajte, aby ste sa uistili, že sú guľôčky rovnomerne rozložené.
 - Aspirujte a pomaly nadávajte z dôvodu viskozity roztoku.

Príprava

1. Pripravte nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
CB	Izbová teplota	Miešajte a prevracajte, aby sa premiešala, až kým nebude farba kvapaliny homogénna.
RSB	2 °C až 8 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote 30 minút. Vírením premiešajte.

Postup

1. 96-jamkovú platničku PCR pretrepávajte 1 minútu pri 1800 ot./min. a potom ju krátko odstredíte.
2. Umiestnite platničku na magnetický stojan na PCR platničky a čakajte, kým nebude tekutina číra (1 minúta).
3. Miešajte CB 3-krát po 10 sekúnd a potom viackrát prevráťte, aby sa obsah resuspendoval.
4. Pri vysokokvalitnej gDNA postupujte podľa nasledujúcich pokynov.
 - a. Pridajte 77 µl vody bez nukleáz do každej jamky novej MIDI platničky.
 - b. Pridajte 88 µl CB do každej jamky MIDI platničky.
 - c. Preneste 45 µl supernatantu z každej jamky PCR platničky do príslušnej jamky MIDI platničky.
 - d. Zlikvidujte PCR platničku.
 - e. Napipetujte každú jamku 10-krát, aby sa obsah premiešal. Prípadne platničku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 800 ot./min.
 - f. Platničku zaplombujte a inkubujte 5 minút pri izbovej teplote.
 - g. Skontrolujte, či vzorka neobsahuje vzduchové bubliny. Ak spozorujete vzduchové bubliny, vzorku odstredíte.
 - h. Umiestnite platničku na magnetický stojan na MIDI platničky a počkajte, kým nebude tekutina číra (5 minút).
 - i. Počas inkubácie dôkladne premiešajte CB, a potom pridajte 20 µl do každej jamky novej MIDI platničky.
 - j. Preneste 200 µl supernatantu z každej jamky MIDI platničky do príslušnej jamky novej MIDI platničky (obsahujúcej 20 µl CB).
 - k. Zlikvidujte prvú MIDI platničku.
 - l. Napipetujte každú jamku novej MIDI platničky 10-krát, aby sa obsah premiešal. Prípadne platničku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 800 ot./min.
5. Pri extrahovanom FFPE postupujte podľa nasledujúcich pokynov.
 - a. Pridajte 81 µl CB do každej jamky novej MIDI platničky.
 - b. Preneste 45 µl supernatantu z každej jamky PCR platničky do príslušnej jamky MIDI platničky.
 - c. Zlikvidujte PCR platničku.
 - d. Napipetujte každú jamku 10-krát, aby sa obsah premiešal. Prípadne platničku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 800 ot./min.

6. Inkubujte pri izbovej teplote 5 minút.
7. Skontrolujte, či vzorka neobsahuje vzduchové bubliny. Ak spozorujete vzduchové bubliny, vzorku odstred'ite.
8. Umiestnite platničku na magnetický stojan na MIDI platničky a počkajte, kým nebude tekutina číra (5 minút).
9. Odstráňte a zlikvidujte supernatant, pričom dávajte pozor, aby ste nepoškodili guľôčky.
10. Guľôčky prepláchnite podľa nasledujúceho postupu.
 - a. Ponechajte platničku na magnetickom stojane a pridajte 200 µl čerstvého 80 % EtOH bez miešania.
 - b. Inkubujte 30 sekúnd.
 - c. Odstráňte a zlikvidujte supernatant, pričom dávajte pozor, aby ste nepoškodili guľôčky.
11. Guľôčky **druhý** raz prepláchnite.
12. Sušte 5 minút vzduchom na magnetickom stojane.
13. Počas sušenia vzduchom použite 20 µl pipetu na odstránenie a zlikvidovanie zvyškového EtOH.
14. Odstráňte z magnetického stojana.
15. Pridajte 17 µl RSB ku guľôckam.
16. Platničku zaplombujte a nechajte pretrepať 2 minúty pri 1 800 ot./min.
17. Inkubujte 2 minúty pri izbovej teplote.
18. Skontrolujte, či vzorka neobsahuje vzduchové bubliny. Ak spozorujete vzduchové bubliny, vzorku odstred'ite.
19. Umiestnite platničku na magnetický stojan na MIDI platničky a počkajte, kým nebude tekutina číra (2 minúty).
20. Preneste 15 µl supernatantu do novej 96-jamkovej PCR platničky.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, skladujte platničku v prostredí s teplotou -25 °C až -15 °C max. 30 dní.

Združovanie knižníc pred obohatením

Tento krok kombinuje knižnice DNA s jedinečnými indexmi do jedného súboru z až 12 knižníc.

Metódy združovania

Združovanie môžete vykonávať na základe objemu alebo podľa hmotnosti. Použite nasledujúcu tabuľku na určenie vhodnej metódy pre váš vstup.

Tabuľka 2 Odporúčané metódy združovania

Vstup vzorky	Metóda združovania
10 – 49 ng gDNA	Hmotnosť
50 – 1 000 ng gDNA	Objem
gDNA extrahovaná z FFPE	Hmotnosť
gDNA extrahovaná z krvi	Objem

- Obohatenie jednou knižnicou nevyžaduje združovanie knižníc pred obohatením. Možno však bude potrebné pridať RSB.
- Po kvantifikácii knižnice pred obohatením možno všetky typy vstupných údajov vzoriek spojiť podľa hmotnosti, aby sa dosiahlo optimálne vyváženie indexu.
- Konečný výťažok knižníc pred obohatením vytvorených v samostatných experimentálnych prípravkoch sa môže líšiť. Preto sa na dosiahnutie optimálneho vyváženého indexu odporúča združenie.
- V nasledujúcich situáciách použite 1-násobné obohatenie.
 - 10 – 49 ng gDNA,
 - 50 – 1 000 ng gDNA extrahovanej z FFPE,
 - Detekcia nízkej frekvencie minoritnej alely pre volanie somatických variantov.

Skupina podľa hmotnosti

V nasledujúcich situáciách kvantifikujte svoje knižnice, aby ste použili hmotu DNA na knižnicu na obohatenie špecifikované v časti [Združovanie knižníc pred obohatením v rovnakej koncentrácii na strane 35](#).

- 10 – 49 ng vstup vzorky gDNA
- 50 – 1 000 ng gDNA extrahovanej zo vstupu vzorky FFPE
- Detekcia nízkej frekvencie alel pre somatické volanie variantov
- gDNA extrahovaná z krvi pre optimálne vyváženie indexu

Kvantifikácia vopred obohatených knižníc

- Spustíte 1 µl vopred obohatených knižníc pomocou preferovanej metódy kvantifikácie na báze fluorescencie, ktorá používa farbivo interkalujúce dsDNA.
 - Pri 50 – 1 000 ng vysokokvalitnej gDNA môžete očakávať \geq 500 ng vopred obohatenú výťažnosť knižnice.
 - V prípade 50 – 1 000 ng gDNA extrahovanej z FFPE očakávajte 500 – 6 000 ng vopred obohatenú výťažnosť knižnice v závislosti od kvality počiatočnej vzorky.

POZNÁMKA V prípade metód kvantifikácie s rôznymi predsudkami kvalifikujte metódu kvantifikácie pre tento pracovný postup. Výsledky koncentrácie sa môžu líšiť v závislosti od použitej metódy.

Združovanie knižníc pred obohatením v rovnakej koncentrácii

Pomocou nasledujúcej tabuľky určte hmotnosť DNA na knižnicu potrebnú na obohatenie podľa typu vzorky a násobnosti obohatenia. Optimálne výťažnosti obohatenia a výkon analýzy nie sú zaručené pri použití nižších výťažností knižnice pred obohatením, ako sa odporúča.

Celková hmotnosť DNA v reakcii obohatenia by nemala presiahnuť 6 000 ng.

Vstup vzorky	Obohacujúca plexita	Hmotnosť DNA na knižnicu (ng)	Celková hmotnosť knižnice DNA (ng)
Vysokokvalitná gDNA	12	250 – 500	3 000 – 6 000
gDNA extrahovaná z FFPE	1	200	200

- Zaznamenajte indexy knižníc, ktoré plánujete združovať v tomto kroku.
- Na základe koncentrácie každej knižnice vypočítajte objem, ktorý sa musí pridať k reakcii obohacovania, aby ste dosiahli požadovanú hmotnosť DNA.
 - Vysokokvalitná gDNA: Vypočítajte objem knižnice potrebný na vstup 250 – 500 ng.
 - gDNA extrahovaná z FFPE: Vypočítajte objem knižnice potrebný na 200 ng vstup.
- Pridajte vypočítaný objem pre každú knižnicu do tej istej jamky PCR platničky.
- Ak používate vysokokvalitnú gDNA, vykonajte jeden z nasledujúcich krokov na základe celkového objemu knižníc pred obohatením:
 - Ak je objem knižnice pred obohatením = 30 µl, prejdite na časť [Hybridizácia sond na strane 37](#).
 - Ak je objem knižnice pred obohatením < 30 µl, pridajte RSB, aby ste dosiahli celkový objem 30 µl.
 - Ak je objem knižnice pred obohatením > 30 µl, na koncentrovanie združenej vzorky použite metódu na báze guľôčok alebo koncentrátor vákua. Pridajte RSB do koncentrovanej združenej vzorky, aby ste dosiahli celkový objem 30 µl.

5. Ak používate gDNA extrahovanú z FFPE, vykonajte jeden z nasledujúcich krokov na základe celkového objemu knižníc pred obohatením.
- Ak je objem knižnice pred obohatením = 7,5 µl, prejdite na časť [Hybridizácia sond na strane 37](#).
 - Ak je objem knižnice pred obohatením < 7,5 µl, pridajte RSB tak, aby dosiahol celkový objem 7,5 µl.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, skladujte platničku v prostredí s teplotou –25 °C až –15 °C max. 30 dní.

Skupina podľa objemu

Ak je vstup 50 – 1 000 ng gDNA, kvantifikácia a normalizácia jednotlivých knižníc vygenerovaných v tom istom experimente sa nevyžaduje.

Na dosiahnutie optimálneho výkonu združujte iba vopred obohatené vzorky knižnice pripravené tým istým používateľom, šaržou činidla a platničkou adaptéra indexového adaptéra.

1. Zaznamenajte indexy knižníc, ktoré plánujete združovať v tomto kroku.
2. Skombinujte nasledujúcu vopred obohatenú knižnicu a objemy RSB pre svoju obohacujúcu násobnosť do tej istej jamky novej platničky PCR.
Výsledný objem je 30 µl.

Obohacujúca násobnosť*	Každý vopred obohatený objem knižnice (µl)	Objem RSB (µl)
1 plex	14	16
2-násobná	14	2
3-násobná	10	0
4-násobná	7,5	0
5-násobná	6	0
6-násobná	5	0
7-násobná	4,2	0,6
8-násobná	3,7	0,4
9-násobná	3,3	0,3
10-násobná	3	0
11-násobná	2,7	0,3
12 plexov	2,5	0

* Informácie o neštandardných násobnostiach (2-násobných až 11-násobných) nájdete v časti [Obmedzenia postupu na strane 2](#).

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, skladujte platničku v prostredí s teplotou –25 °C až –15 °C max. 30 dní.

[Voliteľné] Kvalifikujte vopred obohatené knižnice

Pri zoskupovaní podľa objemu použite na kvantifikáciu vopred obohatených knižníc metódu založenú na fluorometrických parametroch, ktorá používa farbivo interkalujúce dsDNA. Na kvalifikáciu vopred obohatených knižníc použite analyzátor fragmentov DNA s príslušnou súpravou na analýzu fragmentov.

Na kvalifikáciu knižnice použite celkovo 1 µl. Vopred obohatené knižnice sú dostatočne koncentrované, aby umožnili malé riedenia na kvantifikáciu alebo analýzu fragmentov.

Hybridizácia sond

Tento krok viaže cieľové oblasti DNA, so zachytávacími sondami.

Reagencie Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sú kompatibilné s panelmi Illumina aj oligonukleotidovými panelmi obohacujúcimi DNA tretej strany. Informácie o požadovaných špecifikáciách panelov tretích strán nájdete v časti [Požiadavky na panel obohacovacej sondy na strane 10](#).

Spotrebný materiál

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + blokátory IDT NXT) (modrý uzáver)
- Panel obohacujúcej sondy
- 96-jamková PCR platnička
- Lepiace tesnenie
- Pripravte sa na neskorší postup:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (žltý uzáver)

Informácie o reagensiach

- NHB2 sa vyzráža a oddeľuje počas skladovania.
- Panel obohacujúcej sondy označuje vybraný obohacujúci oligonukleotidový panel od dodávateľa Illumina.

Príprava

1. Pripravte nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
EHB2	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou. Vírením premiešajte. Ak spozorujete kryštály a zakalenie, zopakujte vírenie alebo pipetou nahor a nadol premiešajte roztok, až kým nebude číry.
Panel obohacujúcej sondy	-25 °C až -15 °C (Illumina)	Pri paneloch Illumina aj paneloch tretích strán nechajte panel ohriať na izbovú teplotu. Vírením premiešajte.
NHB2 (modrý uzáver)	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote. Pri izbovej teplote predhrejte inkubátor s mikrovzorkou na rovnakú teplotu ako sondu, ktorú používate, počas 5 minút. Premiešajte 3-krát maximálnou rýchlosťou počas 10 sekúnd, aby ste ju resuspendovali. Krátko odstred'te. Pipetujte nahor a nadol z dolnej časti skúmavky. Ak spozorujete kryštály a zakalenie, zopakujte vírenie alebo pipetou nahor a nadol premiešajte roztok, až kým nebude číry. Používajte za tepla, aby ste predišli precipitácii.
SMB3*	2 °C až 8 °C	Ak postupujete k ďalšiemu postupu ihneď po 90-minútovom udržaní v programe HYB, prived'te ho na izbovú teplotu najmenej 2 hodiny pred spustením programu HYB.
EEW* (jantárová skúmavka)	-25 °C až -15 °C	Ak postupujete k ďalšiemu postupu ihneď po 90-minútovom udržaní v programe HYB, prived'te ho na izbovú teplotu najmenej 2 hodiny pred spustením programu HYB. Pri izbovej teplote predhrejte inkubátor s mikrovzorkou na príslušnú hybridizáciu a zaznamenajte teplotu 30 minút pred skončením programu HYB.

* Ak sa zastavíte pred ďalším postupom, odložte prípravu tejto reagentie, kým tento postup nedosiahnete.

2. Nasledujúci program HYB uložte na tepelný cyklovač pomocou príslušného počtu cyklov, ktoré sú uvedené v [Tabuľka 3](#).

- Vyberte voliteľnú funkciu veka predhrievania a nastavte na 100 °C.
- Nastavenie reakčného objemu
 - [Vysokokvalitná gDNA] 100 µl
 - [gDNA extrahovaná z FFPE] 25 µl
- 98 °C, 5 minút
- Cykly X po 1 minúte, počnúc 98 °C pre prvý cyklus, potom znižovať o 2 °C na cyklus
- Držte 90 minút pri príslušnej teplote:
 - [gDNA extrahovaná z FFPE] 58 °C
 - [80-merové panely sond] 58 °C
 - [Volanie somatických variantov] 58 °C
 - [Všetky ostatné] 62 °C

Celkový čas prevádzky je ~115 minút.

Tabuľka 3 Číslo cyklu na vzorku alebo panel

Typ vzorky a panela	Počet cyklov (X)
gDNA extrahovaná z FFPE (bez ohľadu na typ panela)	20
80-merové panely sond (bez ohľadu na typ vzorky)	20
Volanie somatických variantov	20
Všetky ostatné vzorky a panely	18

Postup

1. [Vysoká kvalita gDNA] Pridajte nasledujúce reagenty v *poradí uvedenom* do každej združenej knižnice na doštičke PCR.
Nevytvárajte hlavnú zmes. Vytvorenie mastermixu NHB2 a EHB2 negatívne ovplyvňuje obohacujúci výkon.
 - NHB2 (modrý uzáver) (50 µl)
 - Panel obohacujúcej sondy (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. [Vysokokvalitná gDNA] Pomocou pipety nastavenej na 90 µl pipetou premiešajte každú jamku 10-krát.
3. [gDNA extrahovaná z FFPE] Pridajte nasledujúce reagenty v *poradí uvedenom* do každej združenej knižnice na doštičke PCR.
Nevytvárajte hlavnú zmes. Vytvorenie mastermixu NHB2 a EHB2 negatívne ovplyvňuje obohacujúci výkon.
 - NHB2 (modrý uzáver) (12,5 µl)
 - Panel obohacujúcej sondy (2,5 µl)

- EHB2 (2,5 µl)
4. [gDNA extrahovaná z FFPE] Pomocou pipety nastavenej na 20 µl napipetujte každú jamku 10-krát, aby sa premiešala.
 5. Doštičku utesnite a odstredujte pri 280 × g počas 10 sekúnd.
 6. Položte doštičku na vzorky na vopred naprogramovaný tepelný cyklovač a spustite program HYB.
 7. Po skončení programu HYB čas udržiavania teploty okamžite prejdite na ďalší postup.



UPOZORNENIE

Ak teplota hybridizačnej reakcie klesne pod izbovú teplotu, dôjde k precipitácii.

Zachytenie hybridizovaných sond

V tomto kroku sa používa Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) na zachytenie sond hybridizovaných na ciele oblasti záujmu.

Spotrebný materiál

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (žltý uzáver)
- EE1 (Obohatený elučný pufer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5 ml mikrocetrifugačná skúmavka
- 96-jamková platnička MIDI
- 96-jamková PCR platnička
- Lepiace tesnenie
- Magnetický stojan na platničky MIDI
- Pripravte sa na neskorší postup:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Informácie o reagensiach

- EEW
 - Pred predhriatím v inkubátore na mikrovzorky sa uistite, že ste EEW rozmrazili pri izbovej teplote najmenej 2 hodiny.
 - Pred ukončením programu HYB sa uistite, že ste EEW 30 minút ohrievali v inkubátore na mikrovzorky.

- Keď sa EEW nepoužíva, ponechajte ho v inkubátore na mikrovzorky. EEW má ostať zohriaty počas celého protokolu.
- Po dosiahnutí izbovej teploty môže byť zakalený.
- Môže mať žlté sfarbenie.
- SMB3
 - SMB3 musí mať pred použitím izbovú teplotu.

Príprava

1. Pripravte nasledujúci spotrebný materiál.

Položka	Skladovanie	Pokyny
SMB3	2 °C až 8 °C	Nechajte odstáť 2 hodiny, aby sa dosiahla izbová teplota. Prevráťte a potom premiešajte, kým sa úplne nerozpustí.
EEW (žltá skúmavka)	-25 °C až -15 °C	Po inkubácii pri izbovej teplote počas 2 hodín ho 30 minút predhrejte v inkubátore na mikrovzorky na vhodnú teplotu hybridizácie a zachytenia pred ukončením programu HYB.
EE1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte pri izbovej teplote, a potom premiešajte.
HP3	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte pri izbovej teplote, a potom premiešajte.
ET2	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou. Vírením premiešajte.
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte na ľade jednu hodinu. Prevrátením premiešajte, a potom krátko odstred'te. Nechajte odstáť na ľade.
PPC	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte na ľade jednu hodinu. Premiešajte, a potom krátko odstred'te. Nechajte odstáť na ľade.

2. Predhrejte jeden inkubátor na mikrovzorky pomocou vkladacieho ohrievacieho bloku MIDI, aby sa inkubovala platnička so vzorkami na jednu z uvedených teplôt. Na predhriatie EEW sa môže použiť voliteľný druhý inkubátor na mikrovzorky. Ponechajte EEW na vrchu vkladacieho ohrievacieho bloku MIDI.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer na panely sond] 58 °C
 - [Volanie somatických variantov] 58 °C
 - [Všetky ostatné] 62 °C

Postup

Zaznamenať

1. Pridajte SMB3 do príslušnej jamky novej platničky MIDI takto.
 - [Vysokokvalitná gDNA] Pridajte 250 µl SMB3.

- [gDNA extrahovaná z FFPE] Pridajte 62,5 µl SMB3.
2. Pomocou pipety nastavenej na 100 µl pre vysokokvalitnú gDNA alebo 25 µl pre FFPE preneste každú združenú knižnicu z 96-jamkovej PCR platničky do príslušnej jamky novej platničky MIDI.
 3. Platničku zaplombujte a nechajte pretrepať 4 minúty pri 1 200 ot./min.
 4. Ak dôjde k rozstrekovaniu, platničku rýchlo odstred'te.
 5. Položte platničku so združenými knižnicami na vložku tepelného bloku MIDI na inkubátor s mikrovzorkou, pod skúmavku EEW, zatvorte veko a potom inkubujte 15 minút pri príslušnej teplote:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer panel sondy] 58 °C
 - [Volanie somatických variantov] 58 °C
 - [Všetky ostatné] 62 °C
 6. Vyberte platničku so združenými knižnicami a 30 sekúnd ju odstred'ujte pri 280 × g.
 7. Okamžite položte na magnetický stojan platničky MIDI a počkajte, kým sa tekutina nevyčistí (2 minúty).
 8. [Vysokokvalitná gDNA] Pomocou pipety nastavenej na 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky. Dbajte nato, aby ste pritom nepoškodili obal guľôčok.
 9. [gDNA extrahovaná z FFPE] Pomocou pipety nastavenej na 90 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky. Dbajte nato, aby ste pritom nepoškodili obal guľôčok.
 10. Odstráňte a zlikvidujte všetok zvyškový supernatant.

Premývanie

1. Odstráňte z magnetického stojana.
2. [Vysoká kvalita gDNA] Rýchlo odstráňte EEW z inkubátora na mikrovzorku a do každej jamky pridajte 200 µl.
3. [gDNA extrahovaná z FFPE] Rýchlo odstráňte EEW z inkubátora na mikrovzorku a do každej jamky pridajte 50 µl.
4. Nepoužitú EEW vráťte do inkubátora s mikrovzorkou a udržiujte zahriate.
5. Utesnite a traste rýchlosťou 1800 ot./min. počas 4 minút.
6. Položte platničku so vzorkou na vložku MIDI tepelného bloku v inkubátore na mikrovzorku, pod EEW skúmavku, zatvorte veko a potom inkubujte 5 minút pri príslušnej teplote:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-merové panely sond] 58 °C
 - [Volanie somatických variantov] 58 °C
 - [Všetky ostatné panely] 62 °C
7. Okamžite položte na magnetický stojan platničky MIDI a počkajte, kým sa tekutina nevyčistí (2 minúty).

8. Pomocou pipety nastavenej na 200 µl pre vysokokvalitnú gDNA alebo 50 µl pre FFPE odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.
9. Kroky 1 – 8 zopakujte dvakrát pre celkovo tri premývania.

Prenos premývacieho roztoku

1. Odstráňte z magnetického stojana.
2. **[Vysokokvalitná gDNA]** Rýchlo odstráňte EEW z inkubátora na mikrovzorku a do každej jamky pridajte 200 µl.
3. **[gDNA extrahovaná z FFPE]** Rýchlo odstráňte EEW z inkubátora na mikrovzorku a do každej jamky pridajte 50 µl.
4. Utesnite a traste rýchlosťou 1800 ot./min. počas 4 minút. Ak dôjde k rozstrekovaniu, znížte otáčky na 1 600 ot./min.
5. Preneste resuspendovaný roztok guľôčok na novú platničku MIDI.
Niektoré vzorky môžu zostať v jamkách.



UPOZORNENIE

Prenos reagencie minimalizuje prenos zvyškových reagensov, ktoré môžu inhibovať následné PCR.

6. Položte platničku so vzorkou na vložku MIDI tepelného bloku na inkubátor pre mikrovzorky, zatvorte veko, a potom inkubujte 5 minút pri príslušnej teplote:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-merové panely sond] 58 °C
 - [Vovanie somatických variantov] 58 °C
 - [Všetky ostatné] 62 °C
7. Okamžite položte na magnetický stojan platničky MIDI a počkajte, kým sa tekutina nevyčistí (2 minúty).
8. Pomocou pipety nastavenej na 200 µl pre vysoko kvalitnú gDNA alebo 50 µl pre FFPE odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.
9. Odstred'ujte platničku rýchlosťou 280 × g 30 sekúnd.
10. Umiestnite na magnetický stojan MIDI platničky na 10 sekúnd.
11. Pomocou 20 µl pipety odstráňte a zlikvidujte zvyškovú kvapalinu z každej jamky.
12. Okamžite prejdite na položku [Elúcia na strane 43](#) aby ste zabránili nadmernému vysušeniu guľôčok a strate výťažnosti knižnice.

Elúcia

1. Kombinujte nasledujúce objemy na prípravu zmesi hlavnej elučnej zmesi. Vynásobte každý objem počtom združených knižníc, ktoré sa spracúvajú.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Dodatočný prebytok reagentie je zahrnutý v objeme.
2. Vírte a potom krátko odstred'te.
3. Vytiahnite platničku MIDI z magnetického stojana.
4. Do každej jamky pridajte 23 µl hlavnej elučnej zmesi.
5. Doštičku utesnite a 2 minúty pretrepávajte rýchlosťou 1 800 ot./min.
6. Platničku inkubujte pri izbovej teplote 2 minúty.
7. Odstred'ujte počas 30 sekúnd pri 280 × g.
8. Položte na magnetický stojan platničky MIDI a počkajte, kým sa tekutina nevyčistí (2 minúty).
9. Preneste 21 µl supernatantu z platničky MIDI do príslušnej jamky novej platničky PCR s 96 jamkami.
10. Platničku MIDI zlikvidujte.
11. Pridajte 4 µl ET2 do každej jamky obsahujúcej 21 µl supernatantu.
12. Pipetu nastavte na 20 µl a pomaly pipetujte každú jamku 10-krát, aby sa premiešala.
13. Platničku utesnite, a potom 10 sekúnd odstred'ujte rýchlosťou 280 × g.
14. Platničku inkubujte pri izbovej teplote 1 minútu.

Amplifikácia obohatenej knižnice

Tento krok používa PCR na amplifikáciu obohatenej knižnice.

Spotrebný materiál

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Lepiace tesnenie

Príprava

1. Pripravte nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri teplote 4 °C alebo na ľade jednu hodinu. Prevrátením premiešajte, a potom krátko odstred'te. Nechajte odstáť na ľade.
PPC	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte na ľade pri teplote 4 °C jednu hodinu. Premiešajte, a potom krátko odstred'te. Nechajte odstáť na ľade.

2. Uložte si nasledujúci AMP program v termálnom cykléri a použite správny počet cyklov PCR podľa uvedenej tabuľky.

- Vyberte voliteľnú funkciu veka predhrievania a nastavte na 100 °C.
- Nastavte reakčný objem na 50 µl.
- 98 °C 45 sekúnd
- (X) cyklov:
 - 98 °C 30 sekúnd
 - 60 °C 30 sekúnd
 - 72 °C 30 sekúnd
- 72 °C 5 minút
- Uchovávajte pri teplote 10 °C

Celkový čas prevádzky je ~35 minút.

Typ vzorky a panela	(X) cyklov
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) pre vysokokvalitnú gDNA	10
Illumina Exome Panel (CEX) pre FFPE	12
Všetky ostatné vzorky a panely	12 ¹²³⁴

¹ Pomocou následnej optimalizácie možno upraviť až 15 cyklov pre malé panely tretích strán. Ak používate FFPE, počet cyklov sa môže upraviť až do 17.

² Pre panely tretích strán, ktoré majú len 500 sond, sa môže upraviť až do 17 cyklov. Ak používate FFPE, počet cyklov sa môže upraviť až do 19.

³ Pre vzorky FFPE sa môže upraviť až do 14 cyklov.

⁴ Zvyšovanie počtu cyklov PCR môže spôsobiť vyššiu mieru duplikátov a fragmenty menšej veľkosti pri vzorkách FFPE.

Postup

1. Do PPC každej jamky pridajte 5 µl.

2. Do EPM každej jamky pridajte 20 µl.
3. Platničku utesnite a 1 minútu pretrepávajte pri 1200 ot./min.
4. Platničku odstreďujte v centrifúge 10 sekúnd pri 280 × g.
5. Umiestnite ju do predprogramovaného termálneho cykléra a spustite AMP program.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, skladujte v prostredí s teplotou 2 °C až 8 °C max. dva dni. Prípadne nechajte na tepelnom cyklovači až 24 hodín.

Vyčistenie amplifikovanej obohatenej knižnice

Tento krok slúži Cleanup Beads na čistenie obohatenej knižnice a odstránenie nechcených produktov.

Spotrebný materiál

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Čerstvo pripravený 80 % etanol (EtOH)
- Lepiace tesnenia
- 96-jamková platnička MIDI
- 96-jamková PCR platnička
- Magnetický stojan na platničky MIDI

Informácie o reagentoch

- Cleanup Beads
 - Pred každým použitím premiešajte.
 - Často premiešajte, aby ste sa uistili, že sú guľôčky rovnomerne rozložené.
 - Aspirujte a pomaly nadávkujte z dôvodu viskozity roztoku.

Príprava

1. Pripravte nasledujúci spotrebný materiál.

Položka	Skladovanie	Pokyny
CB	Izbová teplota	Miešajte a prevracajte, aby sa premiešala, až kým nebude farba kvapaliny homogénna.
RSB	2 °C až 8 °C	Preneste do prostredia s izbovou teplotou. Vírením premiešajte.

2. Pripravte čerstvý 80 % EtOH z absolútneho etanolu.

Postup

1. PCR platničku odstred'ujte 10 sekúnd pri 280 × g.
2. Miešajte CB 3-krát 10 sekúnd, a potom prevráťte.
3. Do každej jamky novej CB platničky **MIDI** pridajte **40,5** µl.
4. Preneste 45 µl z každej jamky PCR platničky do príslušnej jamky MIDI platničky.
5. Platničku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1800 ot./min.
6. Inkubujte MIDI platničku 5 minút pri izbovej teplote.
7. Odstred'ujte v centrifúge 10 sekúnd pri 280 × g.
8. Umiestnite ju na magnetický stojan na MIDI platničky a počkajte, kým nebude tekutina číra (5 minút).
9. Použitím pipety nastavenej na 95 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.
10. Dvakrát prepláchnite podľa nasledujúceho postupu.
 - a. Ponechajte platničku na magnetickom stojane a pridajte 200 µl čerstvého 80 % EtOH bez miešania.
 - b. Inkubujte 30 sekúnd.
 - c. Odstráňte a zlikvidujte supernatant, pričom dávajte pozor, aby ste nepoškodili guľôčky.
11. Sušte 5 minút vzduchom na magnetickom stojane.
12. Počas sušenia vzduchom použite 20 µl pipetu na odstránenie a zlikvidovanie zvyškového EtOH z každej jamky.
13. Odstráňte doštičku z magnetického stojana a pridajte 32 µl RSB do každej jamky.
14. Platničku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1800 ot./min.
15. Inkubujte platničku 5 minút pri izbovej teplote.
16. Odstred'ujte v centrifúge 10 sekúnd pri 280 × g.
17. Umiestnite ju na magnetický stojan na MIDI platničky a počkajte, kým nebude tekutina číra (2 minúty).
18. Preneste 30 µl supernatantu z 96-jamkovej MIDI platničky do príslušnej jamky novej PCR platničky.
19. Platničku MIDI zlikvidujte.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak zastavujete, uzavrite platničku a skladujte ju v prostredí s teplotou -25 °C až -15 °C max. 7 dní.

Skontrolujte obohatené knižnice

Na kvantifikáciu vstupu dvojláknovej gDNA použite fluorescenčnú metódu, ktorá používa interkalačné farbivo. Vyhňte sa metódam, ktoré merajú celkový počet nukleových kyselín, ako je NanoDrop alebo iné metódy absorpcie UV žiarenia.

1. Pomocou kvantifikačnej metódy spustíte 1 µl obohatených knižníc.

POZNÁMKA Celková molarita sond odporúča ovplyvňuje výťažok knižnice po obohatení.

Možno očakávať priemernú veľkosť fragmentu v rozmedzí 125 až 235 bp a distribúciu DNA fragmentov s rozpätím veľkostí od ~200 bp do ~1 000 bp.

Riediť knižnice na východiskovú koncentráciu

Tento krok riedi knižnice na počiatočnú koncentráciu sekvenčného systému a je prvým krokom v sériovom riedení. Po zriedení na počiatočnú koncentráciu sú knižnice pripravené na denaturáciu a zriedenie na konečnú koncentráciu náplne.

Na sekvenovanie, bez ohľadu na panel obohacujúcej sondy, ktorý používate, Illumina odporúča nastaviť cyklus spárovaného konca so 151 cyklami na čítanie (2 × 151) a 10 cyklami na čítanie indexu. Ak chcete menej prekrývajúcich sa čítaní alebo menej nespracované krytie, môžete sekvenovať až 2 × 126 alebo 2 × 101.

- Vypočítajte hodnotu molarity knižnice alebo združených knižníc pomocou nasledujúceho vzorca.
 - V prípade knižníc kvalifikovaných na analyzátor fragmentov DNA použite priemernú veľkosť získanú pre knižnicu.
 - Pre všetky ostatné kvalifikačné metódy použite ako priemernú veľkosť knižnice 350 bp.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{priemerná veľkosť knižnice (bp)}} = \text{Molarita (nM)}$$

Napríklad, ak je vaša koncentrácia v knižnici 20 ng/μl a priemerná veľkosť je 350 bp, výsledná hodnota molarity je 86,58 nM.

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

- Pomocou hodnoty molarity vypočítajte objemy RSB a knižnicu potrebné na zriedenie knižníc na počiatočnú koncentráciu v systéme .

Sekvenčný systém	Minimálny požadovaný objem knižnice (μl)	Počiatočná koncentrácia (nM)	Konečná koncentrácia nanášania (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) alebo 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM je počiatočná koncentrácia pre konečnú koncentráciu zaťaženia 350 pM. V prípade potreby upravte konečnú koncentráciu vloženia pomocou nasledujúcej tabuľky.

Konečná koncentrácia nanášania (pM)	Koncentrácia združenej knižnice (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50

Konečná koncentrácia nanášania (pM)	Koncentrácia združenej knižnice (nM)
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Zried'te knižnice pomocou RSB:

- **Knižnice kvantifikované ako multiplexná skupina knižníc** – zried'te skupinu na počiatočnú koncentráciu pre svoj systém.
- **Knižnice kvantifikované individuálne** – zried'te každú knižnicu na počiatočnú koncentráciu pre svoj systém. Pridajte 10 µl každej zriedenej knižnice do skúmavky a vytvorte skupinu multiplexných knižníc .

4. Postupujte podľa pokynov na denaturáciu a riedenie, aby sa systém zriedil na konečnú koncentráciu náplne.

- Pre systém NextSeq 550Dx si pozrite časť [Príprava sekvenovania v prístroji NextSeq 550Dx na strane 50](#).
- Informácie o systéme MiSeqDx nájdete v časti [Príprava sekvenovania v prístroji MiSeqDx na strane 52](#).
- Pre systém NovaSeq 6000Dx si pozrite časť [Príprava sekvenovania v prístroji NovaSeq 6000Dx na strane 53](#).

Konečné koncentrácie zaťaženia sú východiskovým bodom a všeobecnou smernicou. Optimalizujte koncentrácie pre svoj pracovný postup a metódu kvantifikácie počas následných sekvenčných cyklov alebo pomocou titrácie prietokovej kyvety.

Príprava sekvenovania v prístroji NextSeq 550Dx

Na sekvenovanie v sekvenčnom systéme NextSeq 550Dx použite nasledujúce pokyny na denaturáciu a riedenie knižníc.

Spotrebný materiál

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

Príprava

Prípravte si *čerstvý* roztok 0,2 N NaOH na denaturáciu knižníc na sekvenovanie. Extra objem je pripravený tak, aby sa zabránilo malým chybám pri pipetovaní, ktoré ovplyvnia konečnú koncentráciu NaOH.

**UPOZORNENIE**

Čerstvo zriedený 0,2 N NaOH je nevyhnutný pre proces denaturácie. Nesprávna denaturácia môže znížiť výťažnosť.

1. Pripravte nasledujúci spotrebný materiál.

Položka	Skladovanie	Pokyny
HT1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote. Uchovávajte pri teplote 2 °C až 8 °C, kým nebudete pripravení na riedenie denaturovaných knižníc.

2. Skombinujte nasledujúce objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke, aby ste pripravili nové riedenie NaOH:

- Laboratórna voda (800 µl)
- 1N NaOH (200 µl)

Výsledkom je 1 ml 0,2 N NaOH.

3. Skúmavku niekoľkokrát prevráťte a premiešajte.

4. Skombinujte nasledujúce objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke na prípravu 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

- Laboratórna voda (800 µl)
- 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

Výsledkom je 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

POZNÁMKA Skúmavku uchovávajte uzatvorenú. Čerstvé riedenie použite do **12 hodín**.

Denaturovať knižnice

1. Skombinujte nasledujúce objemy knižnice a čerstvo zriedené 0,2 N NaOH v mikrocentrifúgovej skúmavke.

- 10 µl knižnica
- 10 µl 0,2 N NaOH

2. Krátko vortexujte a potom odstred'ujte 1 minútu v centrifúge pri 280 × g.

3. Inkubujte pri izbovej teplote 5 minút.

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

Riediť denaturované knižnice na 20 pM

1. Pridajte 970 µl predchladenie HT1 do skúmavky denaturovaných knižníc.

Výsledkom je denaturovaná knižnica 20 pM.

2. Krátko vortexujte a potom odstred'ujte 1 minútu v centrifúge pri 280 × g.

3. Knižnice s 20 pM umiestňujte na ľad, kým nebudete pripravení prejsť na finálne riedenie.

Riediť knižnice na koncentráciu nanášania

1. Pridajte nasledujúce objemy na zriedenie denaturovaného roztoku knižnice 20 pM na 1,2 pM.
 - Denaturovaný roztok knižnice (78 µl)
 - Predchladený HT1 (1 222 µl)
 Celkový objem je 1,3 ml pri 1,2 pM.
2. Premiešajte a potom odstredujte pulzom.
3. Pokračujte sekvenovaním. Pokyny nájdete v *referenčnej príručke k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)* a v *príručke pre používateľa k aplikácii NextSeq 550Dx pre Local Run Manager pre generovanie DNA FASTQ Dx (dokument č. 200015671)* alebo v *príručke pre používateľa k systému DRAGEN pre Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pre aplikáciu NextSeq 550Dx (dokument č. 200025238)*.

Príprava sekvenovania v prístroji MiSeqDx

Na sekvenovanie v sekvenčnom systéme MiSeqDx použite nasledujúce pokyny na denaturáciu a riedenie knižníc.

Spotrebný materiál

- HT1 (Hybridizačný pufer)
- 1N NaOH

Príprava

Prípravte si *čerstvý* roztok 0,2 N NaOH na denaturáciu knižníc na sekvenovanie. Extra objem je pripravený tak, aby sa zabránilo malým chybám pri pipetovaní, ktoré ovplyvnia konečnú koncentráciu NaOH.



UPOZORNENIE

Čerstvo zriedený 0,2 N NaOH je nevyhnutný pre proces denaturácie. Nesprávna denaturácia môže znížiť výťažnosť.

1. Pripravte nasledujúci spotrebný materiál.

Položka	Skladovanie	Pokyny
HT1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte pri izbovej teplote. Uchovávajte pri teplote 2 °C až 8 °C, kým nebudete pripravení na riedenie denaturovaných knižníc.

2. Skombinujte nasledujúce objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke, aby ste pripravili nové riedenie NaOH:
 - Laboratórna voda (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)
 Výsledkom je 1 ml 0,2 N NaOH.

POZNÁMKA Skúmavku uchovávajte uzatvorenú. Čerstvé riedenie použite do **12 hodín**.

Denaturácia 4 nM knižnice

- Zmiešajte nasledovné objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke.
 - 4 nM knižnica (5 µl)
 - 0,2 N NaOH (5 µl)
- Krátko vortexujte a potom odstred'ujte 1 minútu v centrifúge pri 280 × g.
- Inkubujte pri izbovej teplote 5 minút.
- Pridajte 990 µl predchladenie HT1 do skúmavky denaturovaných knižníc. Výsledkom je 1 ml 20 pM denaturovaná knižnica.

Riediť denaturované 20 pM knižnice

- Zriedte na požadovanú koncentráciu pomocou nasledujúcich objemov.

Koncentrácia	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Knižnica 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Predchladený HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

- Premiešajte a potom odstred'ujte pulzom.
- Pokračujte sekvenovaním. Pokyny nájdete v časti *Referenčná príručka k nástroju MiSeqDx pre systém MOS v4 (dokument č. 1000000157953)* a v *príručke pracovného postupu Local Run Manager pre MiSeqDx generovania DNA pre systém FASTQ Dx (dokument č. 200015661)*.

Príprava sekvenovania v prístroji NovaSeq 6000Dx

Na sekvenovanie na sekvenovacom systéme NovaSeq 6000Dx použite nasledujúce pokyny na denaturáciu a riedenie knižníc.

Spotrebný materiál

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

Príprava

Pripravte si *čerstvý* roztok 0,2 N NaOH na denaturáciu knižníc na sekvenovanie. Extra objem je pripravený tak, aby sa zabránilo malým chybám pri pipetovaní, ktoré ovplyvnia konečnú koncentráciu NaOH.



UPOZORNENIE

Čerstvo zriedený 0,2 N NaOH je nevyhnutný pre proces denaturácie. Nesprávna denaturácia môže znížiť výťažnosť.

1. Skombinujte nasledujúce objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke, aby ste zriedili 1N NaOH na 0,2N NaOH:

Tabuľka 4 Režim S2

Reagencia	Objem pre jednu prietokovú bunku (µl)	Objem pre dve prietokové bunky (µl)
Laboratórna voda	40	80
Zásoby 1N NaOH	10	20

Výsledkom týchto objemov je 50 µl 0,2 N NaOH pre jednu prietokovú kyvetu alebo 100 µl 0,2 N NaOH pre dve prietokové bunky.

Tabuľka 5 Režim S4

Reagencia	Objem pre jednu prietokovú bunku (µl)	Objem pre dve prietokové bunky (µl)
Laboratórna voda	80	160
Zásoby 1N NaOH	20	40

Výsledkom týchto objemov je 100 µl 0,2 N NaOH pre jednu prietokovú kyvetu alebo 200 µl 0,2 N NaOH pre dve prietokové kyvety.

2. Niekoľkokrát premiešajte alebo dôkladne rozvίrte.
3. Skombinujte nasledujúce objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke na prípravu 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.
 - Laboratórna voda (600 µl)
 - 1M Tris-HCl, pH 8,0 (400 µl)

Výsledkom je 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0

POZNÁMKA Skúmavku uchovávajte uzatvorenú. Čerstvé riedenie použite do **12 hodín**.

Vytvorenie normalizovaného súboru knižníc

Koncentrácia nanášania sa môže líšiť v závislosti od metód prípravy, kvantifikácie a normalizácie knižnice.

Podľa nasledujúcich pokynov normalizujte knižnice na vhodnú koncentráciu, a potom ich združte. Knižnice sekvenované na rovnakej prietokovej kyvete sa musia skombinovať do jedného normalizovaného súboru.

POZNÁMKA Maximálny počet vzoriek, ktoré možno spustiť v jednej dráhe s Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, je 192. Toto obmedzenie vyplýva z celkového počtu UD indexov v súboroch A a B.

Normalizácia knižníc na združovanie

- Stanovte požadovanú koncentráciu združenej knižnice na základe požadovanej konečnej koncentrácie nanášania.
 - Pre konečnú koncentráciu načítania 350 pM je požadovaná koncentrácia združenej knižnice 1,75 nM.
 - Ak chcete určiť koncentráciu združenej knižnice pre inú konečnú koncentráciu vloženia, pozrite si časť [Riediť knižnice na východiskovú koncentráciu na strane 49](#).
- Normalizujte knižnice na požadovanú koncentráciu v združenej knižnici pomocou 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Pomoc pri riedení knižníc na vhodnú koncentráciu nájdete v časti [Kalkulátor združovania](#) na webovej stránke Illumina.

Odporúčané koncentrácie nanášania

Optimálna koncentrácia nanášania DNA závisí od typu knižnice a veľkosti vložky. V prípade knižníc s frekvenciou > 450 bp môže byť potrebné zvýšiť koncentrácie náplne.

Združovanie normalizovaných knižníc a pridanie voliteľnej kontroly pomocou PhiX

- Zmiešajte primeraný objem každej normalizovanej knižnice v novej mikrocentrifugačnej skúmavke, aby ste získali jeden z nasledujúcich konečných objemov:

Režim	Konečný objem (µl)
S2	150
S4	310

- [Voliteľné]** Pridajte 1 % nedenaturovanej PhiX > podľa nasledujúcich pokynov.
 - Rozriedte 10 nM PhiX na 2,5 nM použitím 10 mM Tris-HCl s pH 8,5.
 - Pridajte primeraný objem nedenaturovanej 2,5 nM PhiX do skúmavky z nedenaturovaného súboru knižníc.

Režim	Nedenaturovaná 2,5 nM PhiX (µl)	Nedenaturovaný súbor knižníc (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Keď sa pridáva PhiX, odporúčané množstvo pre dobre vyvážené knižnice je 1 %. Knižnice s nízkou diverzitou môžu vyžadovať väčšie množstvo. Ak chcete použiť kontrolu PhiX pri knižniciach s nízkou diverzitou, kontaktujte technickú podporu spoločnosti Illumina, ktorá vám poradí.

Združovanie denaturovaných knižníc a voliteľná kontrola pomocou PhiX

1. Pridajte 0,2 N NaOH do skúmavky nedenaturovanej knižnice a voliteľnej PhiX nasledujúcim spôsobom.

Prietokový článok	0,2 N NaOH	Nedenaturovaný súbor knižníc (µl)	Výsledný objem
S2	37	150	187 µl alebo 187,9 µl s PhiX
S4	77	310	387 µl alebo 388,9 µl s PhiX

2. Uzavrite a potom krátko premiešajte.
 3. Platničku odstreďujte 1 minútu s otáčkami 280 × g.
 4. Inkubujte pri izbovej teplote 8 minút, aby došlo k denaturácii.
 5. Na neutralizáciu pridajte 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 nasledujúcim spôsobom.

Režim	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Výsledný objem
S2	38	225 µl alebo 225,9 µl s PhiX
S4	78	465 µl alebo 466,9 µl s PhiX

6. Uzavrite a potom krátko premiešajte.
 7. Platničku odstreďujte 1 minútu s otáčkami 280 × g.
 8. Preneste celý objem denaturovanej knižnice alebo denaturovanej knižnice a PhiX do skúmavky knižnice NovaSeq 6000Dx.
 9. Pokračujte sekvenovaním. Pokyny nájdete v *dokumentácii k prístroju NovaSeq 6000Dx (dokument č. 200010105)* a v *dokumentácii DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx for NovaSeq 6000Dx (dokument č. 200014776)*.

Riešenie problémov

Pomocou nasledujúcej tabuľky sa môžete pokúsiť vyriešiť prípadné problémy v rámci pracovného postupu. Ak cyklus sekvenovania alebo príprava knižnice na vzorku dvakrát zlyhá, môžu sa vyžadovať ďalšie opatrenia na riešenie problémov. Obráťte sa na technickú podporu spoločnosti Illumina.

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Chod sekvenovania nevyhovuje kontrole kvality Špecifikácie	Chyba používateľa alebo laboratórneho vybavenia v rámci pracovného postupu analýzy	<p>Kvalifikujte obohatené knižnice, aby ste zabezpečili primeranú výťažnosť a distribúciu veľkosti fragmentov. Opakujte prípravu knižnice počnúc niektorým z nasledujúcich krokov v závislosti od toho, kde sa daná chyba použitia alebo laboratórneho vybavenia vyskytla. Ak dôjde k výskytu neznámej alebo inej chyby, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina a požiadajte o vyriešenie daného problému.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Knižnice na opakované sekvenovanie. Pozrite si časť Príprava sekvenovania v prístroji NextSeq 550Dx na strane 50, Príprava sekvenovania v prístroji MiSeqDx na strane 52 alebo Príprava sekvenovania v prístroji NovaSeq 6000Dx na strane 53. • Obohaťte knižnice. Pozrite si časť Hybridizácia sond na strane 37. • Spustite prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Pozrite si Návod na použitie na strane 21.
	Problém s prístrojom	Obráťte sa na technickú podporu spoločnosti Illumina.
Chyba s generovaním FASTQ alebo všeobecná chyba systému na sekvenovanie (napríklad sieťová chyba, chyb počas vkladania a vykladania reagensí ap.)	Problém so softvérom alebo prístrojom	<p>Pomoc pri analýze nájdete v príručke k modulu alebo aplikácii, prípadne v <i>Referenčná príručka k prístroju NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)</i>, <i>Referenčná príručka k nástroju MiSeqDx pre systém MOS v4 (dokument č. 1000000157953)</i> alebo v <i>dokumentácii k prístroju NovaSeq 6000Dx (dokument č. 200010105)</i>.</p> <p>Požiadajte o pomoc oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.</p>

Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Knižnica DNA negeneruje dostatočnú výťažnosť na sekvenovanie načítania	Požiadavky na vstup/zadanie vzorky neboli splnené	Zabezpečte vhodný vstup vzorky a zopakujte prípravu knižnice. Pozrite si Odporúčania pre vstup vzorky na strane 18 .
	Chyba používania alebo vybavenia v rámci pracovného postupu analýzy	Opakujte prípravu knižnice počnúc niektorým z nasledujúcich krokov v závislosti od toho, kde sa daná chyba použitia alebo laboratórneho vybavenia vyskytla. Ak dôjde k výskytu neznámej alebo inej chyby, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina a požiadajte o vyriešenie daného problému. <ul style="list-style-type: none"> • Knižnice na opakované sekvenovanie. Pozrite si časť Príprava sekvenovania v prístroji NextSeq 550Dx na strane 50, Príprava sekvenovania v prístroji MiSeqDx na strane 52 alebo Príprava sekvenovania v prístroji NovaSeq 6000Dx na strane 53. • Obohaťte knižnice. Pozrite si časť Hybridizácia sond na strane 37. • Spustite prípravu knižnice od začiatku pracovného postupu. Pozrite si Návod na použitie na strane 21.
	Neboli splnené požiadavky na panel obohacujúcej sondy	Zabezpečte vhodný panel obohacujúcej sondy a zopakujte prípravu knižnice. Pozrite si časť Požiadavky na panel obohacovacej sondy na strane 10 .

Výkonnostné charakteristiky

Výkon s panelmi s úplným exómom

Výkonnosť exómového panela sa testovala použitím najnižšieho (50 ng) a najvyššieho (1 000 ng) odporúčaného vstupu Coriell Cell Line gDNA NA12878 so známou pravdivou súpravou na detekciu zárodočných variantov (genóm Coriell platinum). Ako reprezentatívne panely bol použitý exómový panel 1 (45 Mb) a exómový panel 2 (36,8 Mb). 24 technických replikátov bolo testovaných testom Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pomocou exómového panelu 1 (45 Mb) v dvoch 12-násobných obohacujúcich reakciách. 12 technických replikátov bolo testovaných pomocou analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s použitím exómového panelu 2 (36,8 Mb) v jednej 12-násobnej obohacujúcej reakcii. Obohatené knižnice boli potom sekvenované na sekvenovacom systéme NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager (Správca lokálnych chodov).

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené priemerné hodnoty sekundárneho sekvenovania a metriky výkonnosti pri volaní variantov pre technické replikáty testované s každým panelom.

Tabuľka 6 Výkonnosť analýzy s dvoma panelmi s úplným exómom

Panel	Vyplnené jedinečné obohacovanie čítania	Rovnomernosť pokrytia	Medián dĺžky fragmentu	Vyvolanie SNV ¹	Presnosť SNV ²	Vyvolanie Indel ¹	Presnosť Indel ²
Panel exómu 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Panel exómu 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹ Vyvolať = pozitívne výsledky/(skutočné pozitívne výsledky + falošne negatívne výsledky)

² Presnosť = skutočné pozitívne výsledky/(skutočné pozitívne výsledky + falošne pozitívne výsledky)

Detekčný limit

Referenčný štandard DNA Horizon HD799 bol použitý na testovanie limitu detekcie. HD799 pozostáva zo stredne kompromitovanej formalínom oštrenej DNA so známymi SNV v alelických frekvenciách v rozsahu od 1 do 24,5 %. Bol použitý najnižší odporúčaný vstup DNA (50 ng) a bola vyhodnotená miera detekcie SNV s $\geq 5,0$ % variantnou frekvenciou alel (VAF). 16 echnických replikátov bolo testovaných pomocou analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pomocou pracovného postupu FFPE, obohatených panelom obohacovania panrakoviny (1,94 Mb) v 16 (1-plexových) obohateniach, a potom sekvenovaných na prístroji NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Všetky vzorky spĺňali požiadavky na výkonnosť vzoriek špecifické pre daný panel, ako je uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 7 Výkonnosť vzorky pre limit detekcie

Panel	Miera detekcie variantov SNV $\geq 5,0$ % VAF	Priemer Rovnomernosť pokrytia
Pan-nádorový obohacovací panel (1,94 Mb, 523 génov)	100 %	99 %

Interferujúce látky

Vplyv potenciálnych interferencií sa hodnotil v prístroji Illumina DNA Prep with Enrichment Dx posúdením výkonnosti analýzy v prítomnosti interferujúcich látok.

Interferencia v plnej krvi

Acetaminofén (exogénna zlúčenina, liečivo), kreatinín a triglyceridy (endogénne metabolity) sa testovali ich pridaním do vzoriek plnej ľudskej krvi pred extrakciou DNA. Na vyhodnotenie interferencie vyplývajúcej z odberu krvi (krátky odber) sa EDTA napipetovala aj do vzoriek plnej krvi. Okrem toho na vyhodnotenie

interferencie vyplývajúcej z prípravy vzorky bol do DNA extrahovanej z plnej krvi pridaný molekulárny etanol. Nasledujúca tabuľka uvádza testovacie koncentrácie pre interferenciu.

Tabuľka 8 Potenciálne interferujúce látky a koncentrácie testované v plnej krvi

Testovaná látka	Testovaná koncentrácia
Acetaminofén	15,6 mg/dl* Trikrát vyššia očakávaná koncentrácia po terapeutickej dávke lieku.
Kreatinín	15 mg/dl* Najvyššia pozorovaná koncentrácia v populácii.
Triglyceridy	1,5 g/dl* Najvyššia pozorovaná koncentrácia v populácii.
EDTA	6 mg/ml Trojnásobná koncentrácia očakávaná v krvi odobratá do skúmaviek EDTA.
Etanol triedy určenej pre molekulárnu biológiu	15 % obj./obj. V eluáte po extrakcii DNA.

* Podľa CLSI EP37-ED1:2018

Na interferujúcu látku sa pomocou analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testovalo 12 technických replikátov, ktoré boli obohatené o exómový panel 1 (45 Mb) v jedinom (12-plexovom) obohatení a potom boli sekvenované na prístroji NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Pri testovaných látkach všetkých 12 vzoriek splnilo požiadavky na výkon vzorky a nebolo pozorované žiadne rušenie výkonu analýzy.

Interferencia v tkanive FFPE

Dve kolorektálne FFPE vzorky sa testovali v prítomnosti a neprítomnosti hemoglobínu pri dávke 0,1 mg na 10 µm FFPE sekciu, čo predstavuje najhorší scenár kontaminácie 50 % FFPE vzorky tkaniva vysokou hladinou hemoglobínu krvou. Vzorky sa testovali pomocou analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s použitím pan-rakovinového obohacovacieho panela 1 (1,94 Mb) ako reprezentatívny panel v jednozložkových obohacovacích materiáloch. Obohatené knižnice boli potom sekvenované na prístroji NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx. Všetky vzorky spĺňali požiadavky na výkonnosť vzoriek a bolo preukázané, že hemoglobín neinterferuje s výkonom testu.

Na vyhodnotenie interferencie vyplývajúcej z prípravy vzorky boli do DNA extrahovanej zo vzorky tkaniva FFPE karcinómu močového mechúra pridané dve exogénne zlúčeniny. Testované exogénne látky sú extrakčné roztoky bežne používané počas procesu extrakcie DNA a sú uvedené s testovanými množstvami v nasledujúcej tabuľke.

Roztoky testovacích látok sú komerčne dostupné v kolónových izolačných súpravách DNA.

Tabuľka 9 Potenciálne interferujúce exogénne látky a koncentrácie testované vo FFPE

Testovaná látka	Testovaná koncentrácia ($\mu\text{l}/30 \mu\text{l}$ eluátu)
Deparafinizačný roztok	113×10^{-6}
Premývací pufer AW2	0,417

Na interferujúcu látku sa pomocou analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx testovalo osem technických replikátov, ktoré boli obohatené o pan-nádorový obohacovací panel (1,94 Mb) v jednoplexovom obohatení, a potom boli sekvenované na prístroji NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Pri obidvoch testovaných látkach všetkých osem vzoriek splnilo požiadavky na výkon vzorky a nebolo pozorované žiadne rušenie výkonu analýzy.

Krížová kontaminácia

Boli testované Coriell Cell Line gDNA NA12878 (ženská, 10 vzoriek), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (mužská, 12 vzoriek) a žiadne kontroly šablón (NTC, 2 vzorky) pomocou analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx v rozložení kontrolnej platničky. Všetky vzorky použili najvyššie odporúčanie vstupu gDNA (1 000 ng) ako najprísnejší stav na hodnotenie krížovej kontaminácie vzorky. Testovanie vykonali dvakrát dvaja samostatní operátori. Panel exómu 1 (45 Mb) sa použil pri 12-zložkových obohacovacích reakciách. Obohatené knižnice boli sekvenované na prístroji NextSeq 550Dx s aplikáciou DNA GenerateFASTQ Dx. Hodnotenie sa vykonalo vyhodnotením pokrytia chromozómu Y špecifického pre mužov vo vzorkách žien porovnaním so základnými úrovňami plnej platničky vzoriek žien, ako aj indexovým zastúpením vzoriek NTC.

Tabuľka 10 Výsledky krížovej kontaminácie

Vzorky žien s pokrytím samčím chrómozómom Y v < 3-násobnom východiskovom šume	Reprezentácia indexu v NTC
100 %	< 0,0005 %

Výkonnosť aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Výkonnostné charakteristiky aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pre prístroj NovaSeq 6000Dx sú uvedené v *príbalovom letáku k prístroju NovaSeq 6000Dx (dokument č. 200025276)*.

Aplikácia DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na prístroji NextSeq 550Dx poskytuje rovnaké pracovné postupy sekundárnej analýzy ako aplikácia na NovaSeq 6000Dx vrátane nasledujúcich troch pracovných postupov: generovania FASTQ, generovania FASTQ a VCF na detekciu zárodočných variantov a generovania FASTQ a VCF na somatickú detekciu variantov.

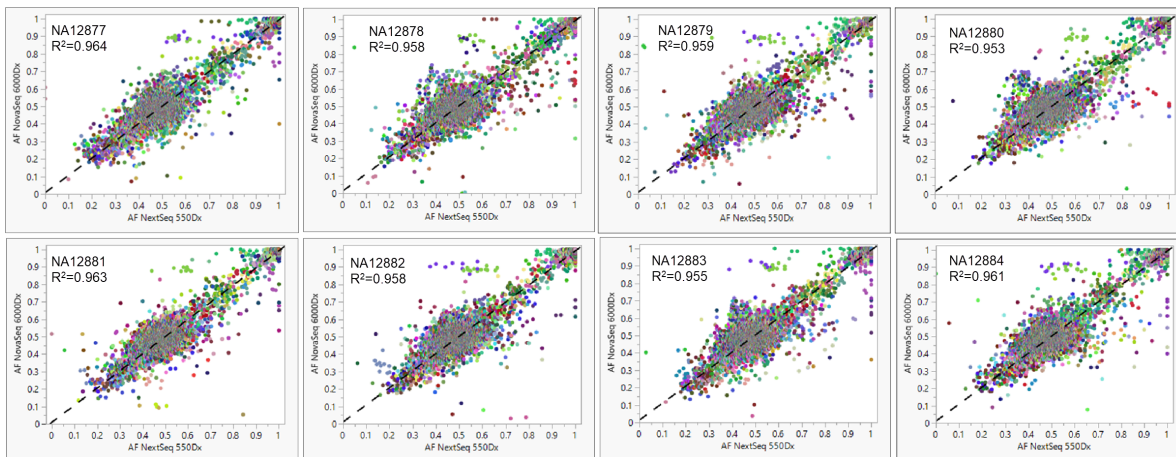
Porovnateľný výkon sekundárnej analýzy sa získal z rovnakej prípravy knižnice sekvenovanej na oboch platformách. Miera detekcie variantov ([Tabuľka 11](#)) a zhoda frekvencií ([Obrázok 1](#)) pre vzorky Coriell Cell Line gDNA sa hodnotili pomocou reprezentatívnej analýzy určenej na dopytovanie rôznych génov pokrývajúcich 1 970 505 báz (9 232 cieľov) na všetkých 23 ľudských chromozómoch. Testovalo sa osem vzoriek DNA Platinum Genome, sedem v opakovaní po šiestich (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) a jeden (NA12881) v opakovaní po piatich (pozrite si [Obrázok 1](#)). Knižnice boli sekvenované s tromi spracovaniami na prístrojoch NovaSeq 6000Dx a NextSeq 550Dx a volanie variantov bolo uskutočnené pomocou generovania FASTQ a VCF na pracovný postup analýzy zárodočných variantov aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Na základe silnej korelácie medzi výkonom aplikácie na prístrojoch NovaSeq 6000Dx a NextSeq 550Dx sú stanovené aj funkčné charakteristiky súvisiace so sekundárnou analýzou uvedenou v *príbalovom letáku prístroja NovaSeq 6000Dx (dokument č. 200025276)* ako použiteľné pre aplikáciu DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na NextSeq 550Dx.

Tabuľka 11 Výkonnosť aplikácie – rýchlosť detekcie variantov pre SNV, vloženie a odstránenie

Panel	Miera detekcie variantov na prístroji NovaSeq 6000Dx	Miera detekcie variantov na prístroji NextSeq 550Dx
Pan-genómový panel (1,97 Mb, 9 232 cieľov, 23 chr.)	99,9 %	99,9 %

Obrazok 1 Porovnanie frekvencie variantov pre prístroje NovaSeq 6000Dx a NextSeq 550Dx, na ktorých je spustená analýza pomocou aplikácie DRAGEN for IDPE Dx



Appendix: Sekvencie adaptérov indexov Illumina UD

Tieto jedinečné adaptéry s duálnym indexom (UD) sú na doštičke usporiadané tak, aby presadzovali odporúčanú stratégiu párovania. Indexové adaptéry majú dĺžku 10 báz namiesto typických ôsmich báz.

Adaptéry indexu 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Adaptéry indexu 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Nasledujúci postup sa používa pre orezanie adaptéra Read 1 a Read 2.

CTGTCTCTTATACATCT

Platnička A/indexové adaptéry súpravy 1

Názov indexu	Bázy i7 v adaptéri	Bázy i5 v adaptéri
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT

Názov indexu	Bázy i7 v adaptéri	Bázy i5 v adaptéri
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
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

Názov indexu	Bázy i7 v adaptéri	Bázy i5 v adaptéri
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACC GCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG

Názov indexu	Bázy i7 v adaptéri	Bázy i5 v adaptéri
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
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	GGTGG AATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Platnička B/indexové adaptéry sůpravy 2

Název indexu	Bázy i7 v adaptéri	Bázy i5 v adaptéri
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

Názov indexu	Bázy i7 v adaptéri	Bázy i5 v adaptéri
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	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCTG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCTTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA

Názov indexu	Bázy i7 v adaptéri	Bázy i5 v adaptéri
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	TGTTTCGATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA

Názov indexu	Bázy i7 v adaptéri	Bázy i5 v adaptéri
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACTION

História revízií

Dokument	Dátum	Popis zmeny
Dokument č. 200038118 v00	júl 2023	<p>Úvodné vydanie.</p> <p>Predchádzajúci dokument 200019584 nahradený týmto dokumentom.</p> <p>Zmeny z dokumentu 200019584 v2 v tomto novom dokumente:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pridaný obsah na podporu sekvenovania na prístroji NextSeq 550Dx pomocou softvéru DRAGEN pre Illumina DNA Prep s aplikáciou Enrichment Dx pre NextSeq 550Dx. • Zoznam objasnených reagentov nedodaných. • Pridané informácie o hlásení výskytu do varovaní a preventívnych opatrení. • Objasnené očakávania obohacujúcich knižníc. • Pridaný pokyn na prípravu 400 mM Tris-HCl, pH 8,0. • Odstránená typografická chyba kroku prípravy sekvenovania. <p>Zmeny vykonané v predchádzajúcom dokumente 200019584:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pridaný obsah na podporu sekvenovania na prístroji NovaSeq 6000Dx. • Pridané názvy sekvenovacích systémov a katalógové čísla. • Odstránené jedinečné informácie o duálnej indexácii knižníc s jedným indexom.

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. a jej pridružených spoločností (ďalej len „Illumina“) a sú určené výlučne na zmluvné použitie u zákazníka v súvislosti s používaním produktu (produktov) opísaného (opísaných) v tomto dokumente a na žiadny iný účel. Tento dokument a jeho obsah sa nesmú používať ani šíriť na žiadny iný účel a/alebo inak poskytovať, zverejňovať alebo reprodukovať akýmkoľvek spôsobom bez predchádzajúceho písomného súhlasu spoločnosti Illumina. Spoločnosť Illumina týmto dokumentom neposkytuje žiadnu licenciu na základe patentu, ochrannej známky, autorských práv alebo práv podľa zvykového práva, či podobných práv tretích strán.

Pokyny v tomto dokumente musia byť prísne a výslovne dodržiavané kvalifikovaným a riadne vyškoleným personálom, aby sa zabezpečilo správne a bezpečné používanie tu popísaného výrobku (výrobov). Pred použitím takéhoto výrobku (výrobov) je nutné prečítať si celý obsah tohto dokumentu s porozumením.

NEPREČÍTANIE VŠETKÝCH POKYNOV TU OBSIAHNUTÝCH A ICH VÝSLOVNÉ NEDODRŽANIE MÔŽE MAŤ ZA NÁSLEDOK POŠKODENIE VÝROBKU (VÝROBKOV), ZRANENIE OSOBY VRÁTANE POUŽÍVATEĽOV ALEBO INÝCH OSÔB, POŠKODENIE ĎALŠIEHO MAJETKU A ZRUŠENIE PLATNOSTI ZÁRUKY VZŤAHUJÚCEJ SA NA VÝROBKOV (VÝROBKOVY).

SPOLOČNOSŤ ILLUMINA NEPREBERÁ ŽIADNU ZODPOVEDNOSŤ VYPLÝVAJÚCU Z NEBEZPEČNÉHO POUŽITIA TU POPÍSANÉHO VÝROBKU (VÝROBKOV) (VRÁTANE SÚČASTÍ ALEBO SOFTVÉRU).

© 2023 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

Všetky ochranné známky sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. alebo príslušných vlastníkov. Informácie o konkrétnych ochranných známkach nájdete na stránke www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktné informácie



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (okrem Severnej Ameriky)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Austrálsky zadávateľ

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

Označenie produktu

Úplné informácie o symboloch, ktoré sa môžu nachádzať na obale a označení produktu, nájdete vo vysvetlivkách symbolov pre vašu súpravu na stránke support.illumina.com na karte *Documentation* (Dokumentácia).