

IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA  
CSAK EXPORTÁLÁSI CÉLRA

## Rendeltetés

Az Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit egy reagensekből és fogyóeszközökből álló készlet, amely emberi sejtekből és szövetekből származó genomikus DNS-ből mintakönyvtárak készítéséhez használatos. A vizsgálandó genomikus területeket megcélzó könyvtárak elkészítéséhez a felhasználónak kell biztosítania a megfelelő próbapaneleket. A létrehozott mintakönyvtárak az Illumina szekvenálási rendszereken való használatra szolgálnak.

## Az eljárás működési elve

Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit a célterületekben dúsított DNS-szekvenálási könyvtárak készítésére szolgál humán sejtekből és szövetekből származó genomiális DNS-ből.

A célpontok feldúsításához a felhasználó által biztosított biotinilált oligonukleotid-panelek szükségesek. Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit különböző méretű panelekkel kompatibilis, beleértve a kis paneleket (< 20 000 próba) és a nagy paneleket (> 200 000 próba). A létrehozott dúsított könyvtárak az Illumina szekvenálórendszereken történő szekvenálásra szolgálnak.

Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit eljárás a következő lépésekből áll:

- **Genomikus DNS „tagmentációja”** – A bemeneti DNS „tagmentációja” (egy lépésben végzett fragmentálás és jelölés) Enrichment BLT Small (eBLTS) használatával. A tagmentáció során a egyetlen lépésben megtörténik a gDNS fragmentálása és adapterekkel való megjelölése. A tagmentációs reakcióban az eBLTS telítéséhez legalább 50 ng DNS szükséges. Telített állapotban az eBLTS meghatározott számú DNS-molekulát fragmentál, és egységes fragmensméret-eloszlású, normalizált könyvtárakat hoz létre.
- **Tagmentáció utáni tisztítás** – Az eBLTS-en lévő, adapterrel jelölt DNS megtisztítása az amplifikációhoz való felhasználáshoz.
- **Tagmentáció utáni amplifikáció** – A tagmentált DNS amplifikációja korlátozott ciklusszámú PCR-programmal. A DNS-fragmentumok végéhez egyedi kétszeres (UD) indexeket csatolnak, amelyek lehetővé teszik a DNS-könyvtárak kétszeres, egyedi vonalkóddal ellátását és a szekvenálás során a klaszterek létrehozását.
- **Könyvtárak tisztítása** – Gyöngyökkel végzett tisztítási eljárás az amplifikált DNS-könyvtárak tisztítására és méret szerinti válogatására.
- **Könyvtárak összekeverése** – Egyedi indexekkel rendelkező DNS-könyvtárak összekeverése egy legfeljebb 12 könyvtárból álló keverékbe. A keverékkészítés végezhető térfogat vagy tömeg szerint.
- **Próbák hibridizálása** – Hibridizációs reakció, amelynek során a kettős szálú DNS-könyvtárakat denaturálják, és a biotinilált DNS-próbák egy paneljét hibridizálják a célzott genomikus régiókhoz.

- Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit számos dúsítási pannellel kompatibilis. Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nem tartalmaz dúsítópanelt. A próbapaneleket a felhasználó biztosítja, és azoknak meg kell felelniük bizonyos specifikációknak. Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reagensei kompatibilisek mind az Illumina, mind a harmadik fél által forgalmazott, a szükséges specifikációknak megfelelő DNS-dúsító oligonukleotid-panelekkel. A harmadik féltől származó panelek szükséges specifikációit lásd: [A dúsítópróba-panelekkel szembeni követelmények, 9. oldal](#).
- **Hibridizált próbák befogása** – Ebben a lépésben a vizsgált területekhez hibridizált próbák befogása történik streptavidinnel bevont mágneses gyöngyökkel (SMB3).
- **Dúsított könyvtárak amplifikálása** – A dúsított könyvtárak amplifikálása PCR-rel.
- **Amplifikált, dúsított könyvtárak tisztítása** – Gyöngyökkel végzett tisztítási eljárás a szekvenálásra kész, dúsított könyvtárak tisztítására.
- **Szekvenálás** – A feldúsított könyvtárak szekvenálása MiSeqDx, NextSeq 550Dx vagy NovaSeq 6000Dx szekvenálórendszereken történik. Az MiSeqDx és a NextSeq 550Dx esetén az integrált DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager modul a szekvenálási futtatás beállítására, a futtatás felügyeletére és az elsődleges elemzésre (FASTQ létrehozása a bázisazonosításokból) szolgál. A NovaSeq 6000Dx esetében a többféle munkafolyamatot tartalmazó DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás használatos a futtatás beállítására és a másodlagos elemzésre.

## Az eljárás korlátai

- *In vitro* diagnosztikai használatra.
- Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilis a humán sejtekből és szövetekből származó genomikus DNS-sel.
- Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilis az 50–1000 ng kettős szálú gDNS bevitelével. E határértékeken kívüli mennyiségek esetén a teljesítmény nem garantált.
- Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nem tartalmazza a DNS-extrakcióhoz szükséges reagenseket. A [Teljesítményjellemzők, 57. oldal](#) részben leírt analitikai vizsgálati eredmények, beleértve az interferenciavizsgálatot is, reprezentatív DNS-extrakciós készletekkel és reprezentatív mintatípusként teljes vérrel és FFPE mintával készültek. Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reagensekkel való használatra kifejlesztett diagnosztikai vizsgálatoknak a választott DNS-extrakciós készlettel nyújtott teljesítménye teljes körű validálást igényel.
- Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nem ajánlott rossz minőségű FFPE mintákhoz, amelyeknél  $\Delta Cq > 5$ . A  $\Delta Cq > 5$  értékű minták használata növelheti a könyvtárkészítés sikertelenségének esélyét, és csökkentheti a vizsgálat teljesítményét.
- Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reagenseket a következő táblázatban feltüntetett mintabemenethez, dúsítási reakciókhoz és plexitáshoz készítettük és teszteltük.

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Bevitt minta	Dúsítási reakciók	Dúsítás plexitása
16 mintához való készlet	Alacsony minőségű (FFPE)	16 reakció	1-plex
96 mintához való készlet	Kiváló minőségű (például teljes vér)	8 reakció	12-plex

- Az FFPE szövetből származó bevitt anyag feldolgozását megvizsgáltuk, és kizárólag 1-plex dúsítási reakcióval ajánljuk a 16 mintához való készlet használatával.
- A 96 mintához való készlet esetében alkalmazható nem szabványos plexitás (2-plex–11-plex közötti) is, azonban a következő korlátozásokkal:
  - A minták 2-plex–11-plex dúsítási reakciókkal való feldolgozása csökkenti a készlet kapacitását.
  - Nem garantálhatók az optimális eredmények. A nem szabványos plexitások megfelelő dúsítási hozamának eléréséhez további optimalizálás válhat szükségessé.
  - Az alacsony plexitású (2-plex–8-plex) összekeverési stratégiák esetében a sikeres szekvenálás és adatelemzés érdekében nagy diverzitású indexadapterek kiválasztása szükséges a színegyensúly optimalizálásához. A MiSeqDx és a NextSeq 550Dx készüléken futó DNS GenerateFASTQ Dx modul a futtatás beállítása során lehetőséget nyújt az indexkombinációk színiegyensúlyozására. A keverési stratégiákkal kapcsolatos további információkért lásd: [Keverékkészítési módszerek, 32. oldal](#).
- Az illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kizárólag az MiSeqDx, a NextSeq 550Dx és a NovaSeq 6000Dx készüléken történő szekvenálásra való dúsított könyvtárak készítésére szolgál. Más szekvenáló rendszerek használata teljes körű validálást igényel a teljesítmény minden szempontjából.
- A termék nem tartalmaz dúsítópaneleket. A [Teljesítményjellemzők, 57. oldal](#) részben megadott analitikai vizsgálati eredmények reprezentatív dúsítópanelekkel készültek, és csak tájékoztató jellegűek. Az analitikai teljesítményjellemzők a vizsgálat általános képességeinek szemléltetésére szolgálnak, nem pedig az egyes vizsgálatokkal kapcsolatos képességekre vagy alkalmasságra vonatkozó nyilatkozatként. Az ezekkel a reagensekkel történő használatra kifejlesztett valamennyi diagnosztikai teszt teljes körű validálást igényel teljesítmény minden szempontja tekintetében.
- Az illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilis mind az illumina, mind a harmadik fél által forgalmazott dúsítópanelekkel. A más gyártótól származó, a pannellel szembeni követelményeknek meg nem felelő dúsítópanelek esetén azonban nem garantálható a teljesítmény. A pannellel szembeni követelményeket lásd [A dúsítópróba-panelekkel szembeni követelmények, 9. oldal](#) című részben.
- Az illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit 2 órás hibridizációs idővel működik. A hosszabb hibridizációs idő alkalmazása hatással lehet a teljesítménymutatókra.
- A MiSeqDx és NextSeq 550Dx készülékhez való DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager modulok csak FASTQ fájlokat készítenek. Ha ezeket a modulokat használja, akkor el kell végeznie a másodlagos elemzés validálását.

- A DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás a NovaSeq 6000Dx készüléken végezhető el. Az alkalmazás több másodlagos elemzési munkafolyamatot támogat, így a FASTQ-létrehozást, a FASTQ- és VCF-létrehozást csírvonalbeli variánsok kimutatásához, valamint a FASTQ- és VCF-létrehozást szomatikus variánsok kimutatásához. Ha ezt az alkalmazást használja VCF létrehozására, nem kell elvégeznie a másodlagos elemzés validálását.
- A NovaSeq 6000Dx készüléken végzett DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás korlátozásait lásd a *NovaSeq 6000Dx terméktájékoztatójában (dokumentumszám: 200025276)*.

## A termék összetevői

Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit a következő komponenseket tartalmazza:

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, katalógusszám: 20051354 (16 minta) vagy 20051352 (96 minta)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, katalógusszám: 20051355 (16 minta) vagy 20051353 (96 minta)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module for NextSeq 550Dx, katalógusszám: 20063024
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module for MiSeqDx, katalógusszám: 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NovaSeq 6000Dx, katalógusszám: 20074609

## Szállított reagensek

Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx elvégzéséhez Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A vagy az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B szükséges. Az alábbi táblázat tartalmazza a 16 vagy 96 mintás készlet használatával elvégezhető könyvtár-előkészítési és dúsítási reakciók számát.

<b>Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit</b>	<b>Bevitt minta</b>	<b>Dúsítási reakciók</b>	<b>Dúsítás plexitása</b>
16 mintához való készlet	Alacsony minőségű (FFPE)	16 reakció	1-plex
96 mintához való készlet	Kiváló minőségű (például teljes vér)	8 reakció	12-plex

## illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A/B

### illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, 15–30 °C-on tárolandó

A következő reagenseket szobahőmérsékleten szállítják. Azonnal tárolja a reagenseket a jelzett tárolási hőmérsékleten, ezzel biztosítva a megfelelő teljesítményt.

Reagens neve	Csövek száma		Kupak színe	Térfogat	Hatóanyagok
	16 minta (# 20050020)	96 minta (# 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Piros	350 µl	Detergens vizes oldata.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Zöld	41 ml	Detergenst és sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat.
Tisztító gyöngyök (CB)	1	NA*	Piros	10 ml	Szilárd fázisú paramágneses gyöngyök pufferelt vizes oldatban.

A 96 mintás készletekhez való tisztító gyöngyöket az illumina Prep Dx Cleanup Beads Dx (96 minta) (katalógusszám: 20050030) tartalmazza.

### illumina Prep Dx tisztító gyöngyök (96 minta), 15 °C és 30 °C között tárolható

A 96 mintás készletekhez való tisztítógyöngyöket az illumina Prep Dx Cleanup Beads (katalógusszám: 20050030) tartalmazza. A következő reagenst szobahőmérsékleten szállítják. Azonnal tárolja a reagenseket a jelzett tárolási hőmérsékleten, ezzel biztosítva a megfelelő teljesítményt. A 16 mintás készletekhez való tisztítógyöngyöket az illumina Prep Dx 1. tagmentációs reagensek termék (katalógusszám: 20050020) tartalmazza.

Reagens neve	Darab	Kupak színe	Térfogat	Hatóanyagok
Tisztító gyöngyök (CB)	4	Piros	10 ml	Szilárd fázisú paramágneses gyöngyök pufferelt vizes oldatban.

### illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, 2–8 °C-on tárolandó

Az alábbi reagenseket hűtve szállítjuk. Azonnal tárolja a reagenseket a jelzett tárolási hőmérsékleten, ezzel biztosítva a megfelelő teljesítményt. Tárolja az eBLTS törzscövet függőlegesen, úgy, hogy a gyöngyök mindig a pufferbe merüljenek.

Reagens neve	Csövek száma		Kupak színe	Térfogat		Hatóanyagok
	16 minta (# 20050021)	96 minta (# 20050026)		16 minta	96 minta	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Sárga	200 µl	290 µl	Streptavidinnel bevont mágneses gyöngyök kötött transzposzómákkal glicerint, EDTA-t, ditiotreitolt, sót és detergenset tartalmazó pufferelt vizes oldatban.
Reszuspenziós puffer (RSB, Resuspension Buffer)	1	4	Átlátszó	1,8 ml	1,8 ml	Pufferelt vizes oldat.

### illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, -25 °C és -15 °C között tárolandó

Az alábbi reagenseket fagyaszttva szállítjuk. Azonnal tárolja a reagenseket a jelzett tárolási hőmérsékleten, ezzel biztosítva a megfelelő teljesítményt.

Reagens neve	Csövek száma		Kupak színe	Térfogat		Hatóanyagok
	16 minta (# 20050022)	96 minta (# 20050027)		16 minta	96 minta	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Átlátszó	290 µl	290 µl	Magnéziumsót és dimetilformamidot tartalmazó pufferelt vizes oldat.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Átlátszó	200 µl	610 µl	DNS-polimeráz és dNTP-k pufferelt vizes oldatban.

### illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 minta); 2-8 °C-on tárolandó

A 16 mintás készletek esetében a következő reagenseket tartalmazza az illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 termék (katalógusszám: 20050023). A 96 mintás készletek esetében a következő reagenseket tartalmazza az illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 termék (katalógusszám: 20050028).

Az alábbi reagenseket hűtve szállítjuk. Azonnal tárolja a reagenseket a jelzett tárolási hőmérsékleten, ezzel biztosítva a megfelelő teljesítményt.

Reagens neve	Csövek száma	Kupak színe	Térfogat	Hatóanyagok
Streptavidinnel bevont mágneses gyöngyök (SMB3)	4	Átlátszó	1,2 ml	Streptavidint tartalmazó mágneses gyöngyök formamidot, detergenst és sókat tartalmazó pufferelt vizes oldatban.
Reszuszpenziós puffer (RSB, Resuspension Buffer)	1	Átlátszó	1,8 ml	Pufferelt vizes oldat.
Dúsítási hibridizációs puffer 2 (EHB2)	1	Átlátszó	200 µl	Detergenst és sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat.
Dúsítási célpuffer 2 (ET2)	1	Átlátszó	200 µl	Pufferelt vizes oldat.

### illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 minta), 2–8 °C között tárolható.

A 96 mintás készletek esetében a következő reagenseket tartalmazza az illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 termék (katalógusszám: 20050028). A 16 mintás készletek esetében a következő reagenseket tartalmazza az illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 termék (katalógusszám: 20050023).

Az alábbi reagenseket hűtve szállítjuk. Azonnal tárolja a reagenseket a jelzett tárolási hőmérsékleten, ezzel biztosítva a megfelelő teljesítményt.

Reagens neve	Csövek száma	Kupak színe	Térfogat	Hatóanyagok
Streptavidinnel bevont mágneses gyöngyök (SMB3)	2	Átlátszó	1,2 ml	Streptavidint tartalmazó mágneses gyöngyök formamidot, detergenst és sókat tartalmazó pufferelt vizes oldatban.
Reszuszpenziós puffer (RSB, Resuspension Buffer)	4	Átlátszó	1,8 ml	Pufferelt vizes oldat.
Dúsítási hibridizációs puffer 2 (EHB2)	1	Átlátszó	200 µl	Detergenst és sókat tartalmazó pufferelt vizes oldat.
Dúsítási célpuffer 2 (ET2)	1	Átlátszó	200 µl	Pufferelt vizes oldat.

## illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2; 25 °C és -15 °C között tárolandó

Az alábbi reagenseket fagyasztva szállítjuk. Azonnal tárolja a reagenseket a jelzett tárolási hőmérsékleten, ezzel biztosítva a megfelelő teljesítményt.

Reagens neve	Csövek száma		Kupak színe	Térfogat	Hatóanyagok
	16 minta (# 20050024)	96 minta (# 20050029)			
Dúsítási elúciós puffer 1 (EE1)	1	1	Átlátszó	580 µl	Detergens vizes oldata.
Javított dúsítási mosópuffer (EEW)	4	4	Narancssárga	4,1 ml	Sókat és detergenst tartalmazó pufferelt vizes oldat.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Átlátszó	320 µl	PCR-primerek (oligonukleotidok) keveréke.
2 N NaOH (HP3)	1	1	Átlátszó	200 µl	2 N nátrium-hidroxid (NaOH) oldat.
HYB puffer 2 + IDT-NXT-blokkolók (NHB2)	2	1	Kék	480 µl	Pufferelt vizes oldat Cot-1 DNS-sel, makromolekulaszűfolttságot növelő szerrel és formamiddal.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Átlátszó	200 µl	DNS-polimeráz és dNTP-k pufferelt vizes oldatban.

## illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, tárolás -25 °C és -15 °C között

Az alábbi reagenseket fagyasztva szállítjuk. Azonnal tárolja a reagenseket a jelzett tárolási hőmérsékleten, ezzel biztosítva a megfelelő teljesítményt. Az indexadapterekkel kapcsolatos információkért lásd: [Függelék: illumina UD indexek adapterszekvenciái, 61. oldal.](#)

Komponens	Darab
illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 index), cikkszám: 20050038	1
illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 index), cikkszám: 20050039	1



## Nem szállított reagensek

### Szükséges, de nem szállított reagensek

- DNS-extrakciós és tisztítási reagensek
- DNS mennyiségi értékelési reagensek
- Etanol (100%-os, molekuláris biológiai minőségű)
- Nukleázmentes víz
- 1 M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- 1 N NaOH oldat, molekuláris biológiai minőségű
- NextSeq 550Dx szekvenálórendszer használata esetén:
  - NextSeq 550DxHigh Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklus), cikkszám: 20028871
- MiSeqDx szekvenálórendszer használata esetén:
  - MiSeqDx Reagent Kit v3 (cikkszám: 20037124)
- NovaSeq 6000Dx szekvenálórendszer használata esetén:
  - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 ciklus) (cikkszám: 20046931)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 ciklus) (cikkszám: 20046933)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (cikkszám: 20062292)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (cikkszám: 20062293)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube (cikkszám: 20062290)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 db/csomag (cikkszám: 20062291)

### A dúsitópróba-panelekkel szembeni követelmények

Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reagensei kompatibilisek mind az Illumina, mind a harmadik fél által forgalmazott DNS-dúsító oligonukleotid-panelekkel. Ha harmadik féltől származó biotinilált DNS-próbákat használ (fix vagy egyedi panelek), győződjön meg arról, hogy azok megfelelnek az előírt specifikációknak.

Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit a következő specifikációknak megfelelő, más gyártótól származó panelek használatával van optimalizálva és validálva. A specifikációknak meg nem felelő, más gyártótól származó panelek használata esetén nem garantált, hogy egyenértékű eredmények keletkeznek.

- Próbák hosszúsága 80 bp vagy 120 bp
- 500–675 000 próba
- Egy- vagy kétszálú DNS
- A bevitt próbák teljes mennyisége  $\geq 3$  pmol, 1-plex és 12-plex közötti plexitású dúsitáshoz

## Tárolás és kezelés

- A szobahőmérséklet a 15 °C és 30 °C közötti hőmérsékletet jelenti.
- A reagensek a megadott módon történő tárolás esetén a készlet címkéjén feltüntetett lejárat dátumig stabilak. A tárolási hőmérsékleteket lásd: [Szállított reagensek, 4. oldal](#).
- A reagensek stabilak a feltüntetett lejárat idő előtt legfeljebb négy fagyasztási-felolvasztási ciklusig.
- Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit eljárás a következő biztonságos megszakítási pontokat tartalmazza:
  - A [Tagmentált DNS amplifikációja, 28. oldal](#) című részben foglaltak után az amplifikált könyvtárak -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolva 30 napig stabilak.
  - A [Könyvtárak tisztítása, 30. oldal](#) című részben foglaltak után a tisztított könyvtárak -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolva 30 napig stabilak.
  - Az [Előre dúsított könyvtárak összekeverése, 32. oldal](#) című részben foglaltak után az összekevert könyvtárak -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolva 30 napig stabilak.
  - A [Dúsított könyvtár amplifikációja, 43. oldal](#) című részben foglaltak után a dúsított, amplifikált könyvtárakat tartalmazó lemez akár 24 órán keresztül is az inkubátoron maradhat. Másik lehetőségként a lemez 2 °C és 8 °C között 48 óráig tárolható.
  - A végleges, megtisztított, dúsított könyvtárak -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolva 7 napig stabilak.
- Ha az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit csomagolása vagy bármelyik összetevője megsérült vagy más módon károsodott, forduljon az Illumina ügyfélszolgálatához.
- A Stop Tagment Buffer 2 (ST2) látható csapadékot vagy kristályokat képezhet. Ha csapadékot észlel, melegítse 37 °C-ra 10 percig, majd vortexelje, amíg a csapadék fel nem oldódik.
- A Hybridization Oligos (HYB) és az Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) reagenseket elő kell melegíteni a mintatípustól és próbapaneltől függő hibridizációs tartási hőmérsékletre. Az NHB2 és az EEW kezelésével kapcsolatos további információkat lásd: [Az eljárással kapcsolatos megjegyzések, 15. oldal](#).
- Az Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) és a HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) kristályokat képezhet vagy zavarossá válhat. Ha kristályok és zavarosság látható, vortexelje, vagy fel-le pipettázva keverje az oldatot, amíg tiszta nem lesz. A pipettázás előtt feltétlenül melegítse elő az NHB2-t.
- A Cleanup Beads (CB) kezelésekor a következő legjobb gyakorlatokat alkalmazza:
  - Soha ne fagyassza meg a gyöngyöket.
  - Közvetlenül a használat előtt vortexelje a gyöngyöket, amíg nem szuszpendálódnak ismét, és a színük homogén nem lesz.
- Az Enrichment BLT Small (eBLTS) kezelésénél a következő legjobb gyakorlatokat alkalmazza:
  - Tárolja az eBLTS csövet függőlegesen, úgy, hogy a gyöngyök mindig a pufferbe kerüljenek.
  - Alaposan vortexelje az eBLTS-t, amíg a gyöngyök reszuszpendálódnak. A gyöngyök ismételt leülepedésének elkerülése érdekében nem ajánlott a pipettázás előtti centrifugálás.

- Ha a gyöngyök a 96 üregű lemez oldalához vagy tetejéhez tapadnak, centrifugálja 280 × g-vel 3 másodpercig, majd pipettával szuszpendálja újra.
- Az indexadapter-lemezek kezelésénél a következő legjobb gyakorlatokat alkalmazza:
  - Ne adjon mintát az indexadapter-lemezhez.
  - Az indexlemez mindegyik ürege csak egyszer használatos.

## Szükséges, de nem szállított eszközök és anyagok

Ügyeljen arra, hogy mielőtt elkezdené a protokollt, rendelkezésre álljon az illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit és a szükséges berendezések.

### Berendezés

Ügyeljen, hogy mielőtt nekikezdene a protokollnak, rendelkezésre álljon a szükséges felszerelés.

A protokollt a felsorolt specifikációknak megfelelő termékek felhasználásával optimalizálták és validálták. Másféle eszközök használata esetén nem garantált, hogy egyenértékű eredmények keletkeznek.

Egyes elemek csak bizonyos munkafolyamatokhoz szükségesek. Ezek külön táblázatokban vannak felsorolva.

- Hőváltóztató inkubátor a következő jellemzőkkel:
  - Fűtött fedél
  - Minimális hőmérséklet-szabályozási tartomány 10 °C és 98 °C között
  - Minimális hőmérsékleti pontosság ± 0,25 °C
  - Maximális reakciótérfogat 100 µl
  - Kompatibilis a teljes peremmel ellátott 96 üregű PCR-lemezekkel
- Mikrominta-inkubátor a következő specifikációkkal:
  - Környezeti hőmérséklet tartománya: +5,0 °C és 99,0 °C között
  - Kompatibilis a 96 üregű MIDI-lemezekkel
- 96 üregű MIDI-lemezekkel kompatibilis mikrominta-inkubátor betétek
- Nagy sebességű mikrolemzkeverő 200–3000 fordulat/perc keverési sebességgel
- 96 üregű PCR-lemezekkel kompatibilis mágneses állvány
- 96 üregű MIDI-lemezekkel kompatibilis mágneses állvány
- A használt mennyiségi meghatározási módszerrel kompatibilis fluorométer
- DNS-fragmentum-analizátor
- Precíziós pipetták:
  - 10 µl-es egycsatornás és többcsatornás pipetták
  - 20 µl-es egycsatornás és többcsatornás pipetták

- 200 µl-es egycsatornás és többcsatornás pipetták
- 1000 µl-es egycsatornás pipetták
- Precíziós pipetták a reagensek és minták pontos adagolásának biztosításához. Egycsatornás vagy többcsatornás pipetták is használhatók, ha azokat rendszeresen kalibrálják, és a pontosságuk megadott térfogat 5%-án belül van.
- Mikrolemez-centrifuga
- Mikrocentrifuga
- A következő Illumina szekvenálórendszerek egyike:
  - MiSeqDx készülék, katalógusszám: DX-410-1001
  - NextSeq 550Dx készülék (katalógusszám: 20005715)
  - NovaSeq 6000 Dx készülék (katalógusszám: 20068232)
- [Optional] Vákuumos sűrítő
- [FFPE] Valós idejű PCR-kimutatási rendszer

## Anyagok

Ügyeljen, hogy mielőtt nekikezdené a protokollnak, rendelkezésre álljanak a szükséges anyagok.

Egyes elemek csak bizonyos munkafolyamatokhoz szükségesek. Ezek külön táblázatokban vannak felsorolva. A protokollt a felsorolt elemek felhasználásával optimalizálták és validálták. Másféle anyagok használata esetén nem garantált, hogy egyenértékű eredmények keletkeznek.

- Szűrővel ellátott pipettahegyek
- Kúpos csövek, 15 ml vagy 50 ml
- 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csövek
- RN-áz-/DN-áz-mentes, eldobható többcsatornás reagenstárolók
- RN-áz-/DN-áz-mentes, 8 csövet tartalmazó csősorok és kupakok
- Szerológiai pipetták
- 96 üregű, 0,8 ml-es polipropilén mély üregű tárolólemez (MIDI-lemez)
- Kemény anyagú, 96 üregű, teljes peremmel ellátott PCR-lemezek
- [FFPE] qPCR készülékkel kompatibilis qPCR-lemezek
- 96 üregű lemezekhez való, a következő jellemzőkkel rendelkező öntapadós zárófoliák:
  - Lehúzható, átlátszó poliészter
  - Használható peremmel ellátott PCR-lemezekkel
  - Erős, többszöri, -40 °C és 110 °C közötti hőmérséklet-változásnak ellenálló ragasztó.
  - DNáz-/RNáz-mentes víz
- A választott mennyiségi mérési módszerrel kompatibilis műanyag fogyóeszközök

- Fluorometriás dsDNS-quantifikációs készlet, amely kompatibilis a kiválasztott mérőrendszerrel:
  - Az előzetesen feldúsított amplifikált könyvtárak mennyiségi mérésére többféle kvantifikációs készlet használható.
  - A dúsított könyvtárak mennyiségi meghatározásához használható kvantifikációs készletek köre a használt próbapaneltől függ.
- Fragmentumelemző készlet könyvtárminősítéshez a kiválasztott minősítő rendszerrel:
  - Az előzetesen feldúsított amplifikált könyvtárak minősítésére többféle minősítési készlet használható.
  - A dúsított könyvtárak minősítéséhez használható minősítési készletek köre a használt próbapaneltől függ.
- **[Opcionális]** készlet humán sejtekből és szövetekből történő DNS-kivonáshoz. Használható bármilyen hitelesített kivonási módszer.

## Mintavétel, -szállítás és -tárolás



### FIGYELEM!

Minden mintát potenciálisan fertőző anyagként kell kezelni.

- Ez a vizsgálat kompatibilis a humán sejtekből és szövetekből származó genomikus DNS-sel.
- A kereskedelmi forgalomban kapható tisztított gDNS esetében győződjön meg arról, hogy a mintákat megfelelő körülmények között szállították és a gyártó utasításainak megfelelően tárolták. Kövesse a legjobb gyakorlatot a gDNS tárolására és a fagyasztási-olvasztási ciklusokra vonatkozóan.
- A teljes vérből származó mintabevitellel kapcsolatban kövesse a választott DNS-kivonási módszerre vonatkozó vérvételi, szállítási és tárolási követelményeket. Használható bármilyen hitelesített kivonási módszer. A teljes vér szállítását a betegségek terjesztésére alkalmas anyagokra vonatkozó országos és helyi előírásoknak megfelelően kell végezni.
- A DNS FFPE szövetből történő kivonásához bármilyen validált extrakciós módszer használható. A következő eljárások elvégzésével kapcsolatban kövesse a választott extrakciós módszerre vonatkozó utasításokat és ajánlásokat:
  - A szövetek formalinnal történő fixálásának és paraffinba való beágyazásának módszere a kivont DNS legjobb minőségének biztosítása érdekében.
  - Az FFPE-minták tárolása.
  - A kiindulási anyagokra vonatkozó követelmények, például az FFPE-metszetek száma és vastagsága. A legtöbb tisztítási módszer frissen készített metszetek használatát javasolja.

## Figyelmeztetések és óvintézkedések

- Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reagensek potenciálisan veszélyes vegyi anyagokat tartalmaznak. Belélegzése, lenyelése, bőrrel érintkezése és szembe kerülése személyi sérülést okozhat. Viseljen védőfelszerelést, így védőszemüveget, kesztyűt és laborköpenyt a kockázat mértékének megfelelően. A használt reagenseket vegyi hulladékként kezelje, és a regionális, országos és helyi törvényeknek és előírásoknak megfelelően ártalmatlanítsa. A további környezetvédelmi és munkavédelmi információkért tekintse meg a biztonsági adatlapokat (SDS) a [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html) weboldalon.
- Minden vérmintát úgy kell kezelni, mintha ismert fertőző lenne humán immundeficiencia vírus (HIV), hepatitis B vírus (HBV) vagy más vérrel terjedő kórokozók tekintetében (általános óvintézkedések).
- Használja a rutinszerű laboratóriumi óvintézkedéseket. Ne pipetázzon szájjal. Ne étkezzon, igyon vagy dohányozzon a munkaterületként megjelölt területeken. A minták és a készlet reagensei kezelésekor viseljen eldobható gumikesztyűt és laboratóriumi köpenyt. A minták és a készlet reagensei kezelése után alaposan mosson kezet.
- A minták vagy reagensek lebomlásának megelőzéséhez ügyeljen arra, hogy a protokoll megkezdése előtt a tisztításból származó összes nátrium-hipoklorit gőz teljesen eltávozzon.
- A minták más PCR-termékekkel/amplikonokkal való szennyeződése pontatlan és megbízhatatlan eredményeket okozhat. A szennyeződés elkerülése érdekében alkalmazza a következő legjobb gyakorlatokat:
  - Alkalmazzon megfelelő laboratóriumi gyakorlatot és laboratóriumi higiéniát.
  - A munkafolyamat lépéseit a kijelölt amplifikáció előtti, illetve amplifikáció utáni területen végezze el.
  - A könyvtárak tisztítása előtt tárolja a felhasznált reagenseket az amplifikáció előtti területen.
  - Különítse el az amplifikáció előtti reagenseket az amplifikáció utáni reagensektől.
  - Gondoskodjon arról, hogy az amplifikáció előtti és utáni területeken legyenek külön berendezések, például pipetták, pipettahegyek, vortexelő és centrifuga.
- Kerülje el a keresztszennyeződést. Az egyes minták között és az egyes reagensek között használjon új pipettahegyeket. A szűrős pipettahegyek használata csökkenti az amplikonok átvitelét és az egyes minták közötti keresztszennyeződést.
  - A minták vagy a reagens-főkeverékek hozzáadásakor vagy átvitelekor mindegyik mintánál használjon új pipettahegyet.
  - Ha többcsatornás pipettával indexadptereket ad hozzá, minden sor vagy minden oszlop között cserélje ki a pipettahegyet. Ha egycsatornás pipettát használ, mindegyik mintához használjon új a pipettahegyet.
  - Távolítsa el a munkaterületről a nem használt indexadapter-lemezeket.
- Az etanolos mosási lépéseknél a következő legjobb gyakorlatokat alkalmazza:
  - Mindig frissen készítsen 80%-os etanololdatot. Az etanol vizet vehet fel a levegőből, ami befolyásolhatja az eredményeket.

- Ügyeljen arra, hogy a mosási lépések során minden etanol eltávolításra kerüljön az üregek aljából. A megmaradt etanol befolyásolhatja az eredményeket.
- A mágneses állványon elvégzett lépések után tartsa be a megadott száradási időt, hogy biztosítsa a teljes mértékű elpárolgását. A megmaradt etanol befolyásolhatja a későbbi reakciók teljesítményét.
- A főkeverékeket mindig használat előtt készítse el, és soha ne tároljon összekevert munkaoldatokat.
- Az illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit teljesítménye nem garantált, ha nem követik a terméktájékoztatóban leírt eljárásokat.
- Ne használja a reagenseket a készlet címkéjén feltüntetett lejárati idő után.
- Ne használjon egy munkafolyamathoz különböző illumina DNA Prep with Enrichment Dx készletekből származó komponenseket. A készlet tétele a címkéjén van feltüntetve.

## Az eljárással kapcsolatos megjegyzések

### Bevitt DNS-mennyiséggel kapcsolatos ajánlások

Az illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit protokollja az 50–1000 ng kiváló minőségű kettős szálú genomikus DNS (gDNS) bevitelével kompatibilis.

Ügyeljen arra, hogy a kiindulási gDNS-minta ne tartalmazzon > 1 mM EDTA-t, sem pedig szerves szennyeződések, például fenolt vagy etanolt. Ezek az anyagok megzavarhatják a tagmentációs reakciót, és a vizsgálat sikertelenségét eredményezhetik.

#### gDNS-bemenet $\geq$ 50 ng

Az 50–1000 ng közötti gDNS-bevitel esetén nincs szükség a kezdeti gDNS-minta mennyiségi meghatározására és normalizálására.

#### gDNS-bemenet < 50 ng

10–50 ng bemeneti DNS-mennyiség használható, a következő módosításokkal:

- 10–49 ng gDNS bevitele esetén a kezdeti gDNS-minta mennyiségi meghatározása ajánlott a tagmentáció után szükséges PCR-ciklusok számának meghatározásához. Fluorometriás módszerrel határozza meg a kettős szálú gDNS mennyiségét. Ne használjon az összes nukleinsavat mérő módszereket, például a NanoDrop vagy más UV-abszorbanációs módszereket.
- Ez a protokoll nem normalizálja a 10–49 ng gDNS-ből származó, előre dúsított könyvtárak végső hozamát, ezért a könyvtárak mennyiségi meghatározása és normalizálása szükséges a dúsítás előtt és után.
- Az illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit készletet 50–1000 ng DNS-bevitel esetére jellemezték és hitelesítették. Nem garantálható, hogy a termék < 50 ng gDNS-bevitel esetén ezzel egyenértékű teljesítményt nyújt.

## Vérből származó bemeneti mintákkal kapcsolatos ajánlások

Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kompatibilis a perifériás teljes vérből kivont gDNS-sel. Használható bármilyen hitelesített kivonási módszer. A gDNS teljes vérből történő kivonásakor nincs szükség a bemeneti DNS kezdeti mennyiségi meghatározására, és az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit normalizált, előre dúsított könyvtárhozamat eredményez.

A következő tényezők kedvezőtlenül befolyásolhatják a teljesvér-mintákból nyert DNS mennyiségét és ezáltal a könyvtár normalizálását:

- A vérminta levétele óta eltelt idő
- Tárolási körülmények
- A fehérvérsejtszámot befolyásoló alapbetegségek

## Ajánlások a bevitt FFPE szövetminta mennyiségére

A sikeres könyvtárkészítéshez az FFPE szövetből származó DNS-re vonatkozó minőségi kritériumok alapján határozza meg a szükséges beviteli mennyiséget:

- $\leq 5$ -ös  $\Delta Cq$ -értékű FFPE minták esetében az ajánlott DNS-bevitel 50–1000 ng.
- Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nem ajánlott rossz minőségű FFPE mintákhoz, amelyeknél  $\Delta Cq > 5$ . A  $\Delta Cq > 5$  értékű minták használhatók, azonban ilyenkor nagyobb a könyvtárkészítés sikertelenségének esélye, és csökkenhet a vizsgálat teljesítménye.

### Extrakció FFPE-mintából

Használjon olyan nukleinsav-izolálási módszert, amely magas hozamot eredményez, minimalizálja a mintafogyasztást, és megőrzi a minta integritását. Használható bármilyen hitelesített, FFPE-mintából való DNS-kivonásra szolgáló módszer. A gDNS FFPE szövetből történő kivonásakor szükséges a bemeneti DNS kezdeti mennyiségi meghatározása; az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nem eredményez normalizált, előre dúsított könyvtárhozamatot.

### FFPE szövetből származó DNS minősítése

Az FFPE-szövetből kivont gDNS-t felhasználás előtt minősíteni kell. Az optimális teljesítmény érdekében értékelje a DNS-minták minőségét az FFPE-mintákból kivont DNS minősítésére szolgáló validált extrakciós módszerrel. Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit protokollja a  $\leq 5$ -ös  $\Delta Cq$ -értékű FFPE mintákkal kompatibilis. Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nem ajánlott rossz minőségű FFPE mintákhoz, amelyeknél  $\Delta Cq > 5$ . A  $\Delta Cq > 5$  értékű minták használhatók, azonban ilyenkor nagyobb a könyvtárkészítés sikertelenségének esélye, és csökkenhet a vizsgálat teljesítménye.



## [Opcionális] FFPE referenciaminták

A protokoll végrehajtása során pozitív kontrollként használjon jellemzett referenciaanyagokat; ilyen például a Horizon HD799 (DNS). A sejtvonalból származó xenograftokból készített, minősített FFPE anyagok szintén használhatók referenciamintaként. Használat előtt fluorometriás módszerrel végezze el a referenciaanyagok mennyiségi mérését.

**MEGJEGYZÉS** A pozitív referencia-kontrollminta és a sablon nélküli kontroll futtatása csökkenti feldolgozható ismeretlen minták számát.

## Ajánlások a bevitt minta mennyiségére

Az illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit készlethez szükséges mintabeviteli ajánlásokat a következő táblázat foglalja össze.

1. táblázat Ajánlások a bevitt minta mennyiségére

Bemeneti minta típusa	Bevitt minta mennyisége	A szükséges bevitt DNS mennyiségi meghatározása szükséges	A bevitt DNS szükséges minősége	Normalizált elődúsított könyvtár mennyisége
gDNS	10–49 ng	Igen	260/280 arány: 1,8–2,0	Nem
gDNS	50–1000 ng	Nem	260/280 arány: 1,8–2,0	Igen
Vérből kivont gDNS	50–1000 ng	Nem	260/280 arány: 1,8–2,0	Igen
FFPE szövetből kivont gDNS	50–1000 ng	Igen	$\Delta Cq$ -érték $\leq 5$	Nem

Az eBLTS PCR-program ajánlott PCR-ciklusai a minta bemeneti koncentrációja és minősége alapján kerülnek beállításra. További információkért lásd: [Tagmentált DNS amplifikációja, 28. oldal](#).

## Tippek és módszerek

### A keresztszennyezés elkerülése

- A minták hozzáadásakor vagy átvitelekor *mindegyik mintánál* használjon új pipettahegyet.
- Ha többcsatornás pipettával indexadaptereket ad hozzá, *minden sor* vagy *minden oszlop* között cserélje ki a pipettahegyet. Ha egycsatornás pipettát használ, mindegyik mintához használjon új a pipettahegyet.

## A lemez lezárása

- A protokoll következő lépései előtt mindig zárja le a 96 üregű lemezt egy új öntapadós zárófóliával, gumihenger használatával:
  - Rázási lépések
  - Inkubálási lépések. A lemez megfelelő lezárásának elmulasztása az inkubáció során párolgáshoz vezethet.
  - Centrifugálási lépések
  - Hibridizálási lépések
- A keresztzennyeződés és a párolgás kockázatának csökkentése érdekében győződjön meg arról, hogy a szélek és az üregek teljesen le vannak zárva.
  - Ha folyadék vagy csapadék látható a zárófólián vagy a lemez üregeinek oldalán, a fólia eltávolítása előtt szükség szerint végezzen centrifugálást.
- Helyezze a lemezt vízszintes felületre, és lassan húzza le a zárófóliát.

## Az Enrichment BLT Small (eBLTS) kezelése

- Tárolja az eBLTS törzscsövet a hűtőben függőlegesen, úgy, hogy a gyöngyök mindig a pufferbe merüljenek.
- Közvetlenül a felhasználás előtt alaposan keverje fel az eBLTS-törzscsövet, amíg a gyöngyök újraszuszpendálódnak. A gyöngyök ismételt leülepedésének elkerülése érdekében nem ajánlott a pipettázás előtti centrifugálás.
- Ha a gyöngyök a 96 üregű lemez oldalához vagy tetejéhez tapadnak, centrifugálja  $280 \times g$ -vel 3 másodpercig, majd pipettával szuszpendálja újra.
- Az eBLTS mosásakor tartsa be az alábbiakat:
  - A lemezhez való mágneses állványt használja.
  - Tartsa a lemezt a mágneses állványon, amíg az utasítások azt nem tartalmazzák, hogy el kell távolítani.
  - Ha a gyöngyök felszívódnak a pipettahegybe, adagolja vissza a folyadékot a mágneses állványon lévő lemezbe, és várjon, amíg a folyadék le nem tisztul (2 perc).

# Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit termékkel elvégzendő munkafolyamat

Az alábbi ábra az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit munkafolyamatát szemlélteti. A lépések között jelezve vannak a biztonságos megszakítási pontok. A becsült munkaidők 12 minta feldolgozása és 12-plex dúsítás esetére vonatkoznak.



## Használati útmutató

Ez a fejezet az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit protokollját ismerteti.

- A termékek és a kísérleti paraméterek kompatibilitásának biztosítása érdekében tekintse át a tervezett teljes szekvenálási munkafolyamatot a mintától az elemzésig.
- A folytatás előtt ellenőrizze a készlet tartalmát, és győződjön meg arról, hogy rendelkezik a szükséges komponensekkel, felszerelésekkel és anyagokkal.
  - A harmadik féltől származó biotinizált próbáknak meghatározott követelményeknek kell megfelelniük. A harmadik féltől származó próbáknál a követelményeknek való megfelelés biztosításához olvassa el [A dúsítópróba-panelekkel szembeni követelmények, 9. oldal](#) részt.
- Kövesse a protokollokat a feltüntetett sorrendben, betartva a megadott mennyiségeket és inkubációs paramétereket.
- A felsorolt műveleteket közvetlenül egymás után kell elvégezni; csak a protokollban megjelölt biztonságos megszakítási pontoknál lehet abbahagyni.
- A főkeverék létrehozásakor a megadott mennyiségek tartalmazzák a többletet.
- Ügyeljen arra, hogy a lemez típusához megfelelő mágneses állványt használjon.

## Az összekeverés előkészítése

Ez a lépés szükséges a dúsított könyvtárak sikeres szekvenálásához. A könyvtárak összekeverése történhet a dúsítás előtt vagy a szekvenálás előtt.

**A dúsítás előtt** – Az egyes indexelt amplifikált könyvtárak összekeverhetők a kiválasztott próbapanellel történő dúsításhoz. Ezzel a dúsított könyvtárak multiplexelt keveréke jön létre. Az FFPE szövetből származó bevitt minta feldolgozását megvizsgáltuk, és kizárólag 1-plex dúsítási reakció végzését ajánljuk. Kiváló minőségű gDNS esetében a 12-plex dúsítást próbáltuk ki, de végezhető 2-plex–11-plex dúsítás is.

**A szekvenálás előtt** – Az 1-plex és/vagy multiplex dúsítással feldolgozott könyvtárak összekeverhetők a szekvenálás előtt. A szekvenálható dúsított könyvtárak száma az egyes mintáknak a szekvenálórendszerrel végzett leolvasási mélységétől függ.

## Egyedi kétszeres indexelés

Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reagenseivel egyedi kétszeres indexelés végezhető.

- A kétszeresen indexelt könyvtárak az 1. index (i7) és a 2. index (i5) szekvenciák hozzáadásával jönnek létre.
- Az UD indexelés esetén az i7 és i5 indexszekvenciák egyediek és függetlenek. Az indexek 10 bázispár hosszúságúak.

Az összekevert könyvtárak sikeres szekvenálása és adatelemzése érdekében nagy diverzitású indexadapterek kiválasztása szükséges a színegyensúly optimalizálásához. Az  $\geq 10$ -plex keverékek színei eredendően kiegyenlítettek, így bármilyen indexadapter-kombináció használható. A szekvenálási futtatás során a DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager modul lehetőséget biztosít a szín-kiegyensúlyozott indexkombinációk kiválasztására, és értesíti Önt, ha a kiválasztott indexkombinációkban nincs elegendő diverzitás.

Az Illumina UD indexadapterek szekvenciáival és a lemezelrendezésekkel kapcsolatos információkért lásd: [Függelék: Illumina UD indexek adapterszekvenciái, 61. oldal.](#)

## Támogatott dúsítási plexitások

Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reagensek 1-plex és 12-plex dúsítási plexitással vannak konfigurálva és tesztelve. Bár más dúsítási plexitás is lehetséges, egyes plexitásokhoz további dúsítás előtti könyvtár-előkészítési és dúsítási próbapanel-reagensek szükségesek.

A nem szabványos dúsítási plexitások megfelelő dúsítási hozamának eléréséhez további optimalizálás válhat szükségessé. Nem garantálhatók az optimális eredmények.

- **Dúsítási plexitás** – A dúsítópróba-panelekkel történő hibridizációs reakcióhoz összekevert, előzetesen dúsított könyvtárak száma (1–12). Például 12 előre dúsított könyvtár összekeverésével egy 12-plex dúsítási keverék jön létre.
- **Dúsítási reakció** – Az elvégzett dúsítási reakciók száma, függetlenül az egy reakcióhoz összekevert elődúsított könyvtárak számától. Például egy dúsítási reakcióval készíthető 1-plex vagy 12-plex dúsított keverék készíthető.

A dúsítás utáni könyvtárak teljes számának kiszámításához szorozza meg a reakciónkénti dúsítási plexitást a dúsítási reakciók számával. Például egy 12-plex dúsítási keverék egyetlen dúsítási reakciója 12 dúsítás utáni könyvtárat eredményez.

Előre dúsított könyvtárak összekeverésekor az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reagensek az alábbi számú dúsítási reakciókhoz és plexitásokhoz elegendők.

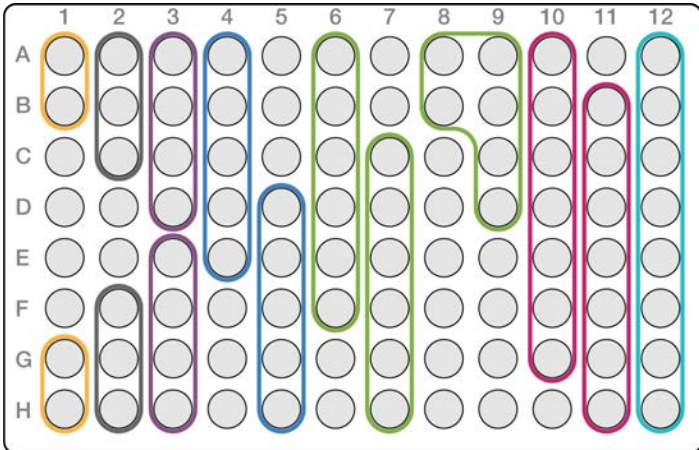
Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reagensek	Dúsítási reakciók	Dúsítás plexitása
16 mintához való készlet	16 reakció	1-plex
96 mintához való készlet	8 reakció	12-plex

## Kettő-plex és nyolc-plex közötti keverési stratégiák

A következő táblázat tartalmazza a 2-plex–8-plex keverékben kombinálható indexadaptereket (üregeket), míg a színes ábra az egyes kombinációkat szemlélteti.

A keverés és  $\geq 2$ -es plexitás egy oszlop aljától vagy tetejétől kezdődjön. Ne végezzen keverést a sorok mentén.

Plexitás	Kombinációk	Színjelzés az ábrán
2	Egy oszlop első két vagy utolsó két ürege: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A és B</li> <li>• G és H</li> </ul> A C–F sorok nem használatosak.	Narancsszínű
3	Egy oszlop első három vagy utolsó három ürege: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–C</li> <li>• F–H</li> </ul> A D és az E sor nem használatos.	Szürke
4	Egy oszlop első négy vagy utolsó négy ürege: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–D</li> <li>• E–H</li> </ul>	Lila
5	Egy oszlop első öt vagy utolsó öt ürege: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–E</li> <li>• D–H</li> </ul>	Kék
6	[1. lehetőség] Egy oszlop első hat vagy utolsó hat ürege: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–F</li> <li>• C–H</li> </ul> [2. lehetőség] Egy oszlop első két ürege (A és B) vagy utolsó két ürege (G és H) és egy szomszédos oszlop bármelyik négy ürege.	Zöld
7	Egy oszlop első hét vagy utolsó hét ürege: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–G</li> <li>• B–H</li> </ul>	Rózsaszín
8	Az egész oszlop.	Kékeszöld

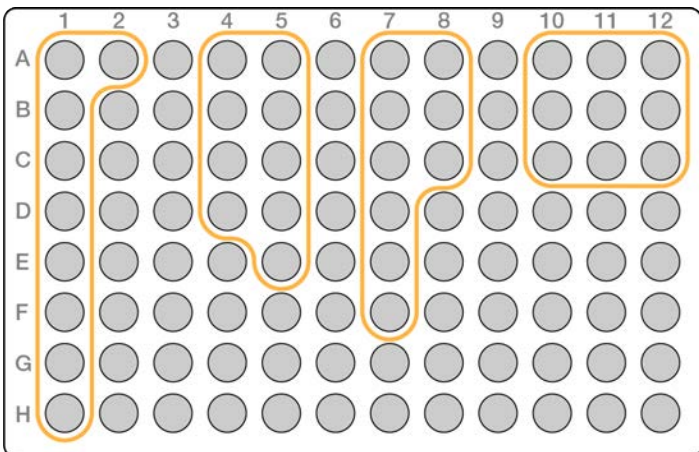


### Kilenc-plex keverési stratégiák

Olyan üregekhez való indexadaptereket használjon, amelyek optimalizálják a színegyensúlyt egy szekvenálási futtatásban, például:

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

Az alábbi ábra bemutatja mind a négy példát.



### Genomikus DNS tagmentációja

Ebben a lépésben történik a DNS tagmentálása az Enrichment BLT Small (eBLTS) segítségével, ez a DNS-t fragmentálását és adapterszekvenciákkal való címkézését foglalja magában.

## Fogyóeszközök

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (sárga kupak)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nukleázmentes víz
- 96 üregű PCR-lemez
- Öntapadós zárófolia
- 1,7 ml-es mikrocentrifuga-csővek
- 8 csövet tartalmazó csősor
- Pipettahegyek
  - 200 µl-es többcsatornás pipetták



### FIGYELEM!

Ezek a reagensek potenciálisan veszélyes vegyszereket tartalmaznak. Belélegzése, lenyelése, bőrrel érintkezése és szembe kerülése személyi sérülést okozhat. Viseljen védőfelszerelést, így védőszemüveget, kesztyűt és laborköpenyt a kockázat mértékének megfelelően. A használt reagenseket vegyi hulladékként kezelje, és a regionális, országos és helyi törvényeknek és előírásoknak megfelelően ártalmatlanítsa. A további környezetvédelmi és munkavédelmi információkért tekintse meg a biztonsági adatlapokat (SDS) a [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html) weboldalon.

## A reagensek ismertetése

- Az eBLTS-t 2 °C és 8 °C között kell tárolni. Ne használja fel az eBLTS-t, ha 2 °C alatti hőmérsékleten tárolták.
- Ne centrifugálja az eBLTS-t.

## Előkészítés

1. Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Elem	Tárolás	Utasítások
eBLTS (sárga kupak)	2 °C – 8 °C	Hozza szobahőmérsékletre. Közvetlenül a használat előtt keverje össze vortexeléssel. Ne centrifugálja a pipettázás előtt.
TB1	-25 °C és -15 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Vortexeléssel keverje össze.

2. Vortexelje vagy pipettázza a DNS-t, majd rövid ideig centrifugálja.
3. Mentse el a következő TAG programot az inkubátorra:
  - Válassza az előfűtött fedél lehetőséget, és állítsa be 100 °C-ra



- Állítsa a reakciótérfogatot 50 µl-re
- 55 °C 5 percig
- Tárolás 10 °C-on

## Eljárás

1. Adjon 2–30 µl DNS-t egy 96 üregű PCR-lemez mindegyik üregébe úgy, hogy a teljes bemeneti mennyiség 50–1000 ng legyen.  
Ha a DNS térfogata < 30 µl, adjon nukleázmentes vizet a DNS-mintákhoz, hogy a teljes térfogat elérje a 30 µl-t.
2. Alaposan vortexelje az eBLTS-t, amíg a gyöngyök teljesen reszuszpendálódnak.
3. A tagmentációs főkeverék elkészítéséhez keverje össze a következő mennyiségeket egy csőben. Mindegyik térfogatot szorozza meg a feldolgozandó minták számával.
  - eBLTS (11,5 µl)
  - TB1 (11,5 µl)A reagenstöbbletet a térfogat tartalmazza.
4. Pipetázza alaposan a tagmentációs főkeveréket, hogy elkeveredjen.
5. Ossa el a tagmentációs főkeverék térfogatát egyenlően egy 8 csöves csősorba.
6. Egy 200 µl-es többcsatornás pipetta segítségével töltsön 20 µl tagmentációs főkeveréket a PCR -lemez mindegyik, mintát tartalmazó üregébe. Használjon új pipettahegyet minden mintaoszlophoz vagy -sorhoz.
7. Dobja ki a 8 csőből álló csősort a tagmentációs főkeverék kiadagolása után.
8. Keverje össze mindegyik mintát 40 µl-re beállított 200 µl-es pipettával 10-szer fel és le pipetázva. Használjon új pipettahegyet minden mintaoszlophoz.  
Alternatív megoldásként zárja le a PCR-lemezt, és rázza lemezrázóval 1600 fordulat/perc sebességgel 1 percig.
9. Zárja le a mintalemezt, majd helyezze az előre beprogramozott inkubátorba, és futtassa a TAG programot.
10. Várja meg, amíg a TAG program eléri a 10°C-os tartási hőmérsékletet, majd azonnal vegye ki a lemezt.
11. Hagyja a 96 lyukú PCR-lemezt 2 percig szobahőmérsékleten állni, majd folytassa a következő lépéssel.

## Tagmentáció utáni tisztítás

Ebben a lépésben történik az eBLTS-en lévő, adapterrel jelölt DNS mosása a PCR-amplifikáció előtt.

### Fogyóeszközök

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96 üregű PCR-lemezhez való mágneses állvány
- Öntapadós zárófólia

- 8 csövet tartalmazó csősor
- Pipettahegyek
  - 20 µl-es többcsatornás pipetták
  - 200 µl-es többcsatornás pipetták
- Készítse elő a későbbi eljárásokhoz:
  - EPM (Enhanced PCR Mix)
  - Indexadapter-lemez

## A reagensek ismertetése

- Ügyeljen arra, hogy a lemezhez megfelelő mágneses állványt használjon. A MIDI-lemez mágneses állványának használata a PCR-lemezhez megakadályozhatja a TWB2 kötődését a gyöngyökhöz.
- A helytelen térfogat felszívása és a nem teljes keveredés megelőzéséhez a habképződés csökkentése érdekében lassan pipettázza a TWB2-t.

## Előkészítés

1. Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Elem	Tárolás	Utasítások
EPM	-25 °C és -15 °C között	Olvassza fel jégen 1 órán át. Forgassa meg, hogy elkeveredjen, majd röviden centrifugálja.
ST2	15 °C és 30 °C között	Ha csapadékot észlel, melegítse 37 °C-ra 10 percig, majd vortexelje, amíg a csapadék fel nem oldódik. Szoba-hőmérsékletű reagenst használjon.
TWB2	15 °C és 30 °C között	Szoba-hőmérsékletű reagenst használjon.
Indexadapter-lemez	-25 °C és -15 °C között	Hagyja szobahőmérsékleten felolvadni 30 percig.

## Eljárás

1. Adjon 10 µl ST2-t mindegyik tagmentációs reakcióhoz. Ha többcsatornás pipettát használ, pipettázza az ST2-t egy 8 csövet tartalmazó csősorba, majd a megfelelő mennyiségeket vigye át a PCR-lemezbe. Használjon új pipettahegyet minden mintaoszlophoz vagy -sorhoz.
2. Egy 50 µl-re beállított 200 µl-es pipettával lassan, 10-szeri pipettázással reszuszpendálja az egyes üregekben lévő gyöngyöket.  
Alternatív megoldásként zárja le a lemezt, és rázza 1600 fordulat/perc sebességgel 1 percig. Szükség esetén ismétlje meg.
3. Zárja le a lemezt, és centrifugálja 280 g-vel 10 másodpercig.

4. Inkubálja szobahőmérsékleten 5 percig.
5. Helyezze a PCR-lemez mágneses állványára, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (3 perc).
6. [ $\leq$  48 minta] Háromszor végezze el a mosást az alábbiak szerint.
  - a. Egy 60  $\mu$ l-re beállított 200  $\mu$ l-es többcsatornás pipettával szívja le és dobja el a felülúszót anélkül, hogy megzavarná a gyöngyöket tartalmazó pelletet.
  - b. Vegye le a mágneses állványról.
  - c. Közvetlenül utána lassan adjon 100  $\mu$ l TWB2-t közvetlenül a gyöngyökre.
  - d. Lassan pipettázza a folyadékot, amíg a gyöngyök teljesen reszuszpendálódnak. Alternatív megoldásként zárja le a lemezt, és rázza 1600 fordulat/perc sebességgel 1 percig.
  - e. Ha kiömlik, 10 másodpercig centrifugálja 280  $\times$  g-vel.
  - f. Helyezze a PCR-lemez mágneses állványára, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (3 perc). Hagyja a lemezt a mágneses állványon és a TWB2-t a üregekben, hogy megakadályozza a túlszáradást a harmadik mosás elvégzésekor. Miután elkészítette a PCR-főkeveréket, szívja le és dobja el a felülúszót.
  - g. Egy 100  $\mu$ l-re beállított 200  $\mu$ l-es többcsatornás pipettával szívja le és dobja el a felülúszót.
  - h. Ismételje meg a c–f lépéseket még kétszer, hogy összesen három mosást végezzen.
7. [ $>$  48 minta] Háromszor végezze el a mosást az alábbiak szerint.
  - a. A túlzott mértékű száradás elkerülése érdekében egyszerre csak 1-2 oszlopnyi folyadékkal kell elvégezni a b. és a c. lépést, amíg az összes oszlop el nem készül.
  - b. Egy 60  $\mu$ l-re beállított 200  $\mu$ l-es többcsatornás pipettával szívja le és dobja el a felülúszót.
  - c. Vegye le a mágneses állványról.
  - d. Közvetlenül utána lassan adagoljon 100  $\mu$ l TWB2-t közvetlenül a gyöngyökre.
  - e. Lassan pipettázza a folyadékot, amíg a gyöngyök teljesen reszuszpendálódnak. Alternatív megoldásként zárja le a lemezt, és rázza 1600 fordulat/perc sebességgel 1 percig.
  - f. Ha kiömlik, 10 másodpercig centrifugálja 280  $\times$  g-vel.
  - g. Helyezze a PCR-lemez mágneses állványára, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (3 perc). Hagyja a lemezt a mágneses állványon és a TWB2-t a üregekben, hogy megakadályozza a túlszáradást a harmadik mosás elvégzésekor. Miután elkészítette a PCR-főkeveréket, szívja le és dobja el a felülúszót.
  - h. Egy 100  $\mu$ l-re beállított 200  $\mu$ l-es többcsatornás pipettával szívja le és dobja el a felülúszót.
  - i. Vegye le a mágneses állványról, és lassan adjon 100  $\mu$ l TWB2-t közvetlenül a gyöngyökre.
  - j. A h és az i lépést egyszerre csak 1-2 oszlopnyi folyadékkal végezze el, amíg az összes oszlop el nem készül.
  - k. Ismételje meg az e–h lépéseket még kétszer, hogy összesen három mosást végezzen.
8. Tartsa a mágneses állványon a *Tagmentált DNS amplifikációja* című fejezet *Eljárás* című szakaszának 4. lépéséig.

A TWB2 az üregekben marad, hogy megakadályozza a gyöngyök túlzott kiszáradását.

## Tagmentált DNS amplifikációja

Ebben a lépésben a tagmentált DNS amplifikációja történik korlátozott ciklusú PCR-programmal. A PCR-lépésben Index 1 (i7) adapterek, Index 2 (i5) adapterek és a szekvenálóklaszterek létrehozásához szükséges szekvenciák hozzáadása történik.

### Fogyóeszközök

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Indexadapter-lemez
- 96 üregű PCR-lemez
- Nukleázmentes víz
- Öntapadós zárófolia
- 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csövek
- Pipettahegyek
  - 20 µl-es többcsatornás pipetták
  - 200 µl-es többcsatornás pipetták

### A reagensek ismertetése

- Indexadapter-lemezek
  - Egy üreg > 10 µl indexadaptert tartalmazhat.
  - Ne adjon mintát az indexadapter-lemezhez.
  - Az indexlemez mindegyik ürege csak egyszer használatos.

### Előkészítés

1. Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Elem	Tárolás	Utasítások
EPM	-25 °C és -15 °C között	Olvassza fel 4°C-on vagy jégen 1 órán át. Forgassa meg, hogy elkeveredjen, majd röviden centrifugálja.
Indexadapter-lemez	-25 °C és -15 °C között	Hagyja szobahőmérsékleten felolvadni 30 percig.

2. Mentse el a következő eBLTS PCR-programot egy inkubátoron az alábbi táblázatban megadott számú PCR-ciklus használatával.
  - Válassza az előfűtött fedél lehetőséget, és állítsa be 100 °C-ra
  - Állítsa a reakcióterfogatot 50 µl-re

- 72 °C 3 percig
- 98 °C 3 percig
- X ciklus a következők szerint:
  - 98 °C 20 másodpercig
  - 60 °C 30 másodpercig
  - 72 °C 1 percig
- 72 °C 3 percig
- Tárolás 10 °C-on

A teljes futási idő 9 ciklus esetén ~38 perc, 12 ciklus esetén pedig ~46 perc.

Bemeneti minta típusa	PCR-ciklusok száma (X)
10–49 ng gDNS	12
50–1000 ng gDNS	9
50–1000 ng FFPE mintából kivont gDNS	12
Vérből kivont gDNS	9

## Eljárás

1. A PCR-főkeverék elkészítéséhez keverje össze a következőket. Mindegyik térfogatot szorozza meg a feldolgozandó minták számával.
  - EPM (23 µl)
  - Nukleázmentes víz (23 µl)

A reagenstöbbltet a térfogat tartalmazza.
2. Pipetázza a PCR-főkeveréket 10-szer, hogy elkeveredjen, majd rövid ideig centrifugálja.
3. A lemezt a mágneses állványon tartva egy 200 µl-es többcsatornás pipettával távolítsa el és öntse ki a TWB2-t.
 

Az üreg falán maradó hab nem befolyásolja hátrányosan a könyvtár minőségét.
4. Vegye le a mágneses állványról.
5. Azonnal adjon 40 µl PCR-főkeveréket közvetlenül a gyöngyökre mindegyik üregben.
6. Azonnali pipetázással keverje össze, amíg a gyöngyök teljesen reszuszpendálódnak. Alternatív megoldásként zárja le a lemezt, és rázza 1600 fordulat/perc sebességgel 1 percig.

7. Zárja le a mintalemezt, és centrifugálja 280 g-vel 10 másodpercig.
8. Centrifugálja az indexadapter-lemezt 1000 g-vel 1 percig.
9. Készítse elő az indexadapter-lemezt.
  - [ $< 96$  minta esetén] Csak a feldolgozandó mintáknál szűrje át a zárófoliát az indexadapter-lemezen, mindegyik üreghez új pipettahegyet használva.
  - [96 minta] Igazítson egy új, félig peremes PCR-lemezt az indexadapter-lemez fölé, és nyomja lefelé, hogy átszűrje a zárófoliát. Dobja el a zárófolia átszűréséhez használt PCR-lemezt.
10. Egy új pipettahegy segítségével adjon 10  $\mu$ l előre párosított indexadaptert mindegyik üregbe.
11. Keverje össze 40  $\mu$ l-re beállított pipettával 10-szer fel és le pipetázva. Alternatív megoldásként zárja le a lemezt, és rázza 1600 fordulat/perc sebességgel 1 percig.
12. Zárja le a lemezt, és centrifugálja 280 g-vel 10 másodpercig.
13. Helyezze az inkubátorra, majd indítsa el az eBLTS PCR programot.

## BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha abbahagyja az eljárást,  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  és  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  közötti hőmérsékleten tárolható legfeljebb 30 napig.

## Könyvtárak tisztítása

Ebben a lépésben az amplifikált könyvtárak tisztítására kétoldalas gyöngytisztítási eljárás történik.

### Fogyóeszközök

- CB (Cleanup Beads, tisztító gyöngyök)
- RSB (Resuspension Buffer, reszuszpenziós puffer)
- Frissen elkészített 80%-os etanol (EtOH)
- 96 üregű 0,8 ml-es polipropilén mély üregű tárolólemez (MIDI-lemez)
- 96 üregű PCR-lemez
- MIDI-lemezhez való mágneses állvány
- PCR-lemezhez való mágneses állvány
- 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csővek
- Nukleázmentes víz

### A reagensek ismertetése

- Tisztító gyöngyök
  - Használat előtt mindig végezzen vortexelést.
  - Gyakran végezzen vortexelést, hogy a gyöngyök egyenletesen oszoljanak el.
  - Az oldat viszkozitása miatt lassan szívja fel, és lassan adagolja ki.

## Előkészítés

1. Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Elem	Tárolás	Utasítások
CB	Szobahőmérséklet	Vortexelje, és felfordítással keverje össze, amíg a folyadék színe homogén nem lesz.
RSB	2 °C és 8 °C között	Hagyja szobahőmérsékleten olvadni 30 percig. Vortexeléssel keverje össze.

## Eljárás

1. Rázza a 96 üregű PCR-lemezt 1800 fordulat/perc fordulatszámom 1 percig, majd rövid ideig centrifugálja.
2. Helyezze a PCR-lemez mágneses állványára, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (1 perc).
3. A reszuszpendáláshoz vortexelje a tisztítógyöngyöket 3-szor 10 másodpercig, majd fordítsa meg többször.
4. A kiváló minőségű gDNS esetében a következőképpen járjon el.
  - a. Adjon 77 µl nukleázmentes vizet egy új MIDI-lemez mindegyik, üregébe.
  - b. Adjon 88 µl CB-t a MIDI-lemez mindegyik üregébe.
  - c. Vigyen át 45 µl felülúszót a PCR-lemez mindegyik üregéből a MIDI-lemez megfelelő üregébe.
  - d. Dobja el a PCR-lemezt.
  - e. Keverje össze minden üreg tartalmát 10-szeri felszívással és kieresztéssel. Alternatív megoldásként zárja le a lemezt, és rázza 1800 fordulat/perc sebességgel 1 percig.
  - f. Zárja le a lemezt, és inkubálja szobahőmérsékleten 5 percig.
  - g. Ellenőrizze, hogy vannak-e légbuborékok. Ha láthatók, centrifugálja le.
  - h. Helyezze egy MIDI-lemeznek való mágneses állványra, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (5 perc).
  - i. Az inkubálás során alaposan keverje fel a CB-t, majd adjon 20 µl-t egy új MIDI-lemez *minden üregébe*.
  - j. Vigyen át 200 µl felülúszót az első MIDI-lemez mindegyik üregéből az új MIDI-lemez megfelelő üregébe (amely 20 µl CB-t tartalmaz).
  - k. Dobja el az első MIDI-lemezt.
  - l. Keverje össze az új MIDI-lemez minden üregének tartalmát 10-szeri felszívással és kieresztéssel. Alternatív megoldásként zárja le a lemezt, és rázza 1800 fordulat/perc sebességgel 1 percig.
5. A kivont FFPE esetében végezze el a következőket.
  - a. Adjon 81 µl CB-t egy új MIDI-lemez mindegyik üregébe.
  - b. Vigyen át 45 µl felülúszót a PCR-lemez mindegyik üregéből a MIDI-lemez megfelelő üregébe.
  - c. Dobja el a PCR-lemezt.
  - d. Keverje össze minden üreg tartalmát 10-szeri felszívással és kieresztéssel. Alternatív megoldásként zárja le a lemezt, és rázza 1800 fordulat/perc sebességgel 1 percig.
6. Inkubálja szobahőmérsékleten 5 percig.

7. Ellenőrizze, hogy vannak-e légbuborékok. Ha láthatók, centrifugálja le.
8. Helyezze egy MIDI-lemeznek való mágneses állványra, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (5 perc).
9. A gyöngyök megzavarása nélkül távolítsa el a felülúszót, és öntse ki.
10. Végezze el a gyöngyök mosását a következő módon:
  - a. A lemezt a mágneses állványon tartva, keverés nélkül adjon hozzá 200 µl friss 80%-os EtOH-t.
  - b. Inkubálja 30 másodpercig.
  - c. A gyöngyök megzavarása nélkül távolítsa el a felülúszót, és öntse ki.
11. Mossa meg a gyöngyöket **még egyszer**.
12. Levegőn szárítsa a mágneses állványon 5 percig.
13. A levegőn történő szárítás közben 20 µl-es pipettával távolítsa el a maradék EtOH-t, és öntse ki.
14. Vegye le a mágneses állványról.
15. Adjon 17 µl RSB-t a gyöngyökhöz.
16. Zárja le a lemezt, és rázza 1800 fordulat/perc sebességgel 2 percig.
17. Inkubálja szobahőmérsékleten 2 percig.
18. Ellenőrizze, hogy vannak-e légbuborékok. Ha láthatók, centrifugálja le.
19. Helyezze a lemezt egy MIDI-lemeznek való mágneses állványra, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (2 perc).
20. Vigyen át 15 µl felülúszót egy új 96-üregű PCR -lemezre.

## BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha abbahagyja az eljárást, zárja le a lemezt, majd -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolja legfeljebb 30 napig.

## Előre dúsított könyvtárak összekeverése

Ebben a lépésben történik az egyedi indexekkel rendelkező DNS-könyvtárak összekeverése egy legfeljebb 12 könyvtárból álló keverékbe.

### Keverékkészítési módszerek

A keverékkészítés végezhető térfogat vagy tömeg szerint. Az alábbi táblázat segítségével határozza meg az alkalmazandó módszert.

2. táblázat Ajánlott keverékkészítési módszerek

Bevitt minta	Keverékkészítési módszer
10–49 ng gDNS	Tömeg alapján
50–1000 ng gDNS	Térfogat alapján
FFPE szövetből kivont gDNS	Tömeg alapján
Vérből kivont gDNS	Térfogat alapján



- Az egy-plex dúsítás nem igényel keverékkészítést az előre dúsított könyvtárakból. Az RSB hozzáadása azonban szükséges lehet.
- Az előre dúsított könyvtárak mennyiségi mérése után az optimális indexegyensúly elérése érdekében összekeverhető az összes bemeneti mintatípus tömeg szerint.
- A különböző kísérleti készítményekben eltérő lehet az előre dúsított könyvtárak végső hozama. Ezért az optimális indexegyensúly elérése érdekében ajánlott a tömeg szerinti keverékkészítés.
- Végezzen 1-plex dúsítást a következő helyzetekben.
  - 10–49 ng gDNS
  - 50–1000 ng FFPE mintából kivont gDNS
  - Alacsony gyakoriságú allélok kimutatása szomatikus variánsok azonosításához.

## Keverékkészítés tömeg alapján

A következő helyzetekben az [Előre dúsított könyvtárak összekeverése azonos koncentrációban, 33. oldal](#) című részben leírt módon végezze el a könyvtárak mennyiségi meghatározását, és a dúsításhoz a könyvtárankénti DNS-tömeget használja.

- 10–49 ng gDNS-minta bevitele
- 50–1000 ng FFPE szövetből kivont gDNS-minta bevitele
- Alacsony gyakoriságú allélok kimutatása szomatikus variánsok azonosításához
- Vérből kivont gDNS az optimális indexegyensúly érdekében

## Előre dúsított könyvtárak mennyiségi értékelése

1. Futtasson le 1 µl-t az előre feldúsított könyvtárakból a választott dsDNS-interkalációs festékkel végzett fluoreszcenciás mennyiségi meghatározási módszerrel.
  - 50–1000 ng kiváló minőségű gDNS esetén  $\geq 500$  ng előre dúsított könyvtár várható.
  - FFPE szövetből kivont 50–1000 ng gDNS esetén a kiindulási minta minőségétől függően 500–6000 ng előre dúsított könyvtár várható.

**MEGJEGYZÉS** A különböző torzításokkal járó mennyiségi meghatározási módszereket minősíteni kell az erre a munkafolyamatra való használatra. Az eredményként kapott koncentrációk eltérők lehetnek az alkalmazott módszertől függően.

## Előre dúsított könyvtárak összekeverése azonos koncentrációban

A következő táblázat segítségével határozza meg a könyvtáranként a dúsításhoz szükséges DNS-tömeget a minta típusától és a dúsítás plexitásától függően. Az ajánlottnál kisebb mennyiségű elődúsított könyvtár használata esetében az optimális dúsítási hozam és a vizsgálat teljesítménye nem garantált.

A dúsítási reakcióhoz használt teljes DNS-tömeg nem haladhatja meg a 6000 ng-ot.

Bevitt minta	Dúsítás plexitása	DNS-tömeg könyvtáranként (ng)	Összes könyvtár DNS-tömege (ng)
Kiváló minőségű gDNS	12	250–500	3000–6000
FFPE szövetből kivont gDNS	1	200	200

1. Ebben a lépésben rögzítse az összekeverni kívánt könyvtárak indexeit.
2. Az egyes könyvtárak koncentrációja alapján számítsa ki, hogy mekkora térfogatot kell hozzáadni a dúsítási reakcióhoz a szükséges DNS-tömeg eléréséhez.
  - Kiváló minőségű gDNS: Számítsa ki a 250–500 ng bemenethez szükséges könyvtártérfogatot.
  - FFPE-ből kivont gDNS: Számítsa ki a 200 ng bemenethez szükséges könyvtártérfogatot.
3. Adja az egyes könyvtárakból a kiszámított térfogatot a PCR-lemez egyazon üregébe.
4. Ha kiváló minőségű gDNS-t használ, végezze el az alábbiak egyikét az összekevert, előre dúsított könyvtárak teljes térfogatától függően:
  - Ha az előre dúsított könyvtár térfogata = 30 µl, folytassa a [Próbák hibridizálása, 36. oldal](#) című részben leírt lépésekkel.
  - Ha az elődúsított könyvtár térfogata < 30 µl, adjon hozzá annyi RSB-t, hogy elérje a 30 µl össztérfogatot.
  - Ha az előre dúsított könyvtár térfogata > 30 µl, használjon gyöngyalapú módszert vagy vákuumkoncentrátort az összekevert minta koncentrálásához. Adjon RSB-t a koncentrált összekevert mintához, hogy az össztérfogat 30 µl legyen.
5. Ha FFPE szövetből kivont gDNS-t használ, végezze el az alábbiak egyikét az összekevert, előre dúsított könyvtárak teljes térfogatától függően:
  - Ha az előre dúsított könyvtár térfogata = 7,5 µl, folytassa a [Próbák hibridizálása, 36. oldal](#) című részben leírt lépésekkel.
  - Ha az elődúsított könyvtár térfogata < 7,5 µl, adjon hozzá annyi RSB-t, hogy elérje a 7,5 µl össztérfogatot.

## BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha abbahagyja az eljárást, zárja le a lemezt, majd -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolja legfeljebb 30 napig.

## Keverékkészítés térfogat alapján

Ha a bemenet 50–1000 ng gDNS, nincs szükség az ugyanabban a kísérletben létrehozott egyedi könyvtárak számszerűsítésére és normalizálására.

Az optimális teljesítmény elérése érdekében csak az azonos felhasználó által és ugyanazzal a reagenstétellel és indexadapter-lemezzel készített, előre dúsított könyvtármintákat keverje össze.

1. Ebben a lépésben rögzítse az összekeverni kívánt könyvtárak indexeit.
2. Adja egy új PCR-lemez egyetlen üregébe a következő, a dúsítási plexitáshoz való mennyiségű elődúsított könyvtárakat és RSB-t.

Az így kapott térfogat 30 µl.

Dúsítás plexitása *	Az egyes elődúsított könyvtárak térfogata (µl)	RSB-térfogat (µl)
1-plex	14	16
2-plex	14	2
3-plex	10	0
4-plex	7,5	0
5-plex	6	0
6-plex	5	0
7-plex	4,2	0,6
8-plex	3,7	0,4
9-plex	3,3	0,3
10-plex	3	0
11-plex	2,7	0,3
12-plex	2,5	0

\*A nem szabványos plexitásról (2-plex–11-plex közötti) szóló információkért lásd: [Az eljárás korlátai, 2. oldal](#).

### BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha abbahagyja az eljárást, zárja le a lemezt, majd -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolja legfeljebb 30 napig.

## [Opcionális] Előre dúsított könyvtárak minősítése

Ha térfogat szerinti összekeverés történik, az előre feldúsított könyvtárak mennyisége meghatározható fluorometriás módszerrel, dsDNS interkalációs festékkel. Az elődúsított könyvtárak minősítéséhez használjon DNS-fragmentum-analizátort a megfelelő fragmentumelemző készlettel.

Összesen 1 µl oldatot használjon a könyvtár minősítéséhez. Az előre dúsított könyvtárak megfelelően koncentráltak, így csak kis mennyiségek szükségesek a mennyiségi meghatározáshoz vagy a fragmentumelemzéshez.

## Próbák hibridizálása

Ebben a lépésben történik a DNS vizsgált területeinek kötése befogó próbákkal.

Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit reagensei kompatibilisek mind az Illumina, mind a harmadik fél által forgalmazott DNS-dúsító oligonukleotid-panelekkel. A harmadik féltől származó panelek szükséges specifikációit lásd: [A dúsítópróba-panelekkel szembeni követelmények, 9. oldal](#).

### Fogyóeszközök

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (kék kupak)
- Dúsítópróba-panel
- 96 üregű PCR-lemez
- Öntapadós zárófolia
- Készítse elő a későbbi eljárásokhoz:
  - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
  - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (narancssárga kupak)

### A reagensek ismertetése

- Az NHB2 kicsapódik és elválik a tárolás során.
- A dúsítópróba-panel a kiválasztott, az Illumina által készített dúsító oligonukleotid-panelet jelenti.

### Előkészítés

1. Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Elem	Tárolás	Utasítások
EHB2	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Vortexeléssel keverje össze. Ha kristályok és zavarosság látható, ismételje meg a vortexelést, vagy fel-le pipettázva keverje az oldatot, amíg tiszta nem lesz.
Dúsítópróba-panel	-25 °C és -15 °C között (Illumina)	Mind az Illumina, mind a másféle gyártók paneljei esetében hozza szobahőmérsékletre. Vortexeléssel keverje össze.

Elem	Tárolás	Utasítások
NHB2 (kék kupak)	-25 °C és -15 °C között	<p>Olvassa fel szobahőmérsékleten.</p> <p>Ha szobahőmérsékleten van, melegítse elő a mikrominta-inkubátoron a használt próbával azonos hőmérsékletre 5 percig.</p> <p>Az újraszuspendáláshoz vortexelje 3 alkalommal 10-10 másodpercig maximális sebességgel.</p> <p>Röviden centrifugálja.</p> <p>A cső aljáról pipetázzon fel és le.</p> <p>Ha kristályok és zavarosság látható, ismételje meg a vortexelést, vagy fel-le pipetázva keverje az oldatot, amíg tiszta nem lesz.</p> <p>Melegen használja, hogy ne csapódjon ki újra.</p>
SMB3*	2 °C és 8 °C között	<p>Ha a HYB-programban végzett 90 perces várakozás után azonnal folytatja a következő lépéssel, a HYB-program elkezdése előtt legalább 2 órával hozza szobahőmérsékletre.</p>
EEW* (narancssárga cső)	-25 °C és -15 °C között	<p>Ha a HYB-programban végzett 90 perces várakozás után azonnal folytatja a következő lépéssel, a HYB-program elkezdése előtt legalább 2 órával hozza szobahőmérsékletre.</p> <p>Ha szoba-hőmérsékletű, melegítse elő a mikrominta-inkubátorban az alkalmazandó hibridizációs és befogási hőmérsékletre a HYB program befejezése előtti 30 percben.</p>

\*Ha a következő lépés előtt abbahagyja a feldolgozást, a reagenst csak a következő lépéssel való folytatáskor készítse el.

2. Mentse el a következő HYB-programot az inkubátoron az [3. táblázat](#) megadott számú ciklus használatával.

- Válassza az előfűtött fedél lehetőséget, és állítsa be 100 °C-ra
- Állítsa be a reakciótérfogatot.
  - [Kiváló minőségű gDNS ] 100 µl
  - [FFPE szövetből kivont gDNS] 25 µl
- 98 °C 5 percig
- X ciklus egyenként 1 percig, az első ciklus 98°C-on, majd ciklusonként 2°C-kal csökkentett hőmérsékleten.
- Tartsa 90 percig a megfelelő hőmérsékleten:
  - [FFPE szövetből kivont gDNS] 58 °C
  - [80 oligonukleotid hosszúságú próbapanelek] 58 °C

- [Szomatikus variánsazonosítás] 58 °C
- [Minden egyéb esetben] 62 °C

A teljes futási idő ~115 perc.

### 3. táblázat Ciklusok száma mintától és a paneltől függően

Minta és panel típusa	Ciklusok száma (X)
FFPE szövetből kivont gDNS (függetlenül a panel típusától)	20
80 oligonukleotid hosszúságú próbapanelek (a minta típusától függetlenül)	20
Szomatikus variánsazonosítás	20
Minden más minta és panel	18

## Eljárás

1. [Kiváló minőségű gDNS] Adja a következő reagenseket *a megadott sorrendben* a PCR-lemezen lévő mindegyik összekevert könyvtárhoz.  
Ne készítsen főkeveréket. Az NHB2-ből és az EHB2-ből készített főkeverék létrehozása rontja a dúsítási teljesítményt.
  - NHB2 (kék kupak) (50 µl)
  - Dúsítópróba-panel (10 µl)
  - EHB2 (10 µl)
2. [Kiváló minőségű gDNS] Egy 90 µl-re beállított pipettával mindegyik üreg tartalmát 10-szeri fel-le pipettázással keverje össze.
3. [FFPE szövetből kivont gDNS] Adja a következő reagenseket *a megadott sorrendben* a PCR-lemezen lévő mindegyik összekevert könyvtárhoz.  
Ne készítsen főkeveréket. Az NHB2-ből és az EHB2-ből készített főkeverék létrehozása rontja a dúsítási teljesítményt.
  - NHB2 (kék kupak) (12,5 µl)
  - Dúsítópróba-panel (2,5 µl)
  - EHB2 (2,5 µl)
4. [FFPE szövetből kivont gDNS] Egy 20 µl-re beállított pipettával mindegyik üreg tartalmát 10-szeri fel-le pipettázással keverje össze.
5. Zárja le a emezt, és centrifugálja 280 g-vel 10 másodpercig.
6. Helyezze a mintalemezt az előre beprogramozott inkubátorba, és futtassa a HYB programot.
7. Amikor a HYB program hőmérséklet-tartási ideje lejár, azonnal folytassa a következő művelettel.



## FIGYELEM!

Kicsapódás következik be, ha a hibridizálási reakció szobahőmérsékletnél alacsonyabb hőmérsékleten történik.

## Hibridizált próbák befogása

Ebben a lépésben a vizsgált területekhez hibridizált próbák befogása történik streptavidinnel bevont mágneses gyöngyökkel (SMB3).

### Fogyóeszközök

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (narancssárga kupak)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2 N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5 ml-es mikrocentrifuga-cső
- 96 üregű MIDI-lemez
- 96 üregű PCR-lemez
- Öntapadós zárófolia
- MIDI-lemezhez való mágneses állvány
- Készítse elő a későbbi eljárásokhoz:
  - Enhanced PCR Mix (EPM)
  - PCR Primer Cocktail (PPC)

## A reagensek ismertetése

- EEW
  - Győződjön meg arról, hogy az EEW-t legalább 2 órán át szobahőmérsékleten felolvasztották, mielőtt a mikrominta-inkubátorban előmelegítené.
  - Győződjön meg arról, hogy az EEW-t 30 percig melegítették mikrominta-inkubátorban a HYB program befejeződése előtt.
  - Használaton kívül hagyja az EEW-t a mikrominta-inkubátorban. Az EEW-nek a protokoll teljes időtartama alatt melegítve kell maradnia.
  - Szobahőmérséklet elérése után zavaros lehet.
  - Sárgás színű lehet.
- SMB3
  - Az SMB3-nak használat előtt szoba-hőmérsékletűnek kell lennie.

## Előkészítés

1. Készítse elő a következő fogyóeszközöket.

Elem	Tárolás	Utasítások
SMB3	2 °C és 8 °C között	Hagyja állni 2 óráig, hogy szobahőmérsékletre melegedjen. Fordítsa fel, majd vortexelje, amíg teljesen reszuszpendálódik.
EEW (narancssárga cső)	-25 °C és -15 °C között	A 2 órás szoba-hőmérsékletű inkubációt követően melegítse elő a mikrominta-inkubátorban az alkalmazandó hibridizációs és befogási hőmérsékletre a HYB program befejezése előtti 30 percben.
EE1	-25 °C és -15 °C között	Olvassza fel szobahőmérsékleten, majd vortexelje.
HP3	-25 °C és -15 °C között	Olvassza fel szobahőmérsékleten, majd vortexelje.
ET2	2 °C és 8 °C között	Hozza szobahőmérsékletre. Vortexeléssel keverje össze.
EPM	-25 °C és -15 °C között	Olvassza fel jégen 1 órán át. Forgassa meg, hogy elkeveredjen, majd röviden centrifugálja. Tegye félre jégre.
PPC	-25 °C és -15 °C között	Olvassza fel jégen 1 órán át. Vortexeléssel keverje össze, és rövid ideig centrifugálja. Tegye félre jégre.

2. Melegítsen elő egy mikrominta-inkubátort egy MIDI hőblokk betéttel a mintalemez inkubálásához az alábbi hőmérsékletek egyikére. Egy opcionális második mikrominta-inkubátor használható az EEW előmelegítésére. Helyezze az EEW-t a MIDI hőblokk betét tetejére.

- [FFPE] 58 °C



- [80 oligonukleotid hosszúságú próbapanelek] 58 °C
- [Szomatikus variánsazonosítás] 58 °C
- [Minden egyéb esetben] 62 °C

## Eljárás

### Befogás

1. Adagoljon SMB3-at egy új MIDI-lemez megfelelő üregébe az alábbiak szerint.
  - **[Kiváló minőségű gDNS]** Adjon hozzá 250 µl SMB3-at.
  - **[FFPE-ből kivont gDNS]** Adjon hozzá 62,5 µl SMB3-at.
2. 100 µl-re beállított pipettával kiváló minőségű gDNS esetén, illetve 25 µl-re beállított pipettával FFPE esetén vigye át az összekevert könyvtárakat a 96 üregű PCR-lemezből az új MIDI-lemez megfelelő üregébe.
3. Zárja le a lemezt, és rázza 1200 fordulat/perc sebességgel 4 percig.
4. Ha a minta kiömlik, röviden centrifugálja a lemezt.
5. Helyezze az összekevert könyvtárak lemezét a mikrominta-inkubátor MIDI hőblokk betétjére, az EEW cső alá, zárja le a fedelet, majd inkubálja 15 percig az alkalmazandó hőmérsékleten:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80 oligonukleotid hosszúságú próbapanelek] 58 °C
  - [Szomatikus variánsazonosítás] 58 °C
  - [Minden egyéb esetben] 62 °C
6. Távolítsa el az összekevert könyvtárakat tartalmazó lemezt, és centrifugálja 280 g-vel 30 másodpercig.
7. Azonnal helyezze a MIDI-lemez mágneses állványára, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (2 perc).
8. **[Kiváló minőségű gDNS]** Egy 200 µl-re beállított pipetta segítségével távolítsa el és dobja el az összes felülúszó folyadékot mindegyik üregből anélkül, hogy megzavarná a gyöngyöket tartalmazó pelletet.
9. **[FFPE-ből kivont gDNS]** Egy 90 µl-re beállított pipetta segítségével távolítsa el és dobja el az összes felülúszó folyadékot mindegyik üregből anélkül, hogy megzavarná a gyöngyöket tartalmazó pelletet.
10. Szívja le, és öntse ki az összes többi felülúszót.

## Mosás

1. Vegye le a mágneses állványról.
2. **[Kiváló minőségű gDNS]** Gyorsan vegye ki az EEW-t a mikrominta-inkubátorból, és adjon 200 µl-t mindegyik üregbe.
3. **[FFPE szövetből kivont gDNS]** Gyorsan vegye ki az EEW-t a mikrominta-inkubátorból, és adjon 50 µl-t mindegyik üregbe.
4. A fel nem használt EEW-t tegye vissza a mikrominta-inkubátorba, és tartsa melegen.
5. Zárja le, és rázza 1800 fordulat/perc sebességgel 4 percig.
6. Helyezze a minta lemezt a mikrominta-inkubátor MIDI hőblokk betétjére, az EEW cső alá, zárja le a fedelet, majd inkubálja 5 percig a megfelelő hőmérsékleten:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80 oligonukleotid hosszúságú próbapanelek] 58 °C
  - [Szomatikus variánsazonosítás] 58 °C
  - [Minden egyéb esetben] 62 °C
7. Azonnal helyezze a MIDI-lemez mágneses állványára, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (2 perc).
8. Kiváló minőségű gDNS esetén 200 µl-re, illetve FFPE szövetből származó gDNS esetén 50 µl-re állított pipettával szívja le és öntse ki az összes felülúszót minden üregből.
9. Ismételje meg az 1–8. lépést még kétszer, hogy összesen három mosást végezzen.

## Átviteli mosás

1. Vegye le a mágneses állványról.
2. **[Kiváló minőségű gDNS]** Gyorsan vegye ki az EEW-t a mikrominta-inkubátorból, és adjon 200 µl-t mindegyik üregbe.
3. **[FFPE szövetből kivont gDNS]** Gyorsan vegye ki az EEW-t a mikrominta-inkubátorból, és adjon 50 µl-t mindegyik üregbe.
4. Zárja le, és rázza 1800 fordulat/perc sebességgel 4 percig. Ha fröcskölés lép fel, csökkentse a fordulatszámot 1600 fordulat/percre.
5. Vigye át a reszuszpendált gyöngyoldatot egy új MIDI-lemezre. Valamennyi minta az üregekben maradhat.



### FIGYELEM!

A reagens átvitele minimalizálja a maradék reagensek átvitelét, amelyek gátolhatják a későbbi PCR-t.

6. Helyezze a mintalemezt a mikrominta-inkubátor MIDI hőblokk betétjére, zárja le a fedelet, majd inkubálja 5 percig a megfelelő hőmérsékleten:
  - [FFPE] 58 °C

- [80 oligonukleotid hosszúságú próbapanelek] 58 °C
  - [Szomatikus variánsazonosítás] 58 °C
  - [Minden egyéb esetben] 62 °C
7. Azonnal helyezze a MIDI-lemez mágneses állványára, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (2 perc).
  8. Kiváló minőségű gDNS esetén 200 µl-re, illetve FFPE szövetből származó gDNS esetén 50 µl-re állított pipettával szívja le és öntse ki az összes felülúszót minden üregből.
  9. Centrifugálja a lemezt 280 g-vel 30 másodpercig.
  10. Helyezze a MIDI-lemez mágneses állványára 10 másodpercre.
  11. 20 µl-es pipettával minden üregből távolítsa el a maradék folyadékot, és öntse ki.
  12. Azonnal folytassa az [Elúció, 43. oldal](#) című résszel, hogy megakadályozza a gyöngyök túlzott kiszáradását és a könyvtár mennyiségének csökkenését.

## Elúció

1. Az elúciós főkeverék elkészítéséhez keverje össze az alábbi térfogatú anyagokat. Mindegyik térfogatot szorozza meg a feldolgozandó könyvtárkeverékek számával.
  - EE1 (28,5 µl)
  - HP3 (1,5 µl)A reagenstöbbltet a térfogat tartalmazza.
2. Vortexelje, majd rövid ideig centrifugálja.
3. Vegye le a MIDI-lemezt a mágneses állványról.
4. Adjon 23 µl elúciós főkeveréket mindegyik üregbe.
5. Zárja le a lemezt, és rázza 1800 fordulat/perc sebességgel 2 percig.
6. Inkubálja a lemezt szobahőmérsékleten 2 percig.
7. Centrifugálja 280 g-vel 30 másodpercig.
8. Helyezze egy MIDI-lemeznek való mágneses állványra, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (2 perc).
9. Vigyen át 21 µl felülúszót a MIDI-lemez mindegyik üregéből az új 96 üregű PCR-lemez megfelelő üregébe.
10. Dobja el a MIDI-lemezt.
11. Adjunk 4 µl ET2-t mindegyik üregbe, amely 21 µl felülúszót tartalmaz.
12. Állítsa a pipettát 20 µl-re, és lassan pipettázza fel és le mindegyik üreg tartalmát 10-szer, hogy összekeveredjen.
13. Zárja le a lemezt, és centrifugálja 280 g-vel 10 másodpercig.
14. Inkubálja a lemezt szobahőmérsékleten 1 percig.

## Dúsított könyvtár amplifikációja

Ebben a lépésben a dúsított könyvtár amplifikálása történik PCR-rel.

## Fogyóeszközök

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Öntapadós zárófólia

## Előkészítés

1. Készítse elő a következő fogyóeszközöket:

Elem	Tárolás	Utasítások
EPM	-25 °C és -15 °C között	Olvassza fel 4 °C-on vagy jégen 1 órán át. Forgassa meg, hogy elkeveredjen, majd röviden centrifugálja. Tegye félre jégre.
PPC	-25 °C és -15 °C között	Olvassza fel 4 °C-on vagy jégen 1 órán át. Vortexeléssel keverje össze, és rövid ideig centrifugálja. Tegye félre jégre.

2. Mentse el a következő AMP-programot az inkubátoron az alábbi táblázatban megadott számú PCR-ciklus használatával.

- Válassza az előfűtött fedél lehetőséget, és állítsa be 100 °C-ra
- Állítsa a reakciótérfogatot 50 µl-re
- 98 °C 45 másodpercig
- X ciklus a következők szerint:
  - 98 °C 30 másodpercig
  - 60 °C 30 másodpercig
  - 72°C 30 másodpercig
- 72°C 5 percig
- Tárolás 10 °C-on

A teljes futási idő ~35 perc.

Minta és panel típusa	X ciklus
FPPE	14
illumina Exome Panel (CEX) kiváló minőségű cDNS-hez	10
illumina Exome Panel (CEX) FFPE-hez	12
Minden más minta és panel	12 <sup>1234</sup>

<sup>1</sup> Kisebbségi, harmadik féltől származó panelek esetében utólagos optimalizálással beállítható legfeljebb 15 ciklusra. FFPE használata esetén a ciklusok száma beállítható legfeljebb 17-ig.

<sup>2</sup> A harmadik féltől származó, csak 500 próbával rendelkező panelek esetében beállítható legfeljebb 17 ciklusig. FFPE használata esetén a ciklusok száma beállítható legfeljebb 19-ig.

<sup>3</sup> FFPE minták esetében beállítható legfeljebb 14 ciklusig.

<sup>4</sup> A PCR-ciklusok számának növelése magasabb duplikációs arányt és kisebb fragmentumméretet eredményezhet FFPE minták esetében.

## Eljárás

1. Adjon 5 µl PPC-t mindegyik üregbe.
2. Adjon 20 µl EPM-et mindegyik üregbe.
3. Zárja le a lemezt, és rázza 1200 fordulat/perc sebességgel 1 percig.
4. Centrifugálja a lemezt 280 g-vel 10 másodpercig.
5. Helyezze az előre beprogramozott inkubátorba, és futtassa az AMP programot.

## BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha abbahagyja az eljárást, 2 °C és 8 °C közötti hőmérsékleten legfeljebb két napig tárolható. Másik lehetőségként az inkubátorban hagyhatja legfeljebb 24 óráig.

## Amplifikált, dúsított könyvtár tisztítása

Ebben a lépésben történik a dúsított könyvtár megtisztítása és a nem kívánt termékek eltávolítása tisztító gyöngyökkel.

## Fogyóeszközök

- CB (Cleanup Beads, tisztító gyöngyök)
- RSB (Resuspension Buffer, reszuszpenziós puffer)
- Frissen elkészített 80%-os etanol (EtOH)
- Öntapadós zárófoliák
- 96 üregű MIDI-lemez
- 96 üregű PCR-lemez
- MIDI-lemezhez való mágneses állvány

## A reagensek ismertetése

- Tisztító gyöngyök
  - Használat előtt mindig végezzen vortexelést.
  - Gyakran végezzen vortexelést, hogy a gyöngyök egyenletesen oszoljanak el.
  - Az oldat viszkozitása miatt lassan szívja fel, és lassan adagolja ki.

## Előkészítés

1. Készítse elő a következő fogyóeszközöket.

Elem	Tárolás	Utasítások
CB	Szobahőmérséklet	Vortexelje, és felfordítással keverje össze, amíg a folyadék színe homogén nem lesz.
RSB	2 °C–8 °C	Hozza szobahőmérsékletre. Vortexeléssel keverje össze.

- Abszolút etanolból készítsen frissen 80%-os etanolt.

## Eljárás

- Centrifugálja a PCR-lemezt 280 g-vel 10 másodpercig.
- Vortexelje a tisztító gyöngyöket 3-szor 10 másodpercig, majd fordítsa meg.
- Adjon 40,5 µl CB-t egy új **MIDI**-lemez mindegyik üregébe.
- Vigyen át 45 µl-t a PCR-lemez mindegyik üregéből a MIDI-lemez megfelelő üregébe.
- Zárja le a lemezt, és rázza 1800 fordulat/perc sebességgel 1 percig.
- Inkubálja a MIDI-lemezt szobahőmérsékleten 5 percig.
- Centrifugálja 280 g-vel 10 másodpercig.
- Helyezze egy MIDI-lemeznek való mágneses állványra, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (5 perc).
- 95 µl-re állított pipettával szívja le és öntse ki az összes felülúszót minden üregből.
- Mossa meg kétszer a következők szerint.
  - A lemezt a mágneses állványon tartva, keverés nélkül adjon hozzá 200 µl friss 80%-os EtOH-t.
  - Inkubálja 30 másodpercig.
  - A gyöngyök megzavarása nélkül távolítsa el a felülúszót, és öntse ki.
- Levegőn szárítsa a mágneses állványon 5 percig.
- A levegőn történő szárítás közben 20 µl-es pipettával minden üregből távolítsa el a maradék EtOH-t, és öntse ki.
- Vegye le a mágneses állványról, és minden üregbe adjon 32 µl RSB-t.
- Zárja le a lemezt, és rázza 1800 fordulat/perc sebességgel 1 percig.
- Inkubálja a lemezt szobahőmérsékleten 5 percig.
- Centrifugálja 280 g-vel 10 másodpercig.
- Helyezze egy MIDI-lemeznek való mágneses állványra, és várjon, amíg a folyadék kitisztul (2 perc).
- Vigyen át 30 µl felülúszót a 96 üregű MIDI-lemez mindegyik üregéből az új PCR-lemez megfelelő üregébe.
- Dobja el a MIDI-lemezt.

## BIZTONSÁGOS MEGSZAKÍTÁSI PONT

Ha abbahagyja az eljárást, zárja le a lemezt, majd -25 °C és -15 °C közötti hőmérsékleten tárolja legfeljebb 7 napig.

## A dúsított könyvtárak ellenőrzése

A kettős szálú DNS-ből álló bemenet mennyiségi meghatározásához alkalmazzon interkalációs festékkel végzett fluoreszcenciás eljárást. Ne használjon az összes nukleinsavat mérő módszereket, például a NanoDrop vagy más UV-abszorbanációs módszereket.

- Végezze 1 µl dúsított könyvtár mennyiségi meghatározását az Ön által választott módszerrel.

**MEGJEGYZÉS** A próba teljes molaritása arányosan befolyásolja a dúsítás utáni könyvtárhozamot.

Várhatóan a fragmentumok átlagos mérete 125–235 bp, és a DNS-fragmentumok mérettartománya ~200 bp és ~1000 bp között változik.

## Könyvtárak hígítása kezdeti koncentrációra

Ebben a lépésben történik a könyvtárak hígítása a szekvenálórendszer kiindulási koncentrációjára; ez az első lépés a sorozatos hígításban. A kiindulási koncentrációra történő hígítás után a könyvtárak készen állnak a denaturálásra és a végleges betöltési koncentrációra történő hígításra.

A szekvenáláshoz, függetlenül a használt dúsító próbapaneltől, az Illumina páros végű futtatás beállítását ajánlja beolvasásonként 151 (2 × 151) ciklussal és indexleolvasásonként 10 ciklussal. Ha kevesebb átfedő leolvasást vagy kevesebb nyers lefedettségű adatot szeretne, akkor a ciklusszám lecsökkenthető 2 × 126-ra vagy 2 × 101-re.

- Számítsa ki a könyvtár vagy az összekevert könyvtárak molaritási értékét a következő képlet segítségével.
  - A DNS-fragmentelemzővel minősített könyvtárak esetében használja a könyvtárra kapott átlagos méretet.
  - Minden más minősítési módszer esetében 350 bp-t használjon átlagos könyvtárméretként.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{átlagos könyvtárméret (bp)}} = \text{Molszám (nM)}$$

Például, ha a könyvtár koncentrációja 20 ng/µl és az átlagos méret 350 bp, a kapott molaritási érték 86,58 nM.

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

- A molaritás alapján számítsa ki a könyvtáraknak az Ön rendszeréhez való kezdeti koncentrációjára történő hígításához szükséges RSB és könyvtár térfogatát.

Szekvenálórendszer	Minimálisan szükséges könyvtártérfogat (µl)	Kezdeti koncentráció (nM)	Végleges betöltési koncentráció (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2

Szekvenálórendszer	Minimálisan szükséges könyvtártérfogat (µl)	Kezdeti koncentráció (nM)	Végleges betöltési koncentráció (pM)
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) vagy 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 350 pM végső betöltési koncentrációhoz 1,75 nM kezdeti koncentráció szükséges. Ha szükséges, állítsa be a végleges betöltési koncentrációt az alábbi táblázat alapján.

Végleges betöltési koncentráció (pM)	Összekevert könyvtár koncentrációja (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500ú	2,50

3. Könyvtárak hígítása RSB használatával:

- **Multiplexelt könyvtárkeverékként számszerűsített könyvtárak:** Hígítsa a keveréket a rendszernek megfelelő kiindulási koncentrációra.
- **Egyenként számszerűsített könyvtárak:** Hígítsa mindegyik könyvtárat a rendszernek megfelelő kiindulási koncentrációra. A multiplexelt könyvtárkeverék létrehozásához adjon egy csőbe mindegyik hígított könyvtárból 10 µl-t.

4. A végleges betöltési koncentrációra való hígítást végezze a rendszer denaturálási és hígítási utasításai szerint.

- A NextSeq 550Dx rendszer esetében lásd: [Előkészületek a szekvenáláshoz a NextSeq 550Dx készülékkel, 49. oldal.](#)
- Az MiSeqDx rendszer esetében lásd: [Előkészületek a szekvenáláshoz az MiSeqDx készülékkel, 50. oldal.](#)
- A NovaSeq 6000Dx rendszer esetében lásd: [Előkészületek a szekvenáláshoz a NovaSeq 6000Dx készülékkel, 52. oldal.](#)



A végleges betöltési koncentrációk kiindulópontként és általános iránymutatásként szolgálnak. A későbbi szekvenálási futtatások során optimalizálja a koncentrációkat az Ön munkafolyamatához és mennyiségi meghatározási módszeréhez vagy áramlási cellás titrálással.

## Előkészületek a szekvenáláshoz a NextSeq 550Dx készülékkel

A NextSeq 550Dx szekvenáló rendszeren történő szekvenáláshoz kövesse az alábbi könyvtár-denaturálási és hígítási utasításokat.

### Fogyóeszközök

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

### Előkészítés

A könyvtárak szekvenálásához szükséges denaturáláshoz készítsen *frissen* 0,2 N NaOH-ot. Annak elkerülésére, hogy a kis pipettázási hibák befolyásolják a NaOH végső koncentrációját, nagyobb mennyiséget kell készíteni.



#### FIGYELEM!

A frissen hígított 0,2 N NaOH elengedhetetlen a denaturálási eljáráshoz. A nem megfelelő denaturálás csökkentheti a hozamot.

- Adja az alábbi mennyiségeket egy mikrocentrifuga-csőbe az 1 N NaOH-ból 0,2 N NaOH oldat elkészítéséhez:
- Készítse elő a következő fogyóeszközöket.

Elem	Tárolás	Utasítások
HT1	-25 °C és -15 °C között	Olvassa fel szobahőmérsékleten. Tárolja 2 °C és 8 °C között, amíg készen nem áll a denaturált könyvtárak hígítására.

- Adja az alábbi mennyiségeket egy mikrocentrifuga-csőbe a friss NaOH oldat elkészítéséhez:
  - Laboratóriumi minőségű víz (800 µl)
  - 1 N NaOH (200 µl)
 Az eredmény 1 ml 0,2 N NaOH.
- Keverje össze a kémcső több alkalommal történő átfordításával.
- Adja az alábbi mennyiségeket egy mikrocentrifuga-csőbe a 200 mM Tris-HCl, pH 7,0 elkészítéséhez:
  - Laboratóriumi minőségű víz (800 µl)
  - 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

Az eredmény: 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

**MEGJEGYZÉS** Hagyja a kupakot a csövön. A friss hígítást **12 órán** belül használja fel.

## Könyvtárak denaturálása

1. Helyezze az alábbi mennyiségű könyvtárat és frissen hígított 0,2 N NaOH-t egy mikrocentrifuga-csőbe.
  - 10 µl könyvtár
  - 10 µl 0,2 N NaOH
2. Röviden vortexelje, majd centrifugálja 280 g-vel 1 percen keresztül.
3. Inkubálja szobahőmérsékleten 5 percig.
4. Adjon hozzá 10 µl 200 mM Tris-HCl-t (pH 7).

## Denaturált könyvtárak hígítása 20 pM-ra

1. Adjon 970 µl előhűtött HT1-et a denaturált könyvtárat tartalmazó csőbe.  
Az eredmény 20 pM denaturált könyvtár.
2. Röviden vortexelje, majd centrifugálja 280 g-vel 1 percen keresztül.
3. Tegye a 20 pM könyvtárakat jégre, amíg készen nem áll a végső hígításra.

## Könyvtárak hígítása betöltési koncentrációra

1. Adja hozzá a következő mennyiségeket, hogy a denaturált 20 pM könyvtároldatot 1,2 pM-ra hígítsa.
  - Denaturált könyvtároldat (78 µl)
  - Előhűtött HT1 (1222 µl)A 1,2 pM koncentrációjú oldat teljes térfogata 1,3 ml.
2. Forgassa meg, hogy elkeveredjen, majd pulzáló centrifugálással centrifugálja.
3. Folytassa a szekvenálással. Az utasításokat lásd: *NextSeq 550Dx referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)*.

## Előkészületek a szekvenáláshoz az MiSeqDx készülékkel

A MiSeqDx szekvenáló rendszeren történő szekvenáláshoz kövesse az alábbi könyvtár-denaturálási és hígítási utasításokat.

### Fogyóeszközök

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1 N NaOH

## Előkészítés

A könyvtárak szekvenálásához szükséges denaturáláshoz készítsen *frissen* 0,2 N NaOH-ot. Annak elkerülésére, hogy a kis pipettázási hibák befolyásolják a NaOH végső koncentrációját, nagyobb mennyiséget kell készíteni.



### FIGYELEM!

A frissen hígított 0,2 N NaOH elengedhetetlen a denaturálási eljáráshoz. A nem megfelelő denaturálás csökkentheti a hozamot.

- Adja az alábbi mennyiségeket egy mikrocentrifuga-csőbe az 1 N NaOH-ból 0,2 N NaOH oldat elkészítéséhez:
- Készítse elő a következő fogyóeszközöket.

Elem	Tárolás	Utasítások
HT1	-25 °C és -15 °C között	Olvassza fel szobahőmérsékleten. Tárolja 2 °C és 8 °C között, amíg készen nem áll a denaturált könyvtárak hígítására.

- Adja az alábbi mennyiségeket egy mikrocentrifuga-csőbe a friss NaOH oldat elkészítéséhez:
  - Laboratóriumi minőségű víz (800 µl)
  - 1 N NaOH (200 µl)
 Az eredmény 1 ml 0,2 N NaOH.

**MEGJEGYZÉS** Hagyja a kupakot a csövön. A friss hígítást **12 órán** belül használja fel.

## 4 nM-os könyvtár denaturálása

- Helyezze az alábbi mennyiségeket egy mikrocentrifuga-csőbe.
  - 4 nM könyvtár (5 µl)
  - 0,2N NaOH (5 µl)
- Röviden vortexelje, majd centrifugálja 280 g-vel 1 percen keresztül.
- Inkubálja szobahőmérsékleten 5 percig.
- Adjon 990 µl előhűtött HT1-et a denaturált könyvtárat tartalmazó csőbe.  
Az eredmény 1 ml 20 pM denaturált könyvtár.

## A denaturált 20 pM könyvtár hígítása

- Hígítsa a kívánt koncentrációra a következő mennyiségekkel.

Koncentráció	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
<b>20 pM könyvtár</b>	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
<b>Előhűtött HT1</b>	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Forgassa meg, hogy elkeveredjen, majd pulzáló centrifugálással centrifugálja.
3. Folytassa a szekvenálással. Az utasításokat lásd: *MiSeqDx készülék referencia-útmutató az MOS v4-hez (dokumentumszám: 1000000157953)*.

## Előkészületek a szekvenáláshoz a NovaSeq 6000Dx készülékkel

A NovaSeq 6000Dx szekvenáló rendszeren történő szekvenáláshoz kövesse az alábbi könyvtár-denaturálási és hígítási utasításokat.

### Fogyóeszközök

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

### Előkészítés

A könyvtárak szekvenálásához szükséges denaturáláshoz készítsen *frissen* 0,2 N NaOH-ot. Annak elkerülésére, hogy a kis pipettázási hibák befolyásolják a NaOH végső koncentrációját, nagyobb mennyiséget kell készíteni.



#### FIGYELEM!

A frissen hígított 0,2 N NaOH elengedhetetlen a denaturálási eljáráshoz. A nem megfelelő denaturálás csökkentheti a hozamot.

1. Adja az alábbi mennyiségeket egy mikrocentrifuga-csőbe az 1 N NaOH-ból 0,2 N NaOH oldat elkészítéséhez:

4. táblázat S2 üzemmód

Reagens	Egy áramlási cellához szükséges térfogat (µl)	Két áramlási cellához szükséges térfogat (µl)
Laboratóriumi minőségű víz	40	80
1 N NaOH törzsoldat	10	20

E térfogatok 50 µl 0,2 N NaOH-t eredményeznek egy áramlási cellához vagy 100 µl 0,2 N NaOH-t két áramlási cellához.

5. táblázat S4 üzemmód

Reagens	Egy áramlási cellához szükséges térfogat (µl)	Két áramlási cellához szükséges térfogat (µl)
Laboratóriumi minőségű víz	80	160
1 N NaOH törzsoldat	20	40

E térfogatok 100 µl 0,2 N NaOH-t eredményeznek egy áramlási cellához vagy 200 µl 0,2 N NaOH-t két áramlási cellához.

- Az összekeveréshez többször fordítsa át vagy alaposan vortexelje.

**MEGJEGYZÉS** Hagyja a kupakot a csövön. A friss hígítást **12 órán** belül használja fel.

## Normalizált könyvtárkeverék létrehozása

A betöltési koncentráció változó lehet a könyvtár-előkészítési, mennyiségi meghatározási és normalizálási módszerektől függően.

A következő utasítások szerint normalizálja a könyvtárakat a megfelelő koncentrációra, majd keverje össze őket. Az ugyanazon áramlási cellán szekvenálandó könyvtárakat egyetlen normalizált keverékké kell egyesíteni.

**MEGJEGYZÉS** Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit készlet használatával sávonként legfeljebb 192 minta futtatható. E korlátot az UD Indexes Set A és UD Indexes Set B termékekben található UD-indexek teljes száma határozza meg.

## Könyvtárak normalizálása a keveréshez

- Határozza meg az összekevert könyvtár szükséges koncentrációját a kívánt végleges betöltési koncentráció alapján.
  - 350 pM végső betöltési koncentráció esetén az összekevert könyvtár szükséges koncentrációja 1,75 nM.
  - Másféle végleges betöltési koncentráció létrehozásához az összekevert könyvtár koncentrációjának meghatározását lásd: [Könyvtárak hígítása kezdeti koncentrációra, 47. oldal](#).
- Hígítsa a könyvtárat az összekevert könyvtár kívánt koncentrációjára 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) használatával.

A könyvtárak megfelelő koncentrációra történő hígításához segítséget nyújt az Illumina weboldalán található [keverési számító](#).

### Ajánlott betöltési koncentrációk

Az optimális betöltési DNS-koncentráció a könyvtár típusától és a betét méretétől függ. A 450 bp-nál nagyobb könyvtárak esetében nagyobb betöltési koncentrációra lehet szükség.

### Normalizált könyvtárak összekeverése és opcionális PhiX-kontroll hozzáadása

1. Keverje össze az egyes normalizált könyvtárakból a megfelelő mennyiséget egy új mikro-centrifugacsőben, hogy a következő végső térfogatok egyikét kapja:

Üzem mód	Végső térfogat (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Választható]** Adjon hozzá 1% nem denaturált PhiX-et az alábbiak szerint.
  - a. Hígítson 10 nM PhiX-et 2,5 nM-ra 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) hozzáadásával.
  - b. Adjon megfelelő mennyiségű nem denaturált 2,5 nM PhiX-et a nem denaturált könyvtárkeveréket tartalmazó csőbe.

Üzem mód	Nem denaturált 2,5 nM PhiX (µl)	Nem denaturált könyvtárkeverék (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

PhiX hozzáadása esetén 1% az ajánlott mennyiség a jól kiegyensúlyozott könyvtárakhoz. Alacsony diverzitású könyvtárak esetében nagyobb mennyiségre lehet szükség. Ha alacsony diverzitású könyvtárakkal kíván PhiX-kontrollt használni, forduljon útmutatásért az Illumina műszaki ügyfélszolgálatához.

### A könyvtárkeverék és az opcionális PhiX-kontroll denaturálása

1. Adjon 0,2 N NaOH-ot a nem denaturált könyvtárkeveréket és opcionálisan a PhiX-et tartalmazó csőbe az alábbiak szerint.

Áramlási cella	0,2 N NaOH	Nem denaturált könyvtárkeverék (µl)	Kapott térfogat
S2	37	150	187 µl, illetve PhiX hozzáadása esetén 187,9 µl
S4	77	310	387 µl, illetve PhiX hozzáadása esetén 388,9 µl

2. Helyezzen rá kupakot, majd rövid ideig vortexelje.
3. Centrifugálja 280 g-vel 1 másodpercig.
4. A denaturáláshoz inkubálja szobahőmérsékleten 8 percig.

5. A semlegesítéshez adjon hozzá 400 mM Tris-HCl (pH 8,0) oldatot az alábbiak szerint.

Üzem mód	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Kapott térfogat
S2	38	225 µl, illetve PhiX hozzáadása esetén 225,9 µl
S4	78	465 µl, illetve PhiX hozzáadása esetén 466,9 µl

6. Helyezzen rá kupakot, majd rövid ideig vortexelje.
7. Centrifugálja 280 g-vel 1 másodpercig.
8. A denaturált könyvtár, illetve a denaturált könyvtár és PhiX teljes térfogatát helyezze át a NovaSeq 6000Dx könyvtárcsőbe.
9. Folytassa a szekvenálással. Az utasításokat lásd: *NovaSeq 6000Dx készülék termékdokumentációja* (dokumentumszám: 200010105).

## Hibaelhárítás

A munkafolyamatban felmerülő problémák elhárításához használja a következő táblázatot. Ha egy szekvenálási futtatás vagy egy minta könyvtárkészítése kétszer is sikertelen, további hibaelhárításra lehet szükség. Vegye fel a kapcsolatot az Illumina műszaki ügyfélszolgálatával.

Jelenség	Lehetséges ok	Ajánlott művelet
A szekvenálási futtatás nem felel meg a minőség-ellenőrzési specifikációknak	A felhasználó vagy a laboratóriumi berendezés hibája a vizsgálati munkafolyamat során	<p>Minősítse a dúsított könyvtárakat a megfelelő könyvtárhozam és fragmensméret-eloszlás biztosítása érdekében. Ismétlje meg a könyvtár előkészítését a következő lépések valamelyikétől, attól függően, hogy hol merült fel a felhasználó vagy a berendezés hibájának gyanúja. Ha ismeretlen vagy egyéb hiba lépett fel, lépjen kapcsolatba az Illumina műszaki ügyfélszolgálatával a futtatás hibaelhárítása érdekében.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Végezze el újra a könyvtárak ismételt szekvenálását. Lásd: <a href="#">Előkészületek a szekvenáláshoz a NextSeq 550Dx készüléssel, 49. oldal</a>, <a href="#">Előkészületek a szekvenáláshoz az MiSeqDx készüléssel, 50. oldal</a>, illetve <a href="#">Előkészületek a szekvenáláshoz a NovaSeq 6000Dx készüléssel, 52. oldal</a>.</li> <li>• Végezze el újra a könyvtárak dúsítását. Lásd: <a href="#">Próbák hibridizálása, 36. oldal</a>.</li> <li>• Kezdje a könyvtár-előkészítést a munkafolyamat kezdetétől. Lásd: <a href="#">Használati útmutató, 20. oldal</a>.</li> </ul>
	A készülék hibája	Vegye fel a kapcsolatot az Illumina műszaki ügyfélszolgálatával.
Hiba a FASTQ létrehozása során vagy szekvenálórendszer általános hibája (pl. hálózati hiba, hiba a reagensek be- és kirakodásában stb.)	A szoftver vagy a készülék hibája	Lásd: A <i>Local Run Manager</i> szoftver útmutatója (dokumentumszám: 100000002702) a FASTQ létrehozásával kapcsolatos segítségért, vagy lásd: <i>NextSeq 550Dx készülék referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)</i> , <i>MiSeqDx készülék referencia-útmutató az MOS v4-hez (dokumentumszám: 1000000157953)</i> vagy <i>NovaSeq 6000Dx készülék termékdokumentációja (dokumentumszám: 200010105)</i> . További segítségért forduljon az Illumina műszaki ügyfélszolgálatához.



Jelenség	Lehetséges ok	Ajánlott művelet
A DNS-könyvtár nem elegendő mennyiségű egy szekvenáláshoz	Nem teljesültek a mintabevitelre vonatkozó követelmények	Biztosítsa a megfelelő mintabevitelt, és ismételje meg a könyvtárkészítést. Lásd: <a href="#">Ajánlások a bevitt minta mennyiségére, 17. oldal.</a>
A felhasználó vagy egy berendezés hibája a vizsgálati munkafolyamat során	A felhasználó vagy egy berendezés hibája a vizsgálati munkafolyamat során	Ismételje meg a könyvtár előkészítését a következő lépések valamelyikétől, attól függően, hogy hol merült fel a felhasználó vagy a berendezés hibájának gyanúja. Ha ismeretlen vagy egyéb hiba lépett fel, lépjen kapcsolatba az Illumina műszaki ügyfélszolgálatával a futtatás hibaelhárítása érdekében.  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Végezze el újra a könyvtárak ismételt szekvenálását. Lásd: <a href="#">Előkészületek a szekvenáláshoz a NextSeq 550Dx készülékkel, 49. oldal</a>, <a href="#">Előkészületek a szekvenáláshoz az MiSeqDx készülékkel, 50. oldal</a>, illetve <a href="#">Előkészületek a szekvenáláshoz a NovaSeq 6000Dx készülékkel, 52. oldal.</a></li> <li>• Végezze el újra a könyvtárak dúsítását. Lásd: <a href="#">Próbák hibridizálása, 36. oldal.</a></li> <li>• Kezdje a könyvtár-előkészítést a munkafolyamat kezdetétől. Lásd: <a href="#">Használati útmutató, 20. oldal.</a></li> </ul>
Nem teljesültek a dúsítópróba-panelre vonatkozó követelmények	Nem teljesültek a dúsítópróba-panelre vonatkozó követelmények	Biztosítsa a megfelelő dúsítópróba-panelt, és ismételje meg a könyvtárkészítést. Lásd: <a href="#">A dúsítópróba-panelekkel szembeni követelmények, 9. oldal.</a>

## Teljesítményjellemzők

A NovaSeq 6000Dx készüléken végzett DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx alkalmazás teljesítményjellemzői a *NovaSeq 6000Dx terméktájékoztatójában* (dokumentumszám: 200025276) található.

## Teljesítmény a teljes exomot tartalmazó panelek használata esetén

Az exompanel teljesítményét a Coriell NA12878 sejtvonalból származó gDNS legalacsonyabb (50 ng) és legmagasabb (1000 ng) ajánlott bemeneti mennyiségével vizsgálták, a csírvonalbeli variánsok azonosításához való, ismert tényleges genotípusú készlettel (Coriell platinum genome). Reprezentatív panelként az Exome panel 1 (45 Mb) és az Exome Panel 2 (36,8 Mb) panelt használták. 24 technikai ismétlést vizsgáltak az Illumina

DNA Prep with Enrichment Dx vizsgálattal, az Exome panel 1 (45 Mb) panelt használva reprezentatív panelként, két darab 12-plexes dúsítási reakcióban. 12 technikai ismétlést vizsgáltak az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vizsgálattal, az Exome panel 2 (36,8 Mb) panelt használva reprezentatív panelként, egyetlen 12-plexes dúsítási reakcióban. A feldúsított könyvtárakat NextSeq 550Dx szekvenálórendszeren, a Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx moduljával szekvenálták.

A következő táblázat mutatja az egyes panelekkel végzett technikai ismétlések másodlagos szekvenálási és variánsazonosítási teljesítmény-mérőszámainak átlagértékeit.

6. táblázat A vizsgálat teljesítménye két, a teljes exomot tartalmazó panel használata esetén

Panel	Párnázott egyedi leolvasási dúsítás	Lefedett-ség egységessége	Fragmentum-hosszúság mediánértéke	SNV-azonosítás felismerési értéke <sup>1</sup>	SNV-azonosítás precizitása <sup>2</sup>	Indel-azonosítás felismerési értéke <sup>1</sup>	Indel-azonosítás precizitása <sup>2</sup>
Exome panel 1 (45 Mb)	80%	96%	186 bp	96%	99%	90%	89%
Exome panel 2 (36,8 Mb)	93%	98%	188 bp	96%	99%	92%	93%

<sup>1</sup>Felismerés = pozitív eredmények / (valódi pozitív + álnegatív eredmények)

<sup>2</sup>Precizitás = valódi pozitív eredmények / (valódi pozitív + álpozitív eredmények)

## Kimutatási határérték

A kimutatási határértéket Horizon HD799 DNS-referencia-standard használatával vizsgálták. A HD799 mérsékelten károsodott, formalinnal kezelt DNS-ből áll, ismert SNV-kkel, amelyek allélfrekvenciája 1–24,5% között változik. A legalacsonyabb ajánlott DNS-bevitelt (50 ng) használták, és az  $\geq 5,0\%$ -os variánsallélfrekvenciájú (VAF) SNV-k kimutatási arányát értékelték. 16 technikai ismétlést vizsgáltak az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vizsgálattal, az FFPE munkafolyamattal; egy általános daganatgén-dúsítási panellel (1,94 Mb) végzett 16 darab 1-plex dúsítás után a NextSeq 550Dx készüléken a DNA GenerateFASTQ Dx modullal végzett szekvenálással.

Valamennyi minta megfelelt a panelspecifikus mintateljesítményre vonatkozó követelményeknek, amint az a következő táblázatban látható.

7. táblázat A minta teljesítménye a kimutatási határérték értékelésében

Panel	A legalább 5,0%-os VAF-értékű SNV-k kimutatási aránya	Átlagos Lefedettségi egységessége
Általános daganatgén-dúsítási panel (1,94 Mb, 523 gén)	100%	99%

## Zavaró anyagok

A potenciálisan interferenciát okozó anyagok hatásának megállapításához értékelték az ezen anyagok jelenlétében végzett Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vizsgálat teljesítményét.

### Interferencia teljes vér esetén

Az acetaminofen (exogén vegyület, gyógyszer), a kreatinin és a trigliceridek (endogén metabolitok) vizsgálatához ezeket hozzáadták humán teljes vérhez a DNS kivonása előtt. A vérvételből eredő interferencia (túl kevés vér levétele) vizsgálatához EDTA-t adtak a teljesvér-mintához. A minta előkészítéséből eredő interferencia vizsgálatához molekuláris biológiai minőségű etanolt keverték a teljes vérből kivont DNS-be.

A következő táblázat tartalmazza a vizsgált interferenciát okozó anyagok koncentrációját.

8. táblázat A teljesvér-mintákkal vizsgált potenciálisan interferenciát okozó anyagok és ezek koncentrációja

Vizsgált anyag	Vizsgált koncentráció
Acetaminophen	15,6 mg/dL* A gyógyszer terápiás dózisa után várható legmagasabb koncentráció háromszorosa.
Kreatinin	15 mg/dL* A lakosságban megfigyelhető legmagasabb koncentráció.
Trigliceridek	1,5 g/dL* A lakosságban megfigyelhető legmagasabb koncentráció.
EDTA	6 mg/mL Az EDTA-csővekbe vett vérben várható koncentráció háromszorosa.
Molekuláris biológiai tisztaságú etanol	15% v/v A DNS-extrakciót követő leoldott anyagban.

\*A CLSI EP37-ED1:2018 szerint

Interferenciát okozó anyagokként 12 technikai ismétlést vizsgáltak az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vizsgálattal, az Exome Panel 1 panellel (45 Mb) végzett egyszeri (12-plex) dúsítás után, majd szekvenálást végeztek a NextSeq 550Dx készüléken a DNA GenerateFASTQ Dx modulal.

A vizsgált anyagok esetében mind a 12 minta megfelelt a minta teljesítményére vonatkozó követelményeknek, és nem észleltek interferenciát a vizsgálat teljesítményével.

### Interferencia FFPE szövet esetében

Két kolorektális FFPE-mintát vizsgáltak a legrosszabb esetet képviselő, 10 µm FFPE-metszetenként 0,1 mg hemoglobin jelenlétében és hiányában, amikor az FFPE-szövetminták 50%-a magas hemoglobinszintű vérral van szennyeződve. A mintákat az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vizsgálattal vizsgálták, az 1. általános

daganatgén-dúsítási panel (1,94 Mb) mint reprezentatív panel használatával, egyplexes dúsításokban. A feldúsított könyvtárakat ezután NextSeq 550Dx készüléken szekvenálták a DNA GenerateFASTQ Dx modullal. Minden minta megfelelt a mintateljesítményre vonatkozó követelményeknek, és bebizonyosodott, hogy a hemoglobin nem rontja a vizsgálat teljesítményét.

A minta előkészítéséből eredő interferencia értékeléséhez két exogén vegyületet kevertek egy hólyagrakos FFPE szövetmintából kivont DNS-be. A vizsgált exogén anyagok a következő táblázatban a vizsgált mennyiségekkel együtt felsorolt, a DNS-extrakció során gyakran használt kivonási oldatok.

A vizsgált anyagok oldatai megtalálhatók a kereskedelemben kapható oszlopalapú DNS-izolációs készletekben.

9. táblázat A FFPE mintában vizsgált potenciálisan zavaró exogén anyagok és koncentrációk

Vizsgált anyag	Vizsgálati koncentráció (µl / 30 µl leoldott anyag)
Deparaffinizálási oldat	113 x 10 <sup>-6</sup>
AW2 mosópuffer	0,417

Interferenciát okozó anyagokként nyolc technikai ismétlést vizsgáltak az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vizsgálatnál; egy általános daganatgén-dúsítási pannellel (1,94 Mb) végzett egy-plex dúsítás után a NextSeq 550Dx készüléken a DNA GenerateFASTQ Dx modullal végzett szekvenálással.

Mindkét vizsgált anyag esetében mind a nyolc minta megfelelt a minta teljesítményére vonatkozó követelményeknek, és nem észleltek interferenciát a vizsgálat teljesítményével.

## Keresztszennyeződés

Az Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vizsgálatnál a Coriell NA12878 sejtvonalból (női, 10 minta) származó gDNS-t, a Coriell NA12877 sejtvonalból (férfii, 12 minta) származó gDNS-t és sablon nélküli kontrollokat (NTC, 2 minta) sakktábla-elrendezésben. Minden mintából az ajánlott legnagyobb mennyiségű (1000 ng) gDNS-bevitel történt, amely a legkedvezőtlenebb körülmény a minták keresztszennyeződésének értékeléséhez. A vizsgálatot kétszer végezte el két különböző kezelő. Az Exome Panel 1-gyel végeztek (45 Mb) 12-plex dúsítási reakciókat. A feldúsított könyvtárakat NextSeq 550Dx készüléken, a DNA GenerateFASTQ Dx modullal szekvenálták. Az értékeléshez a női mintákban vizsgálták a férfi mintára jellemző Y-kromoszóma lefedettségét, majd ezt összehasonlították az összes női minta háttérszintjével és az NTC-minták indexreprezentációjával.

10. táblázat Keresztszennyeződésre vonatkozó eredmények

A férfi Y-kromoszómának az alapzaj 3-szorosánál alacsonyabb előfordulása a női mintákban	Az NTC-minták indexreprezentációja
100%	< 0,0005%

## Függelék: Illumina UD indexek adapterszekvenciái

Ezek az egyedi kétszeres (UD) indexadapterek a lemezen úgy vannak elhelyezve, hogy érvényesítsék az ajánlott párosítási stratégiát. Az indexadapterek a szokásos nyolc bázis helyett 10 bázis hosszúságúak.

Index 1 (i7) adapterek

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (i5) adapterek

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

A következő szekvencia használatos az 1. beolvasási és a 2. beolvasási adapter szétvágásához.

CTGTCTCTTATACACATCT

### A lemez, 1. készlet indexadapterei

Index neve	Az adapterben található i7 bázisok	Az adapterben található i5 bázisok
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
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

Index neve	Az adapterben található i7 bázisok	Az adapterben található i5 bázisok
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	ATGTTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACC GCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAAC TGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG

Index neve	Az adapterben található i7 bázisok	Az adapterben található i5 bázisok
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
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

Index neve	Az adapterben található i7 bázisok	Az adapterben található i5 bázisok
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	GGTGGAAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

## B lemez, 2. készlet indexadapterei

Index neve	Az adapterben található i7 bázisok	Az adapterben található i5 bázisok
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



Index neve	Az adapterben található i7 bázisok	Az adapterben található i5 bázisok
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	GGCCTGTCTT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCATT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG

Index neve	Az adapterben található i7 bázisok	Az adapterben található i5 bázisok
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	ATTCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA

Index neve	Az adapterben található i7 bázisok	Az adapterben található i5 bázisok
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
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

## Módosítási előzmények

Dokumentum	Dátum	Módosítások leírása
Dokumentumszám: 200019584 v02	2022. szeptember	A NovaSeq 6000Dx készülékkel történő szekvenálásra vonatkozó tartalom hozzáadása.
Dokumentumszám: 200019584 v01	2022. május	A szekvenáló rendszerek neveinek és katalógusszámainak hozzáadása. Az egyedi kettős indexelésre vonatkozó adatok eltávolítása az egyszerűen indexelt könyvtárak esetében.
Dokumentumszám: 200019584 v00	2022. május	Első kiadás.

## Szabadalmak és védjegyek

A jelen dokumentum és annak tartalma az Illumina, Inc. és annak leányvállalatai („Illumina”) tulajdonát képezi, és kizárólag a jelen dokumentumban ismertetett termék(ek) szerződésszerű működtetéséhez használható. Egyéb célokra nem használható. A dokumentum és annak tartalma az Illumina előzetes írásos engedélye nélkül ettől eltérő célokra nem használható és forgalmazható, továbbá semmilyen formában nem kommunikálható, hozható nyilvánosságra vagy reprodukálható. Az Illumina a jelen dokumentummal nem biztosít licencet a termék vásárlójának a harmadik felek szabadalmi, védjegyjogi, szerzői jogi, szokásjogi vagy egyéb oltalom alatt álló jogosultságaihoz.

A jelen dokumentumban szereplő utasításokat a kvalifikált és megfelelően képzett személyzetnek szigorúan be kell tartania az itt ismertetett termék(ek) megfelelő és biztonságos használata érdekében. A termék(ek) használata előtt a felhasználó köteles átolvasni és értelmezni a jelen dokumentumban leírtakat.

AZ ITT SZEREPLŐ INFORMÁCIÓK ELOLVASÁSÁNAK VAGY AZ UTASÍTÁSOK BETARTÁSÁNAK ELMULASZTÁSA ESETÉN A TERMÉK(EK) MEGSÉRÜLHETNEK, ILLETVE SZEMÉLYI SÉRÜLÉS KÖVETKEZHET BE, IDEÉRTVE A FELHASZNÁLÓKAT ÉS MÁSOKAT IS, ILLETVE EGYÉB ANYAGI KÁROK KÖVETKEZHETNEK BE. EZENFELÜL ILYEN ESETEKBE A TERMÉK(EK)RE VONATKOZÓ GARANCIA ÉRVÉNYÉT VESZTI.

AZ ILLUMINA SEMMIFÉLE FELELŐSSÉGET NEM VÁLLAL AZ ITT BEMUTATOTT TERMÉK(EK) HELYTELEN HASZNÁLATÁBÓL FAKADÓ KÁROKÉRT (AZ ALKATRÉSZEKET ÉS A SZOFTVERT IS IDEÉRTVE).

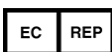
© 2022 Illumina, Inc. Minden jog fenntartva.

Minden védjegy az Illumina, Inc., illetve az adott tulajdonosok tulajdonát képezi. A védjegyekkel kapcsolatos információkat lásd a [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html) oldalon.

## Elérhetőségek



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A.  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (Észak-Amerikán kívül)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

### Ausztrál szponzor

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

## Termékcímke

A terméken és a csomagolásán megjelenő címkéken látható szimbólumok teljes magyarázatát megtekintheti a [support.illumina.com](https://support.illumina.com) honlapon az Ön készletére vonatkozó *Documentation* (Dokumentáció) lapon található szimbólum ikonra kattintva.