

TIKAI IN VITRO DIAGNOSTIKAS NOLŪKIEM
TIKAI EKSPORTAM

Paredzētais lietojums

illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts ir reaģentu un palīgmateriālu kopums, ko izmanto, lai sagatavotu no cilvēka šūnām un audiem iegūtas genomiskās DNS paraugu DNS fragmentu bankas. DNS fragmentu banku sagatavošanai ir nepieciešami lietotāja nodrošināti zondes paneļi, lai apstrādātu konkrētus interesējošos genoma apgabalus. Izveidotās DNS fragmentu paraugu bankas ir paredzēts izmantot illumina sekvencēšanas sistēmās.

Procedūras principi

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplektu ir paredzēts izmantot tādu DNS sekvencēšanas DNS fragmentu banku sagatavošanai, kurās ir papildināti no cilvēka šūnām un audiem iegūtas genoma DNS mērķa apgabali.

Mērķa papildināšanai ir nepieciešami lietotāja nodrošināti biotilēti oligonukleotīdu paneļi. illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts ir saderīgs ar dažādu paneļu izmēru klāstu, kas ietver mazus paneļus (< 20 000 zondes) un lielus paneļus (> 200 000 zondes). Izveidotās papildinātās DNS fragmentu bankas ir paredzēts sekvencēt illumina sekvencēšanas sistēmās.

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta procedūra ietver šādas darbības:

- **Mērķa genoma DNS** — izmanto Enrichment BLT Small (eBLTS) DNS ievades elementa marķēšanai. Marķēšanas laikā gDNS tiek fragmentēta un marķēta ar adapteriem ar vienu darbību. eBLTS piesātināšanai marķēšanas reakcijā nepieciešamais minimālais DNS ievades elements ir 50 ng. Pēc piesātināšanas eBLTS fragmentē iestatīto DNS molekulu skaitu, lai izveidotu standartizētas DNS fragmentu bankas konsekventu fragmentu izmēru sadalījumu.
- **Attīrīšana pēc marķēšanas** — nodrošina ar adapteri marķētu eBLTS DNS attīrīšanu, lai izmantotu amplificēšanā.
- **Marķētās DNS amplificēšana** — nodrošina marķētās DNS marķēšanu, izmantojot ierobežotu ciklu PĶR programmu. DNS fragmentu galos tiek pievienoti unikāli dubultie (UD) indeksi, kas sekvencēšanas laikā nodrošina DNS fragmentu banku dubulto unikālo svītrkodēšanu un klasteru izveidi.
- **DNS fragmentu banku attīrīšana** — šajā darbībā izmanto lodīšu-attīrīšanas procedūru, lai attīrītu un atlasītu pēc izmēra amplificētas DNS fragmentu bankas.
- **DNS fragmentu banku apvienošana kopparaugā** — apvieno DNS fragmentu bankas ar unikāliem indeksiem vienā kopparaugā, kas ietver līdz pat 12 DNS fragmentu bankas DNS fragmentu bankas var apvienot kopparaugā pēc tilpuma vai masas.

- **Zonžu hibridizācija** — šī darbība ietver hibridizācijas reakciju, kuras laikā dubultās spirāles DNS fragmentu bankas tiek denaturētas un biotinilēto DNS zonžu panelis tiek hibridizēts ar marķētajiem genoma apgabaliem.
 - illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts ir saderīgs ar vairākiem paneļiem. illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts neietver papildināšanas paneli. Zondes paneļus nodrošina lietotājs, un tiem jāatbilst norādītajām specififikācijām. illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta reaģenti ir saderīgi gan ar illumina , gan trešo personu DNS oligonukleotīdu papildināšanas paneļiem, kas atbilst norādītajām specififikācijām. Informāciju par trešo personu paneļiem norādītajām specififikācijām skatiet sadaļā [Prasības papildināšanas zondes panelim 10. lpp.](#)
- **Hibridizēto zonžu uztveršana** — šajā darbībā izmanto Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) magnētiskās lodītes, lai uztvertu biotinilētās zondes, kas ir hibridizētas līdz interesējošajiem mērķa apgabaliem.
- **Papildinātu DNS fragmentu banku amplificēšana** — šajā darbībā izmanto PĶR, lai amplificētu bagātinātās DNS fragmentu bankas.
- **Amplificētu papildinātu DNS fragmentu banku attīrīšana** — šajā darbībā izmanto attīrīšanas procedūru, lai attīrītu papildinātas DNS fragmentu bankas, kuras ir sagatavotas sekvencēšanai.
- **Sekvēncēšana** — MiSeqDx, NextSeq 550Dx vai NovaSeq 6000Dx sekvencēšanas sistēmā tiek veikta papildinātu DNS fragmentu banku sekvencēšana. MiSeqDx un NextSeq 550Dx sistēmā sekvencēšanas izpildei, izpildes kontrolei un primārajai analīzei (FASTQ izveide no bāzu izsaukumiem) izmanto DNS GenerateFASTQ Dx Local Run Manager moduli. NovaSeq 6000Dx sistēmā izpildes iestatīšanai un sekundārajai analīzei ar vairākām pieejamām darba plūsmām izmanto DRAGEN for illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Procedūras ierobežojumi

- Izmantošanai tikai *in vitro* diagnostikā.
- illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts ir saderīgs ar no cilvēka šūnām un audiem iegūtu genoma DNS.
- illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts ir saderīgs ar dubultās spirāles gDNS ievades elementiem ar vērtību 50–1000 ng. Izmantojot ievades elementus, kas neatbilst robežvērtībām, nevar garantēt veikspēju.
- illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts neiekļauj reaģentus DNS ekstrahēšanai. Analītisko testu rezultāti, kas ietver interferences testēšanas rezultātus un kas ir pieejami sadaļā [Veiktspējas raksturlielumi 58. lpp.](#), ir iegūti, izmantojot nesadalītu asiņu un FFPE paraugus kā raksturīgus paraugu veidus ar raksturīgiem DNS ekstrahēšanas komplektiem. Visiem diagnostikas testiem, kuri ir izstrādāti izmantošanai ar illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta reaģentiem, ir nepieciešama pilnīga visu veikspējas aspektu validācija ar izvēlēto DNS ekstrahēšanas komplektu.

illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nav ieteicams lietot zemas kvalitātes FFPE paraugiem ar ΔCq vērtību > 5 . Paraugu ar $\Delta Cq > 5$ izmantošana var palielināt DNS fragmentu bankas sagatavošanas neveiksmes iespējamību vai pazemināt analīzes veikspēju.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta reaģenti ir konfigurēti un testēti attiecībā uz parauga ievades elementu, papildināšanas reakcijām un kompleksu daudzumu, kas ir norādīts nākamajā tabulā.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts	Parauga ievades elements	Papildināšanas reakcijas	Papildināšanas kompleksu daudzums
16 paraugu komplekts	Zema līmeņa kvalitāte (FFPE)	16 reakcijas	1 komplekss
96 paraugu komplekts	Augsta līmeņa kvalitāte (piemēram, nesadalītas asinis)	8 reakcijas	12 kompleksi

- Tika testēta FFPE ievades elementa apstrāde, kas tiek ieteikta īpaši 1 kompleksa papildināšanas reakcijām, izmantojot 16 paraugu komplektu.
- 96 paraugu komplektam ir iespējami nestandarta kompleksi (2 kompleksi līdz 11 kompleksi), bet uz to attiecas šādi ierobežojumi:
 - Tādu paraugu apstrāde, kuri iekļauti 2 līdz 11 kompleksu papildināšanas reakcijās, samazina komplekta caurlaides spēju.
 - Optimāli rezultāti netiek garantēti. Ja nestandarta kompleksi tiek iegūti piemērots papildināšanas rezultāts, var būt nepieciešama papildu optimizācija.
 - Izmantojot zema līmeņa kompleksa apvienošanas stratēģijas (2 līdz 8 kompleksi), ir jāizvēlas indeksa adapteri ar dažādām sekvencēm, lai varētu optimizēt krāsu balansu veiksmīgai sekvencēšanai un datu analīzei. MiSeqDx un NextSeq 550Dx instrumenta DNA GenerateFASTQ Dx modulis izpildes iestatīšanas laikā nodrošina krāsu sabalansēta indeksa kombinācijas. Plašāku informāciju par kopparauga izveides stratēģijām skatiet sadaļā [Kopparauga izveides metodes 34. lpp.](#)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts var nodrošināt tikai papildinātas DNS fragmentu bankas, kuras tiek sekvencētas tikai MiSeqDx, NextSeq 550Dx un NovaSeq 6000Dx instrumentā. Lai varētu izmantot citas sekvencēšanas sistēmas, ir nepieciešama visu veikspējas aspektu validācija.
- Papildināšanas paneli nav iekļauti šī produkta komplektācijā. Analītisko testu rezultāti, kas ir sniegti sadaļā [Veikspējas raksturlielumi 58. lpp.](#), ir iegūti, izmantojot raksturīgus papildināšanas paneļus, un tie ir uzrādīti tikai informatīvā nolūkā. Analītiskās veikspējas parametri kalpo kā piemērs analīzes vispārējām iespējām, un tās nenosaka iespējas vai piemērotību attiecībā uz konkrētām analīzes prasībām. Visiem diagnostikas testiem, kuri ir izstrādāti lietošanai ar šiem reaģentiem, ir jāveic pilna visu veikspējas aspektu validācija.

illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts ir saderīgs gan ar Illumina, gan trešo personu papildināšanas paneļiem. Tomēr veikspēju, izmantojot trešo personu papildināšanas paneļus, kuri neatbilst paneļa prasībām, nevar garantēt. Informāciju par paneļa prasībām skatiet sadaļā [Prasības papildināšanas zondes panelim 10. lpp.](#)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplektam ir nepieciešams 2 stundu hibridizācijas laiks. Ilgāka hibridizācijas laika izmantošana var ietekmēt veikspējas rādītājus.
- DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager moduļi MiSeqDx un NextSeq 550Dx sistēmām nodrošina tikai FASTQ failus. Izmantojot šos moduļus, ir jāveic sekundārās analīzes validācija.
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application lietojumprogramma ir pieejama NovaSeq 6000Dx sistēmā. Lietojumprogramma atbalsta vairākas sekundārās analīzes darbplūsmas, tostarp FASTQ ģenerēšanu, FASTQ un VCF ģenerēšanu dzimumšūnas līnijas variantu noteikšanai un FASTQ un VCF ģenerēšanu somatisko variantu noteikšanai. Ja šo lietojumprogrammu izmantojat VCF ģenerēšanai, sekundārās analīzes validācija nav jāveic.
- Informāciju par DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application ierobežojumiem izmantošanai ar NovaSeq 6000Dx skatiet *NovaSeq 6000Dx instrumenta iepakojuma ieliktnī (dokumenta Nr. 200025276)*.

Izstrādājuma komponenti

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts ietver tālāk norādītos komponentus.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, kataloga Nr. 20051354 (16 paraugi) vai Nr. 20051352 (96 paraugi)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, kataloga Nr. 20051355 (16 paraugi) vai Nr. 20051353 (96 paraugi)
- NextSeq 550Dx instrumenta Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx modulis, kataloga Nr. 20063024
- MiSeqDx instrumenta Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx modulis, kataloga Nr. 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NovaSeq 6000Dx, kataloga Nr. 20074609

Nodrošinātie reaģenti

Lai pabeigtu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx procedūru, ir nepieciešams Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A vai Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Izmantojot 16 vai 96 paraugu komplektu, var veikt tālāk norādīto DNS fragmentu banku sagatavošanas un papildināšanas reakciju skaitu.

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts	Parauga ievades elements	Papildināšanas reakcijas	Papildināšanas kompleksu daudzums
16 paraugu komplekts	Zema līmeņa kvalitāte (FFPE)	16 reakcijas	1 komplekss
96 paraugu komplekts	Augsta līmeņa kvalitāte (piemēram, nesadalītas asinis)	8 reakcijas	12 kompleksi

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

illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, uzglabāt no -15 °C līdz -30 °C temperatūrā

Tālāk norādītie reaģenti tiek piegādāti istabas temperatūrā. Lai nodrošinātu pareizu veiktspēju, nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā.

Reaģenta nosaukums	Stobriņu daudzums		Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums	Aktīvās sastāvdaļas
	16 paraugi (Nr. 20050020)	96 paraugi (Nr. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Sarkana	350 µl	Ar ūdeni atšķaidīts mazgāšanas līdzeklis.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Zaļa	41 ml	Ūdens buferšķīdums, kas satur mazgāšanas līdzekli un sāli
Cleanup Beads (CB)	1	N.p.	Sarkana	10 ml	Cietās fāzes paramagnētiskās lodītes ūdens buferšķīdumā.

* Cleanup Beads lodītes 96 paraugu komplektiem ir iekļautas illumina Cleanup Beads 96 paraugu komplektā (Nr. 20050030).

illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 paraugi), uzglabāt no 15 °C līdz 30 °C temperatūrā

96 paraugu Dx komplektos Cleanup Beads lodītes ir iekļautas illumina Prep Dx Cleanup Beads komplektā (kataloga Nr. 20050030). Tālāk norādītais reaģents tiek piegādāts istabas temperatūrā. Lai nodrošinātu pareizu veikspēju, nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā. 16 paraugu komplektos Cleanup Beads lodītes ir iekļautas illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 komplektā (kataloga Nr. 20050020).

Reaģenta nosaukums	Daudzums	Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums	Aktīvās sastāvdaļas
Cleanup Beads (CB)	4	Sarkana	10 ml	Cietās fāzes paramagnētiskās lodītes ūdens buferšķīdumā.

illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 2, uzglabāt no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā

Tālāk norādītie reaģenti tiek piegādāti atdzesēti. Lai nodrošinātu pareizu veikspēju, nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā. Uzglabājiet eBLTS bāzes stobriņu vertikāli tā, lai lodītes vienmēr ir pilnībā pārklātas ar buferšķīdumu.

Reaģenta nosaukums	Stobriņu daudzums		Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums		Aktīvās sastāvdaļas
	16 paraugi (Nr. 20050021)	96 paraugi (Nr. 20050026)		16 paraugi	96 paraugi	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Dzeltena	200 µl	290 µl	Ar transposomām saistītas Streptavidin Magnetic Beads magnētiskās lodītes ūdens buferšķīdumā, kas satur glicerīnu, EDTA, ditiotreitolu, sāli un mazgāšanas līdzekli.

illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis illumina®

Reāģenta nosaukums	Stobriņu daudzums		Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums		Aktīvās sastāvdaļas
	16 paraugi (Nr. 20050021)	96 paraugi (Nr. 20050026)		16 paraugi	96 paraugi	
Resuspensijas buferšķīdums (RSB)	1	4	Caurspīdīgs	1,8 ml	1,8 ml	Ūdens buferšķīdums.

illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, uzglabāt no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā

Tālāk norādītie reāģenti tiek piegādāti sasaldēti. Lai nodrošinātu pareizu veiktspēju, nekavējoties uzglabājiet reāģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā.

Reāģenta nosaukums	Stobriņu daudzums		Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums		Aktīvās sastāvdaļas
	16 paraugi (Nr. 20050022)	96 paraugi (Nr. 20050027)		16 paraugi	96 paraugi	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Caurspīdīgs	290 µl	290 µl	Ūdens buferšķīdums, kas satur magnija sāli un dimetilformamīdu.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Caurspīdīgs	200 µl	610 µl	DNS polimerāze un dNTPs ūdens buferšķīdumā.

illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 paraugi), uzglabāt no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā

16 paraugu komplektu illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloga Nr. 20050023) komplektā ir iekļauti tālāk norādītie reāģenti. 96 paraugu komplektu illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloga Nr. 20050028) komplektā ir iekļauti reāģenti.

Tālāk norādītie reāģenti tiek piegādāti atdzesēti. Lai nodrošinātu pareizu veiktspēju, nekavējoties uzglabājiet reāģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā.

illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis illumina®

Reāģenta nosaukums	Stobriņu daudzums	Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums	Aktīvās sastāvdaļas
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Caurspīdīgs	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads magnētiskās lodītes atrodas ūdens buferšķīdumā, kas satur formamīdu, mazgāšanas līdzekli un sāli.
Resuspensijas buferšķīdums (RSB)	1	Caurspīdīgs	1,8 ml	Ūdens buferšķīdums.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Caurspīdīgs	200 µl	Ūdens buferšķīdums, kas satur mazgāšanas līdzekli un sāli.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Caurspīdīgs	200 µl	Ūdens buferšķīdums.

illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 paraugi), uzglabāt no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā

96 paraugu komplektu illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloga Nr. 20050028) komplektā ir iekļauti tālāk norādītie reaģenti. 16 paraugu komplektu illuminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kataloga Nr. 20050023) komplektā ir iekļauti reaģenti.

Tālāk norādītie reaģenti tiek piegādāti atdzesēti. Lai nodrošinātu pareizu veiktspēju, nekavējoties uzglabā jiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā.

Reāģenta nosaukums	Stobriņu daudzums	Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums	Aktīvās sastāvdaļas
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Caurspīdīgs	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads magnētiskās lodītes atrodas ūdens buferšķīdumā, kas satur formamīdu, mazgāšanas līdzekli un sāli.
Resuspensijas buferšķīdums (RSB)	4	Caurspīdīgs	1,8 ml	Ūdens buferšķīdums.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Caurspīdīgs	200 µl	Ūdens buferšķīdums, kas satur mazgāšanas līdzekli un sāli.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Caurspīdīgs	200 µl	Ūdens buferšķīdums.

illumina Prep Dx Enrichment Reagents 2, uzglabāt no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā

Tālāk norādītie reaģenti tiek piegādāti sasaldēti. Lai nodrošinātu pareizu veiktspēju, nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā.

Reaģenta nosaukums	Stobriņu daudzums		Vāciņa krāsa	Uzpildes tilpums	Aktīvās sastāvdaļas
	16 paraugi (Nr. 20050024)	96 paraugi (Nr. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Caurspīdīgs	580 µl	Ar ūdeni atšķaidīts mazgāšanas līdzeklis.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Oranža	4,1 ml	Ūdens buferšķīdums, kas satur sāli un mazgāšanas līdzekli.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Caurspīdīgs	320 µl	PĶR praimeru (oligonukleotīdu) maisījums.
2N NaOH (HP3)	1	1	Caurspīdīgs	200 µl	2N nātrija hidroksīda (NaOH) šķīdums.
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Zila	480 µl	Ūdens buferšķīdums ar Cot-1 DNS, sablīvēšanas viela un formamīds.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Caurspīdīgs	200 µl	DNS polimerāze un dNTPs ūdens buferšķīdumā.

illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, uzglabāt no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā

Tālāk norādītie reaģenti tiek piegādāti sasaldēti. Lai nodrošinātu pareizu veiktspēju, nekavējoties uzglabājiet reaģentus norādītajā uzglabāšanas temperatūrā. Informāciju par indeksa adaptera sekvencēm skatiet šeit: [Pielikums. illumina UD indeksu adaptera sekvences 62. lpp.](#)

Sastāvdaļa	Daudzums
illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 indeksi), Nr. 20050038	1
illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 indeksi), Nr. 20050039	1

Komplektā neiekļautie reaģenti

Nepieciešamie, bet komplektā neiekļautie reaģenti

- DNS ekstrahēšanas un attīrīšanas reaģenti
- DNS kvantitatīvas noteikšanas reaģenti
- Etanols (200 %, molekulārās bioloģijas vajadzībām)
- Ūdens, kas nesatur nukleāzi
- 1M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- Molekulārās bioloģijas kvalitātes 1N NaOH
- Ja tiek izmantota NextSeq 550Dx sekvencēšanas sistēma:
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cikli) (kataloga Nr. 20028871)
- Ja tiek izmantota MiSeqDx sekvencēšanas sistēma:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (kataloga Nr. 20037124)
- Ja tiek izmantota NovaSeq 6000Dx sekvencēšanas sistēma:
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cikli) (kataloga Nr. 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cikli) (kataloga Nr. 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (kataloga Nr. 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (kataloga Nr. 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx DNS fragmentu bankas stobriņš (kataloga Nr. 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx DNS fragmentu bankas stobriņš, iepakojumā 24 gab. (kataloga Nr. 20062291)

Prasības papildināšanas zondes panelim

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta reaģenti ir saderīgi gan ar illumina, gan trešo personu DNS oligonukleotīdu papildināšanas paneļiem. Izmantojot trešo personu biotinilētas DNS zondes (fiksēti vai pielāgoti paneļi), pārbaudiet, vai tie atbilst norādītajām specifikācijām.

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts ir optimizēts un apstiprināts, izmantojot tālāk norādītās trešo personu paneļu specifikācijas. Salīdzināmu veiktspēju nevar garantēt, ja tiek izmantoti trešo personu paneļi, kas neatbilst specifikācijām.

- Zondes garums 80 bp vai 120 bp
- Zondes no 500 līdz 675 000
- Vienas vai dubultās spirāles DNS
- Kopējā zondes ievades elementa vērtība ≥ 3 pmol papildināšanai no 1 līdz 12 kompleksiem

Uzglabāšana un izmantošana

- Istabas temperatūra tiek definēta no 15 °C līdz 30 °C.
- Reaģenti ir stabili, ja tie tiek uzglabāti, kā norādīts, līdz derīguma termiņam, kas norādīts uz komplekta uzlīmēm. Informāciju par uzglabāšanas temperatūru skatiet sadaļā [Nodrošinātie reaģenti 4. lpp.](#)
- Sasaldēti reaģenti ir stabili maksimāli četrus sasaldēšanas/atkausēšanas ciklus, kuri tiek izpildīti pirms norādītā derīguma termiņa.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta procedūra ietver šādus drošas protokola pārtraukšanas punktus:
 - Pēc darbības [Marķētās DNS amplificēšana 29. lpp](#) izpildes amplificētās DNS fragmentu bankas ir stabilas līdz pat 30 dienas, uzglabājot no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā.
 - Pēc darbības [DNS fragmentu banku attīrīšana 32. lpp](#) izpildes attīrītās DNS fragmentu bankas ir stabilas līdz pat 30 dienas, uzglabājot no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā.
 - Pēc darbības [Iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku kopparauga izveide 34. lpp](#) kopparaugā apvienotās DNS fragmentu bankas ir stabilas līdz pat 30 dienas, uzglabājot no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā.
 - Pēc darbības [Papildinātas DNS fragmentu bankas amplificēšana 45. lpp](#) papildināto amplificēto DNS fragmentu banku plati var atstāt termoprocesorā līdz pat 24 stundām. Vai arī plati var uzglabāt līdz pat 48 stundas no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā.
 - Iegūtās attīrītās, papildinātās DNS fragmentu bankas ir stabilas līdz pat 7 dienas, uzglabājot no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā.
- Ja kāds no Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta vai satura komponentiem ir bojāts, sazinieties ar Illumina klientu atbalsta dienestu.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) buferšķīdumā var veidoties redzamas nogulsnes vai kristāli. Ja ir redzamas nogulsnes, sildiet 10 minūtes 37 °C temperatūrā un pēc tam maisiet, līdz nogulsnes ir izšķīdušas.
- Hybridization Oligos (HYB) un Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) buferšķīdums iepriekš jāsasilda līdz tādai pašai temperatūrai kā hibridizācijas aiztures temperatūra, kas ir piemērota parauga tipam un zondes panelim. Plašāku informāciju par NHB2 un EEW apstrādi skatiet sadaļā [Piezīmes par procedūru 16. lpp.](#)
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) buferšķīdumā un HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) reaģentā var veidoties kristāli un duļķes. Ja ir redzami kristāli vai duļķes, maisiet vai pipetējiet augšup un lejup, lai samaisītu, līdz šķīdums ir dzidrs. Pirms pipetēšanas obligāti sasildiet NHB2 reaģentu.

- Rīkojoties ar Cleanup Beads (CB) lodītēm, izmantojiet šādas labākās prakses:
 - Lodītes nekādā gadījumā nedrīkst sasaldēt.
 - Tieši pirms lietošanas maisiet lodītes, līdz tās ir resuspendētas un krāsa izskatās viendabīga.
- Rīkojoties ar Enrichment BLT Small (eBLTS), izmantojiet šādas labākās prakses:
 - Uzglabājiet eBLTS stobriņu vertikāli tā, lai lodītes vienmēr ir pilnībā pārklātas ar buferšķīdumu.
 - Rūpīgi maisiet eBLTS, līdz lodītes ir resuspendētas. Lai novērstu lodīšu atkārtotu nosēšanos, pirms pipetēšanas nav ieteicama centrifugēšana.
 - Ja lodītes ir pielīpušas pie 96 iedobju plates malām vai tās augšpusē, centrifugējiet 3 sekundes ar ātrumu 280 × g un pēc tam pipetējiet, lai resuspendētu.
- Rīkojoties ar indeksa adaptera platēm, izmantojiet šādas labākās prakses:
 - Nepievienojiet paraugus uz indeksa adaptera plates.
 - Katra indeksa plates iedobe ir paredzēta tikai vienai lietošanas reizei.

Nepieciešamais aprīkojums un materiāli, netiek nodrošināti

Pirms protokola izpildes pārliedzinieties, ka papildus illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplektam ir pieejams nepieciešamais aprīkojums ir materiāli.

Aprīkojums

Pirms protokola izpildes pārliedzinieties, vai ir nepieciešamais aprīkojums.

Protokols ir optimizēts un validēts, izmantojot norādītos elementus ar norādītajām specififikācijām. Salīdzināmu veiktspēju nevar garantēt, ja tiek izmantots specififikācijām neatbilstošs aprīkojums.

Daži elementi ir nepieciešami tikai konkrētās darbplūsmās. Šie elementi ir norādīti atsevišķās tabulās.

- Termoprocesors ar šādām specififikācijām:
 - Apsildāms vāks
 - Minimālais temperatūras kontroles diapazons no 10 °C līdz 98 °C
 - Minimālā temperatūras precizitāte ±0,25 °C
 - Maksimālais reakcijas tilpums 100 µl
 - Saderīgs ar pilnas apmales 96 iedobju PĶR plāksnēm
- Mikroparaugu inkubators ar šādām specififikācijām:
 - Apkārtējās vides temperatūras diapazons no +5,0 °C līdz 99,0 °C
 - Saderība ar 96 iedobju MIDI platēm
- Ar 96 iedobju MIDI platēm saderīgi mikroparaugu inkubatora ieliktni

- Ātrgaitas mikroplašu kratītājs, kurš nodrošina maisīšanas ātrumu 200–3000 apgr./min.
- Ar 96 iedobju PQR platēm saderīgs magnētiskais statīvs
- Ar 96 iedobju MIDI platēm saderīgs magnētiskais statīvs
- Ar konkrēto kvantitatīvās noteikšanas metodi saderīgs fluorometrs
- DNS fragmentu analizators
- Precīzijas pipetes:
 - 10 µl viena kanāla un daudzkanālu pipetes
 - 20 µl viena kanāla un daudzkanālu pipetes
 - 200 µl viena kanāla un daudzkanālu pipetes
 - 1000 µl viena kanāla pipetes
 - Precīzijas pipetes nodrošina precīzu reaģenta un parauga padevi. Viena kanāla vai daudzkanālu pipetes var izmantot, ja tās tiek regulēti kalibrētas un to precizitāte ir 5 % robežās no noteiktā tilpuma.
- Mikroplates centrifūga
- Mikrocentrifūga
- Viena no šādām illumina sekvencēšanas sistēmām:
 - MiSeqDx instruments, kataloga Nr. DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx instruments, kataloga Nr. 20005715
 - NovaSeq 6000Dx instruments, kataloga Nr. 20068232
- Vakuuma koncentrators **[nav obligāti]**
- **[FFPE]** Reālā laika PQR noteikšanas sistēma

Materiāli

Pirms protokola izpildes pārliecinieties, ka jums ir nepieciešamie materiāli.

Daži elementi ir nepieciešami tikai konkrētās darbplūsmās. Šie elementi ir norādīti atsevišķās tabulās.

Protokols ir optimizēts un validēts, izmantojot norādītos elementus. Salīdzināma veiktspēja netiek garantēta, ja tiek izmantoti alternatīvi materiāli.

- Pipetes uzgaļi ar filtru
- Konusveida centrifūgas stobriņi, 15 ml vai 50 ml
- 1,5 ml mikrocentrifūgas mēģenes
- Vienreizlietojamas daudzkanālu reaģentu tvertnes bez RNāzes/DNāzes
- 8 stobriņu plāksnītes bez RNāzes/DNāzes un vāciņi
- Seroloģiskas pipetes
- 96 dziļo iedobju polipropilēna uzglabāšanas plate, 0,8 ml (MIDI plate)

- Cietā apvalka 96 iedobju ar pilnu apmali PĶR plate
- Ar qPCR instrumentu saderīgas [FFPE] qPCR plates
- Lipīgi pārklājumi lietošanai ar 96 iedobju platēm ar šādām specifiskajām:
 - Noplēšams, vizuāli caurspīdīgs poliesteris
 - Piemērots PĶR platēm ar apmali
 - Spēcīgs adhezīvs, kas ir izturīgs dažādās temperatūrās no -40 °C līdz 110 °C
 - Bez DNāzes/RNāzes
- Plastmasas palīgmateriāli, kas ir saderīgi ar izvēlēto kvantitatīvās noteikšanas metodi
- Fluorometrijas dsDNS kvantitatīvās noteikšanas komplekts, kas ir saderīgs ar izvēlēto kvantitatīvās noteikšanas sistēmu:
 - Ar kvantitatīvajai noteikšanai iepriekš papildinātajām amplificētajām DNS fragmentu bankām var izmantot plašu kvantitatīvās noteikšanas komplektu klāstu.
 - Kvantitatīvās noteikšanas komplektu klāsts izmantošanai ar kvantitatīvajai noteikšanai papildināto DNS fragmentu banku ir atkarīgs no izmantotā zondes paneļa.
- Fragmentu analīzes komplekts DNS fragmentu bankas kvantitatīvai noteikšanai ar izvēlēto kvalitatīvās noteikšanas sistēmu:
 - Ar kvalitatīvajai noteikšanai iepriekš papildinātajām amplificētajām DNS fragmentu bankām var izmantot plašu komplektu klāstu.
 - Kvalitatīvās noteikšanas komplektu klāsts izmantošanai ar kvalitatīvajai noteikšanai papildināto DNS fragmentu banku ir atkarīgs no izmantotā zondes paneļa.
- DNS ekstrahēšanai no cilvēka šūnām un audiem komplekts [**nav obligāti**]. Var izmantot jebkuru apstiprinātu ekstrahēšanas metodi.

Parauga materiāla ņemšana, transportēšana un uzglabāšana



UZMANĪBU!

Ar visiem paraugu materiāliem rīkojieties tā, it kā tie būtu potenciāli infekcijas izraisītāji.

- Šī analīze ir saderīga ar no cilvēka šūnām un audiem iegūtas genoma DNS.
- Izmantojot pārdošanā pieejamu attīrītu gDNS, paraugi obligāti ir jātransportē atbilstošos apstākļos un jāuzglabā saskaņā ar ražotāja norādījumiem. Ievērojiet gDNS uzglabāšanas un sasaldēšanas/atkausēšanas ciklu praksi.

- Attiecībā uz visu asins ievades elementu ievērojiet asins parauga ņemšanas, transportēšanas un uzglabāšanas prasības, kuras ir spēkā izvēlētajai DNS ekstrahēšanas metodei. Var izmantot jebkuru apstiprinātu ekstrahēšanas metodi. Nesadalītu asiņu parauga transportēšanai ir jāatbilst valsts, federālajiem, pašvaldības un vietējiem noteikumiem par slimību izraisītāju transportēšanu.
- DNS ekstrahēšanai no FFPE var izmantot jebkuru apstiprinātu ekstrahēšanas metodi. Ievērojiet norādījumus un ieteikumus, kas attiecas uz izvēlēto ekstrakcijas metodi, lai noteiktu šādu praksi:
 - Audu fiksēšanas formālīnā un iegulšanas parafīnā metode ekstrahētās DNS labākas kvalitātes nodrošināšanai.
 - FFPE parauga materiālu uzglabāšana.
 - Prasības sākuma materiālam, piemēram, FFPE histoloģijas paraugu skaits un biežums. Lielākajā daļā attīrīšanas metožu iesaka izmantot svaigi grieztus histoloģijas paraugus.

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

- illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta reaģenti satur potenciāli bīstamas ķīmiskas vielas. Ieelpojot, norijot, saskaroties ar ādu un saskaroties ar acīm, iespējams gūt traumas. Valkājiet aizsardzības līdzekļus, tostarp acu aizsargus, cimdus un laboratorijas uzsvārci, kas atbilst ietekmes riskam. Rīkojieties ar lietotiem reaģentiem kā ar ķīmiskiem atkritumiem un atbrīvojieties no tiem saskaņā ar piemērojamiem reģionālajiem, valsts un vietējiem likumiem un noteikumiem. Plašāku informāciju par vidi, veselību un drošību skatiet drošības datu lapā (DDL) vietnē support.illumina.com/sds.html.
- Rīkojieties ar visiem asins paraugiem tā, it kā būtu zināms, ka tie inficēti ar cilvēka imūndeficīta vīrusu (HIV), cilvēka B hepatīta vīrusu (HBV) un citiem ar asinīm pārnēsājamiem patogēniem (vispārīgi piesardzības pasākumi).
- Ievērojiet parastos laboratorijas piesardzības pasākumus. Nelietojiet pipeti, izmantojot muti. Neēdiet, nedzeriet un nesmēķējiet noteiktās darba zonās. Rīkojoties ar paraugiem un komplekta reaģentiem, valkājiet vienreizlietojamus cimdus un laboratorijas uzsvārčus. Pēc paraugu un komplekta reaģentu izmantošanas ir rūpīgi jānomazgā rokas.
- Lai novērstu parauga vai reaģenta kvalitātes zaudēšanu, pirms protokola izpildes pārliecinieties, vai visi nātrija hipohlorīta tvaiki, kas radušies attīrīšanas laikā, ir pilnībā izklīduši.
- Paraugu kontaminācija ar citiem PĶR produktiem/amplikoniem var radīt neprecīzus un neuzticamus rezultātus. Lai novērstu kontamināciju, izmantojiet šādas labākās prakses:
 - Izmantojiet atbilstošas laboratorijas prakses un ievērojiet laboratorijas higiēnu.
 - Izpildiet darbplūsmas darbības paredzētajās zonās, kuras paredzētas darbībām pirms vai pēc amplifikācijas.
 - Pirms DNS fragmentu banku attīrīšanas uzglabājiet reaģentus pirmsamplifikācijas un pēcamplifikācijas zonās.
 - Nodaliet pirmsamplifikācijas reaģentus no pēcamplifikācijas reaģentiem.

- Pārbaudiet, vai pirmsamplifikācijas un pēcamplifikācijas zonās ir nepieciešamais aprīkojums, piemēram, pipetes, pipetes uzgaļi, maisītājs un centrifūga.
- Novērsiet savstarpēju kontamināciju. Pēc katra parauga un pēc katras reaģenta dozēšanas nomainiet pipetes uzgaļus. Filtrētu uzgaļu izmantošana samazina amplikonu pārnesšanas un paraugu savstarpēju kontaminācijas risku.
 - Pievienojot vai pārnesot paraugus vai reaģentu galvenos maisījumus, pēc katra parauga mainiet uzgaļus.
 - Pievienojot indeksa adapterus ar daudzkanālu pipeti, mainiet uzgaļus pēc katras rindas vai katras ailes. Izmantojot viena kanāla pipeti, mainiet uzgaļus pēc katra parauga.
 - Noņemiet neizmantotās indeksa adaptera plates no darba zonas.
- Izpildot etanola mazgāšanas darbības, izmantojiet šādas labākās prakses:
 - Vienmēr sagatavojiet svaigu 80 % etanolu. Etanols var absorbēt gaisā esošo mitrumu, kas var ietekmēt rezultātus.
 - Izpildot mazgāšanas darbības, pārliecinieties, vai ir izvadīts viss etanols iedobju dibenā. Atlikušais etanols var ietekmēt rezultātus.
 - Lai nodrošinātu pilnīgu iztvaikošanu, ievērojiet norādīto žūšanas laiku ar magnētisko statīvu saistītajās darbībās. Atlikušais etanols var ietekmēt turpmāko reakciju veikspēju.
- Pirms lietošanas vienmēr sagatavojiet galvenos maisījumus un nekādā gadījumā neuzglabājat kombinētos darba šķīdumus.
- Ja procedūras netiek veiktas, kā norādīts iepakojuma ieliktnī, illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta veikspēju nevar garantēt.
- Nevienu komplekta komponentu nedrīkst lietot pēc derīguma termiņa, kas norādīts komplekta marķējumā, beigām
- Savstarpēji nemainiet dažādu illumina DNA Prep with Enrichment Dx komplektu komponentus. Komplektu identifikācija ir norādīta komplekta marķējumā.

Piezīmes par procedūru

Ieteikumi par DNS ievades elementu

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta protokols ir saderīgs ar augstas kvalitātes dubultās spirāles genoma DNS (gDNS) ievades elementiem ar vērtību 50–1000 ng.

Pārliecinieties, vai sākotnējais gDNS paraugs nesatur > 1 mM EDTA un organiskos piesārņotājus, piemēram, fenolu un etanolu. Šīs vielas var ietekmēt marķēšanas reakciju un izraisīt analīzes kļūmi.

gDNS ievades elements ≥ 50 ng

Ar gDNS ievades elementiem 50–1000 ng sākotnējā gDNS parauga kvantitatīvā noteikšana un normalizēšana nav nepieciešama.

gDNS ievades elements < 50 ng

Var izmantot DNS ievades elementus 10–50 ng, veicot šādas korekcijas:

- Ja izmanto gDNS ievades elementu 10–49 ng, ir ieteicama gDNS parauga kvantitatīva noteikšana, lai noteiktu PĶR ciklu skaitu, kas ir nepieciešams pēc marķēšanas. Dubultās spirāles gDNS ievades elementa kvantitatīvajai noteikšanai izmantojiet fluorometrijas metodi. Nav ieteicams izmantot metodes, kurās mēra kopējo nukleīnskābju daudzumu, piemēram, NanoDrop vai citas UV absorbcijas metodes.
- Šo protokolu nevar izmantot no gDNS 10–49 ng iegūto iepriekš bagātināto DNS fragmentu banku galīgo rezultātu normalizēšanai, tāpēc ir nepieciešama DNS fragmentu banku normalizēšana pirms un pēc papildināšanas.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts ir pārbaudīts un apstiprināts izmantošanai ar DNS ievades elementiem 50–1000 ng. gDNS ievades elementiem < 50 ng līdzīgu produktu veiktspēju nevar garantēt.

Ieteikumi par asins parauga ievades elementu

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts ir saderīgs ar gDNS, kas ekstrahēta no perifērām nesadalītām asinīm. Var izmantot jebkuru apstiprinātu ekstrahēšanas metodi. Ekstrahējot gDNS no nesadalītām asinīm, nav nepieciešama sākotnēja ievades DNS kvantitatīvā noteikšana, un Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts nodrošina standartizētas iepriekš papildinātas DNS fragmentu bankas rezultātu ieguvī.

DNS daudzumu, kas tiek iegūts no nesadalītu asiņu paraugiem, un tādējādi DNS fragmentu bankas normalizāciju var ietekmēt šādi faktori:

- Asins parauga vecums
- Uzglabāšanas apstākļi
- Pamatslimības, kas ietekmē leikocītu skaitu

Ieteikumi par FFPE audu parauga ievades elementu

Lai noteiktu atbilstošu ievades elementu sekmīgas DNS fragmentu bankas sagatavošanai, izmantojiet šādus FFPE DNS kvalitātes noteikšanas kritērijus:

- FFPE paraugiem ar ΔCq vērtību ≤ 5 ieteicamais DNS ievades elementa apjoms ir 50–1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nav ieteicams lietot zemas kvalitātes FFPE paraugiem ar ΔCq vērtību > 5 . Paraugu ar ΔCq vērtību > 5 izmantošana ir iespējama, bet tas var palielināt DNS fragmentu bankas sagatavošanas neveiksmes iespējamību vai pazemināt analīzes veiktspēju.

FFPE ekstrahēšana

Izmantojiet nukleīnskābju izolēšanas metodi, kura nodrošina augstus atgūstamības rezultātus, samazina paraugu patēriņu un saglabā parauga integritāti. Var izmantot jebkuru apstiprinātu DNS ekstrahēšanas no FFPE paraugiem metodi. No FFPE audiem ekstrahētai gDNS ir jāveic sākotnēja ievades DNS kvantitatīvā noteikšana, un illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts nenodrošina standartizētas iepriekš papildinātas DNS fragmentu bankas rezultātus.

FFPE DNS kvalitātes noteikšana

Pirms lietošanas ir jānosaka no FFPE audiem ekstrahētās gDNS kvalitāte. Lai nodrošinātu optimālu veikspēju, novērtējiet DNS parauga kvalitāti, izmantojot apstiprinātu ekstrahēšanas metodi no FFPE audiem ekstrahētas DNS kvalitātes noteikšanai. illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ir saderīgs ar FFPE DNA paraugiem ar ΔCq vērtību ≤ 5 . illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nav ieteicams lietot zemas kvalitātes FFPE paraugiem ar ΔCq vērtību > 5 . Paraugu ar $\Delta Cq > 5$ izmantošana ir iespējama, bet tas var palielināt DNS fragmentu bankas sagatavošanas neveiksmes iespējamību vai pazemināt analīzes veikspēju.

FFPE atsauces paraugi [nav obligāti]

Izpildot protokolu, kā pozitīvu kontroli izmantojiet pārbaudītus atsauces materiālus, piemēram, Horizon HD799 (DNA). Kā atsauces paraugus var izmantot arī no ksenograftiem iegūtu šūnu līniju pārbaudītas kvalitātes FFPE materiālus. Atsauces materiālu kvantitatīvai noteikšanai pirms lietošanas izmantojiet fluorometrijas metodi

PIEZĪME. Pozitīvas kontroles atsauces parauga vai kontroles bez matricas apstrāde patērē reaģentus un samazina kopējo nezināmo paraugu, kuru varētu apstrādāt, skaitu.

Ieteikumi par parauga ievades elementu

Ieteikumi par paraugu ievades elementiem, izmantojot illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplektu, ir sniegti nākamajā tabulā.

1. tabula. Ieteikumi par parauga ievades elementu

Parauga ievades elementa tips	Parauga ievades elementa daudzums	Nepieciešama ievades DNS kvantitatīva noteikšana	Nepieciešamā DNS ievades elementa kvalitāte	Standartizētas iepriekš bagātinātas DNS fragmentu bankas rezultāts
gDNA	10–49 ng	Jā	1,8–2,0 attiecība 260/280	Nē
gDNA	50–1000 ng	Nē	1,8–2,0 attiecība 260/280	Jā

Parauga ievades elementa tips	Parauga ievades elementa daudzums	Nepieciešama ievades DNS kvantitatīva noteikšana	Nepieciešamā DNS ievades elementa kvalitāte	Standartizētas iepriekš bagātinātas DNS fragmentu bankas rezultāts
No asins parauga ekstrahēta gDNS	50–1000 ng	Nē	1,8–2,0 attiecība 260/280	Jā
No FFPE ekstrahēta gDNS	50–1000 ng	Jā	ΔCq vērtība ≤ 5	Nē

eBLTS PQR programmas ieteicamais PQR ciklu skaits tiek pielāgots atkarībā no parauga ievades elementa koncentrācijas un kvalitātes. Papildinformāciju skatiet sadaļā [Marķētās DNS amplificēšana 29. lpp.](#)

Padomi un metodes

Savstarpējas kontaminācijas novēršana

- Pievienojot vai pārnesot paraugus, *pēc katra parauga* mainiet uzgaļus.
- Pievienojot indeksa adapterus ar daudzkanālu pipeti, mainiet uzgaļus *pēc katras rindas* vai *katras ailes*. Izmantojot viena kanāla pipeti, mainiet uzgaļus pēc katra parauga.

Plates pārklāšana

- Vienmēr pārklājiet 96 iedobju plati ar jaunu lipīgu pārklājumu, izmantojot gumijas rullīti, lai pārklātu plati pirms šādu protokola darbību izpildes:
 - Kratīšanas darbības
 - Inkubācijas darbības. Ja plate netiek atbilstoši pārklāta, inkubācijas laikā var rasties iztvaikošana.
 - Centrifugēšanas darbības
 - Hibridizācijas darbības
- Lai novērstu krusteniskās kontaminācijas un iztvaikošanas risku, pārbaudiet, vai iedobju malas ir pilnībā pārklātas.
 - Ja uz pārklāja vai plates iedobju malām ir redzams šķidrums vai kondensāts, pirms pārklāja noņemšanas centrifugējiet, kā nepieciešams.
- Pirms lēni noņemat pārklājumu, novietojiet plati uz līdzenas virsmas.

Rīkošanās ar Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Uzglabājiet eBLTS bāzes stobriņu vertikāli ledusskapī tā, lai lodītes vienmēr ir pilnībā pārklātas ar buferšķīdumu.
- Tieši pirms lietošanas rūpīgi maisiet eBLTS bāzes stobriņu, līdz lodītes ir resuspendētas. Lai novērstu lodīšu atkārtotu nosēšanos, pirms pipetēšanas nav ieteicama centrifugēšana.
- Ja lodītes ir pielīpušas pie 96 iedobju plates malām vai tās augšpusē, centrifugējiet 3 sekundes ar ātrumu 280 × g un pēc tam pipetējiet, lai resuspendētu.
- Mazgājot eBLTS, rīkojieties šādi:
 - Izmantojiet platei piemēroto magnētisko statīvu.
 - Atstājiet plati uz magnētiskā statīva līdz instrukcijās norādītajam noņemšanas laikam.
 - Ja lodītes tiek aspirētas pipetes uzgaļos, dozējiet tās atpakaļ platē uz magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums kļūst dzidrs (2 minūtes).

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta darbplūsma

Nākamajā shēmā ir norādīta illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta darbplūsma. Starp darbībām ir norādīti drošas protokola pārtraukšanas punkti. Laiks ir aprēķināts 12 paraugu apstrādei ar 12 kompleksu papildināšanu.



Lietošanas instrukcijas

Šajā sadaļā ir aprakstīts DNA Prep with Enrichment Dx Kit protokols.

- Lai nodrošinātu produktu un eksperimenta parametru saderību, pārskatiet iepriekš noteikto pabeigto sekvencēšanas darbplūsmu no parauga līdz analīzei.
- Pirms darba izpildes pārbaudiet komplekta saturu un pārliecinieties, vai ir pieejami nepieciešamie komponenti, aprīkojums un materiāli.
 - Trešo personu biotinilētajām zondēm ir jāatbilst norādītajām prasībām. Lai pārliecinātos, vai trešās puses zondes atbilst prasībām, skatiet sadaļu [Prasības papildināšanas zondes panelim 10. lpp.](#)
- Izpildiet protokolus norādītajā secībā, izmantojot norādītos tilpumus un inkubācijas parametrus.
- Ja vien protokolā nav norādīts drošas protokola pārtraukšanas punkts, nekavējoties izpildiet nākamo darbību.
- Sagatavojot galveno maisījumu, ņemiet vērā, ka pārpalikums ir iekļauts nodrošinātajā tilpumā.
- Obligāti izmantojiet plates tipam piemēroto magnētisko statīvu.

Sagatavošanās kopparauga izveidei

Šī darbība ir jāveic, lai nodrošinātu sekmīgu papildināto DNS fragmentu banku sekvencēšanu. DNS fragmentu banku kopparaugu var izveidot pirms papildināšanas un pirms sekvencēšanas.

Pirms papildināšanas — atsevišķas indeksētas, amplificētas DNS fragmentu bankas tiek apvienotas kopparaugā, lai to papildinātu ar izvēlēto zondes paneli. Tādējādi tiek izveidots papildinātu DNS fragmentu banku vairāku kompleksu kopparaugs. Attiecībā uz FFPE parauga ievades elementu tā apstrāde ir testēta, un tā ir ieteicama īpaši 1 kompleksa papildināšanas reakcijām. Attiecībā uz augstas kvalitātes gDNS ir testēti 12 kompleksi, bet var izmantot no 2 līdz 11 kompleksus.

Pirms sekvencēšanas — pirms sekvencēšanas kopparaugā tiek apvienotas 1 kompleksa papildinātas DNS fragmentu bankas un/vai vairāku kompleksu papildinātas DNS fragmentu bankas. Papildināto DNS fragmentu banku skaits, kuru var sekvencēt, ir atkarīgs no katra parauga mērķa nolasāmā fragmenta dziļuma konkrētajā sekvencēšanas sistēmā.

Unikāla dubultā indeksēšana

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekts izmanto unikālus dubultos indeksus.

- Divkārtši indeksētām DNS fragmentu bankām pievieno indeksa Nr. 1 (i7) un indeksa Nr. 2 (i5) sekvences, lai izveidotu unikālas marķētas DNS fragmentu bankas.
- UD indeksi nodrošina atsevišķa, nesaistīta indeksa sekvences i7 un i5 indeksa nolasāmajam fragmentam. Indeksu garums ir 10 bāzes.

Atlasot indeksa adapterus ar dažādām sekvencēm kopparaugā apvienotām DNS fragmentu bankām, var optimizēt krāsu balansu veiksmīgai sekvencēšanai un datu analīzei. Kompleksu kopparaugiem, kuri apvieno ≥ 10 kompleksus, pēc būtības ir sabalansētas krāsas, tāpēc var izmantot jebkuru indeksu adaptera kombināciju. Sekvencēšanas izpildes laikā DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager modulis nodrošina sabalansētu krāsu indeksa kombināciju opcijas, un tajā tiek parādīti paziņojumi, ja izvēlētais indeksu kombinācijas nenodrošina pietiekamu daudzveidību.

Informāciju par Illumina UD indeksa adaptera sekvencēm un plates izkārtojumiem skatiet šeit: [Pielikums. Illumina UD indeksu adaptera sekvences 62. lpp.](#)

Atbalstītie papildināšanas kompleksi

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta reaģenti ir konfigurēti un testēti, izmantojot 1 kompleksa un 12 kompleksu papildināšanas kompleksu. Lai gan ir iespējami arī citi papildināšanas kompleksi, dažiem kompleksiem ir nepieciešama iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku papildu sagatavošana un papildināšanas zondes paneļa reaģenti.

Ja nestandarta papildināšanai tiek iegūts piemērots papildināšanas rezultāts, var būt nepieciešama papildu optimizācija. Optimāli rezultāti netiek garantēti.

- **Papildināšanas komplekss** — iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku skaits (1–12), kas apvienots kopā vienā papildināšanas reakcijā hibridizācijas nodrošināšanai, izmantojot zondes papildināšanas paneļus. Piemēram, apvienojot kopā 12 iepriekš papildinātas DNS fragmentu bankas, tiek izveidots 12 kompleksu papildināšanas kopparaugs.
- **Papildināšanas reakcija** — unikālo papildināšanas reakciju preparātu skaits neatkarīgi no reakcijas vajadzībām kopparaugā apvienoto iepriekš papildināto DNS fragmentu banku skaita. Piemēram, vienā papildināšanas reakcijā var sagatavot 1 kompleksa vai 12 kompleksu papildināšanas kopparaugu.

Lai aprēķinātu kopējo DNS fragmentu banku skaitu pēc papildināšanas, reiziniet papildināšanas kompleksu skaitu vienā reakcijā ar papildināšanas reakciju skaitu. Piemēram, vienā 12 kompleksu papildināšanas kopparauga papildināšanas reakcijā pēc papildināšanas tiek izveidots 12 DNS fragmentu banku kopparaugs.

Apvienojot kopparaugā iepriekš papildinātas DNS fragmentu bankas, Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta reaģenti atbalsta tālāk norādītās papildināšanas reakcijas un kompleksus.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta reaģenti	Papildināšanas reakcijas	Papildināšanas kompleksu daudzums
16 paraugu komplekts	16 reakcijas	1 komplekss
96 paraugu komplekts	8 reakcijas	12 kompleksi

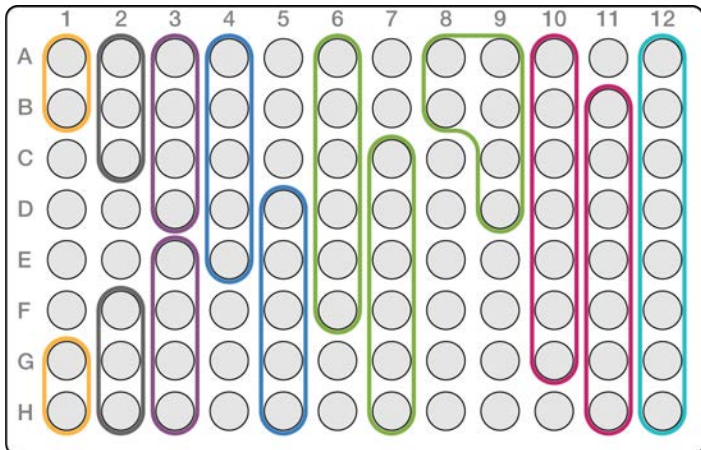
Divu līdz astoņu kompleksu kopparaugu izveides stratēģijas

Nākamajā tabulā ir norādīti indeksu adapteri (iedobes), kurus var kombinēt 2–8 kompleksu kopparaugos, bet ar krāsām kodētajā attēlā ir norādītas visas kombinācijas.

Kopparauga izveidei izmantojiet visu komplektu daudzumu ≥ 2 no ailes augšpuses vai apakšas. Kopparauga izveidei nedrīkst izmantot rindu.

illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis illumina®

Kompleksu daudzums	Kombinācijas	Krāsa attēlā
2	Pirmās vai pēdējās divas iedobes ailē: <ul style="list-style-type: none"> • A un B • G un H C–F rindu neizmanto.	Oranža
3	Pirmās vai pēdējās trīs iedobes ailē: <ul style="list-style-type: none"> • A–C • F–H D un E rindu neizmanto.	Pelēka
4	Pirmās vai pēdējās četras iedobes ailē: <ul style="list-style-type: none"> • A–D • E–H 	Violeta
5	Pirmās vai pēdējās piecas iedobes ailē: <ul style="list-style-type: none"> • A–E • D–H 	Zila
6	[1. opcija] Pirmās vai pēdējās sešas iedobes ailē: <ul style="list-style-type: none"> • A–F • C–H [2. opcija] Pirmās divas iedobes (A un B) vai pēdējās divas iedobes (G un H) vienā ailē un jebkuras četras iedobes blakus ailē.	Zaļa
7	Pirmās vai pēdējās septiņas iedobes ailē: <ul style="list-style-type: none"> • A–G • B–H 	Rozā
8	Visa aile.	Zilganzaļa

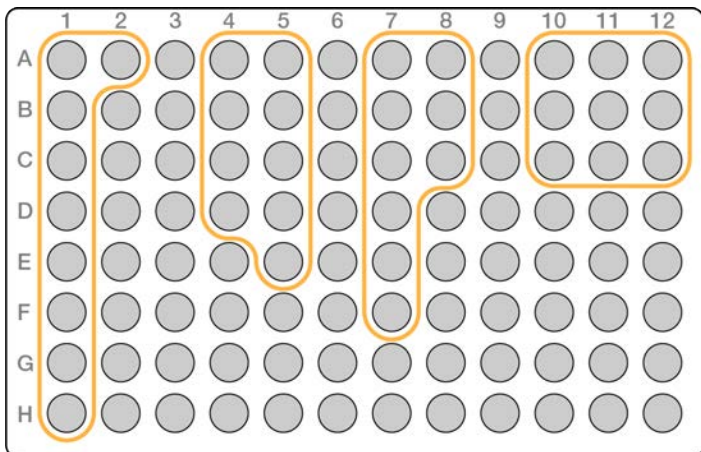


Deviņu kompleksu kopparauga izveides stratēģijas

Izmantojiet jebkuras iedobes indeksa adapterus, kuri optimizē krāsu balansu sekvencēšanas izpildē, piemēram:

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

Nākamajā attēlā ir parādīti visi četri piemēri.



Genoma DNS marķēšana

Šajā darbībā izmanto Enrichment BLT Small (eBLTS) DNS marķēšanai, un tā nodrošina DNS fragmentēšanas un marķēšanas ar adaptera sekvencēm procesu.

Palīgmateriāli

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (dzeltens vāciņš)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Ūdens, kas nesatur nukleāzi
- 96 iedobju PĶR plate
- Lipīgs pārklājums
- 1,7 ml mikrocentrifūgas mēģenes
- 8 stobriņu plāksnīte
- Pipetes uzgaļi
 - 200 µl daudzkanālu pipetes



UZMANĪBU!

Šajā reaģentu komplektā ir potenciāli bīstamas ķīmiskās vielas. Ieelpojot, norijot, saskaroties ar ādu un saskaroties ar acīm, iespējams gūt traumas. Valkājiet aizsardzības līdzekļus, tostarp acu aizsargus, cimdus un laboratorijas uzsvārci, kas atbilst ietekmes riskam. Rīkojieties ar lietotiem reaģentiem kā ar ķīmiskiem atkritumiem un atbrīvojieties no tiem saskaņā ar piemērojamiem reģionālajiem, valsts un vietējiem likumiem un noteikumiem. Plašāku informāciju par vidi, veselību un drošību skatiet drošības datu lapā (DDL) vietnē: support.illumina.com/sds.html.

Par reaģentiem

- eBLTS ir jāuzglabā no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā. Nelietojiet eBLTS, kas ir uzglabāts temperatūrā zem 2 °C.
- eBLTS nedrīkst centrifugēt.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus palīgmateriālus:

Ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
eBLTS (dzeltens vāciņš)	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz istabas temperatūrai. Lai sajauktu, maisiet tieši pirms katras lietošanas reizes. Pirms pipetēšanas nedrīkst centrifugēt.
TB1	No -25 °C līdz -15 °C	Sasildiet līdz istabas temperatūrai. Lai sajauktu, maisiet.

2. Maisiet vai pipetējiet DNS un pēc tam īsu brīdi centrifugējiet.
3. Saglabājiet termoprosesorā tālāk norādīto TAG programmu.
 - Izvēlieties iepriekšējās uzsildīšanas vāka opciju un iestatiet 100 °C temperatūru

- Iestatiet reakcijas tilpumu 50 µl
- 5 minūtes 55 °C temperatūrā
- Turiet 10 °C temperatūrā

Procedūra

1. Pievienojiet 2–30 µl DNS katrā 96 iedobju PQR plates iedobē tā, lai kopējais ievades elementa daudzums būtu 50–1000 ng.
Ja DNS tilpums ir < 30 µl, pievienojiet DNS paraugam ūdeni bez nukleāzes, lai iegūtu kopējo tilpumu 30 µl.
2. Rūpīgi maisiet eBLTS, līdz lodītes ir pilnībā resuspendētas.
3. Lai sagatavotu marķēšanas galveno maisījumu, apvienojiet stobriņā tālāk norādītos elementus. Reiziniet katra tilpuma vērtību ar apstrādājamo paraugu skaitu.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Reaģenta pārpalikums ir iekļauts tilpumā.
4. Lai sajauktu, rūpīgi pipetējiet marķēšanas galveno maisījumu.
5. Sadaliet marķēšanas galveno maisījuma tilpumu vienādās daļās 8 stobriņu plāksnītē.
6. Izmantojot 200 µl daudzkanālu pipeti, pārnesiet 20 µl marķēšanas galveno maisījumu katrā PQR plates iedobē, kurā atrodas paraugs. Katrai paraugu ailei vai rindai izmantojiet jaunus uzgaļus.
7. Kad marķēšanas galvenais maisījums ir dozēts, atbrīvojieties no 8 stobriņu plāksnītes.
8. Izmantojot uz 40 µl iestatītu 200 µl daudzkanālu pipeti, pipetējiet katru paraugu 10 reizes, lai nodrošinātu sajaukšanu. Katrai paraugu ailei izmantojiet jaunus uzgaļus.
Vai arī pārklājiet PQR plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1600 apgr./min., izmantojot plates kratītāju.
9. Pārklājiet plati, pēc tam ievietojiet to iepriekš ieprogrammētā termoprocesorā un palaidiet TAG programmu.
10. Nogaidiet, līdz TAG programma ir sasniegusi 10 °C aiztures temperatūru, un pēc tam nekavējoties izņemiet plati.
11. Atstājiet 96 iedobju PQR plati istabas temperatūrā 2 minūtes un pēc tam veiciet nākamo darbību.

Attīrīšana pēc marķēšanas

Šajā darbībā pirms PQR amplifikācijas tiek mazgāta ar adapteru iezīmēta DNS uz eBLTS.

Palīgmateriāli

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- 96 iedobju PQR plates magnētiskais statīvs
- Lipīgs pārklājums

illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis illumina®

- 8 stobriņu plāksnīte
- Pipetes uzgaļi
 - 20 µl daudzkanālu pipetes
 - 200 µl daudzkanālu pipetes
- Sagatavojiet turpmākai procedūrai:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Indeksa adaptera plate

Par reaģentiem

- Obligāti izmantojiet platei piemēroto magnētisko statīvu. Ja MIDI platei izmanto magnētisko statīvu, kurš ir paredzēts PĶR platei, var tikt novērsta TWB2 pielipšana lodītēm.
- Lai samazinātu putu veidošanos, novērstu nepareizu tilpuma aspirēšanu un nepilnīgu sajaukšanu, pipetējiet TWB2 lēni.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus palīgmateriālus:

Ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
EPM	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet 1 stundu uz ledus. Apvērsiet, lai samaisītu, un pēc tam apstrādājiet centrifūgā.
ST2	No 15°C līdz 30°C	Ja tiek novērotas nogulsnes, sildiet 10 minūtes 37 °C temperatūrā un pēc tam maisiet, līdz nogulsnes ir izšķīdušas. Lietojiet istabas temperatūrā.
TWB2	No 15°C līdz 30°C	Lietojiet istabas temperatūrā.
Indeksa adaptera plate	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet 30 minūtes istabas temperatūrā.

Procedūra

1. Katrā marķēšanas reakcijā pievienojiet 10 µl ST2. Ja tiek izmantota daudzkanālu pipete, pipetējiet ST2 8 stobriņu plāksnītē un pēc tam pārnesiet attiecīgo tilpumu PĶR platē. Katrai paraugu ailei vai rindai izmantojiet jaunus uzgaļus.
2. Izmantojot uz 50 µl iestatītu 200 µl pipeti, lēni pipetējiet katrā iedobē 10 reizes, lai resuspendētu lodītes. Vai arī pārklājiet plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1600 apgr./min. Ja nepieciešams, atkārtojiet.
3. Pārklājiet plati un pēc tam centrifugējiet 10 sekundes ar ātrumu 280 × g.
4. Inkubējiet 5 minūtes istabas temperatūrā.
5. Novietojiet uz PĶR plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (3 minūtes).

6. [\leq 48 paraugi] Mazgājiet trīs reizes, kā norādīts tālāk.
 - a. Izmantojot uz 60 μ l iestatītu 200 μ l daudzkanālu pipeti un neskarot lodīšu granulas, noņemiet virsslāni un atbrīvojieties no tā.
 - b. Noņemiet plati no magnētiskā statīva.
 - c. Uzreiz pēc tam tieši uz lodītēm lēnām pievienojiet 100 μ l TWB2.
 - d. Pipetējiet lēni, līdz lodītes ir pilnībā resuspendētas. Vai arī pārklājiet plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1600 apgr./min.
 - e. Ja materiāls izšķakstās, lēni maisiet 10 sekundes ar ātrumu 280 \times g.
 - f. Novietojiet uz PQR plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (3 minūtes). Veicot trešo mazgāšanu, atstājiet plati uz magnētiskā statīva un TWB2 iedobēs, lai novērstu pārmērīgu izžūšanu. Kad ir sagatavots PQR galvenais maisījums, noņemiet virsslāni un atbrīvojieties no tā.
 - g. Izmantojot uz 100 μ l iestatītu 200 μ l daudzkanālu pipeti, noņemiet virsslāni un atbrīvojieties no tā.
 - h. Kopā mazgājot trīs reizes, atkārtojiet c–f darbību divas reizes.
7. [$>$ 48 paraugi] Mazgājiet trīs reizes, kā norādīts tālāk.
 - a. Lai novērstu pārmērīgu izžūšanu, veiciet b un c darbību pakāpeniski 1 un 2 ailēs, līdz visas ailes ir apstrādātas.
 - b. Izmantojot uz 60 μ l iestatītu 200 μ l daudzkanālu pipeti, noņemiet virsslāni un atbrīvojieties no tā.
 - c. Noņemiet plati no magnētiskā statīva.
 - d. Uzreiz pēc tam tieši uz lodītēm lēnām dozējiet 100 μ l TWB2.
 - e. Pipetējiet lēni, līdz lodītes ir pilnībā resuspendētas. Vai arī pārklājiet plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1600 apgr./min.
 - f. Ja materiāls izšķakstās, lēni maisiet 10 sekundes ar ātrumu 280 \times g.
 - g. Novietojiet uz PQR plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (3 minūtes). Veicot trešo mazgāšanu, atstājiet plati uz magnētiskā statīva un TWB2 iedobēs, lai novērstu pārmērīgu izžūšanu. Kad ir sagatavots PQR galvenais maisījums, noņemiet virsslāni un atbrīvojieties no tā.
 - h. Izmantojot uz 100 μ l iestatītu 200 μ l daudzkanālu pipeti, noņemiet virsslāni un atbrīvojieties no tā.
 - i. Noņemiet plati no magnētiskā statīva un lēnām tieši uz lodītēm pievienojiet 100 μ l TWB2.
 - j. Veiciet h un i darbību pakāpeniski 1 vai 2 ailēs, līdz visas ailes ir apstrādātas.
 - k. Kopā mazgājot trīs reizes, atkārtojiet e–h darbību divas reizes.
8. Atstājiet plati uz magnētiskā statīva, līdz ir veikta 4. darbība, kas ir aprakstīta sadaļas *Procedūra* tēmā *Marķētās DNS amplificēšana*.
Atstājiet TWB2 iedobēs, lai novērstu lodīšu pārmērīgu izžūšanu.

Marķētās DNS amplificēšana

Šajā darbībā marķētais DNS tiek amplificēts, izmantojot ierobežota cikla PQR programmu. PQR darbībā tiek pievienoti indeksa Nr. 1 (i7) adapteri, indeksa Nr. 2 (i5) adapteri un sekvences, kuras ir nepieciešamas sekvenčēšanas klastera ģenerēšanai.

Paļīgmateriāli

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Indeksa adaptera plate
- 96 iedobju PĶR plate
- Ūdens, kas nesatur nukleāzi
- Lipīgs pārklājums
- 1,5 ml mikrocentrifūgas mēģenes
- Pipetes uzgaļi
 - 20 µl daudzkanālu pipetes
 - 200 µl daudzkanālu pipetes

Par reaģentiem

- Indeksa adaptera plates
 - Iedobe var saturēt > 10 µl indeksa adapteru.
 - Nepievienojiet paraugus uz indeksa adaptera plates.
 - Katra indeksa plates iedobe ir paredzēta tikai vienai lietošanas reizei.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus paļīgmateriālus:

Ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
EPM	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet 4 °C temperatūrā uz ledu 1 stundu. Apvērsiet, lai samaisītu, un pēc tam apstrādājiet centrifūgā.
Indeksa adaptera plate	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet 30 minūtes istabas temperatūrā.

2. Saglabājiet eBLTS PĶR programmu termoprocesorā, izmantojot PĶR ciklu attiecīgo skaitu, kas ir norādīts nākamajā tabulā.
 - Izvēlieties iepriekšējās uzsildīšanas vāka opciju un iestatiet 100 °C temperatūru
 - Iestatiet reakcijas tilpumu 50 µl
 - 72 °C 3 minūtes
 - 98 °C 3 minūtes
 - X šādi cikli:
 - 98 °C 20 sekundes
 - 60 °C 30 sekundes
 - 72 °C 1 minūti

illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis **illumina**

- 72 °C 3 minūtes
- Turiet 10 °C temperatūrā

Kopējais apstrādes laiks ir ~38 minūtes uz 9 cikliem un ~46 minūtes uz 12 cikliem.

Parauga ievades elementa tips	PĶR ciklu skaits (X)
gDNS 10–49 ng	12
gDNS 50–1000 ng	9
No FFPE ekstrahēta gDNS 50–1000 ng	12
No asins parauga ekstrahēta gDNS	9

Procedūra

1. Lai sagatavotu PĶR galveno maisījumu, apvienojiet tālāk norādītos elementus. Reiziniet katra tilpuma vērtību ar apstrādājamo paraugu skaitu.
 - EPM (23 µl)
 - Ūdens, kas nesatur nukleāzi (23 µl)Reaģenta pārpalikums ir iekļauts tilpumā.
2. Pipetējiet PĶR galveno maisījumu 10 reizes un pēc tam īsu brīdi centrifugējiet.
3. Kad plate atrodas uz magnētiskā statīva, izmantojiet 200 µl daudzkanālu pipeti, lai noņemtu TWB2 un atbrīvotos no tā.
Putas, kuras saglabājas uz iedobes sienīņām, nerada nelabvēlīgu ietekmi uz DNS fragmentu banku.
4. Noņemiet plati no magnētiskā statīva.
5. Nekavējoties pievienojiet 40 µl PĶRgalveno maisījumu tieši uz lodītēm katrā iedobē.
6. Pipetējiet nekavējoties, lai sajauktu, līdz lodītes ir pilnībā resuspendētas. Vai arī pārklājiet plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1600 apgr./min.
7. Pārklājiet parauga plati un centrifugējiet 10 sekundes ar ātrumu 280 × g.
8. Centrifugējiet indeksa adapteru 1 minūti ar ātrumu 1000 × g.
9. Sagatavojiet indeksa adaptera plati.
 - [< 96 paraugi] Ar jaunu pipetes uzgali caurduriet katras iedobes folijas pārklājumu tikai tādām paraugu skaitam, kas tiek apstrādāts.
 - [< 96 paraugi] Novietojiet jauno daļēji pārklāto PĶR plati virs indeksa adaptera plates un spiediet uz leju, lai caurdurtu folijas pārklājumu. Izmetiet PĶR plati, kuru izmantojāt folijas pārklājuma caurduršanai.
10. Izmantojot jaunu pipetes uzgali, pievienojiet katrā iedobē 10 µl sagatavotus indeksa adapterus.
11. Izmantojot uz 40 µl iestatītu pipeti, pipetējiet 10 reizes, lai samaisītu. Vai arī pārklājiet plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1600 apgr./min.
12. Pārklājiet plati un pēc tam centrifugējiet 10 sekundes ar ātrumu 280 × g.
13. Ievietojiet termoprocēsorā un palaidiet eBLTS PĶR programmu.

DROŠAS PROTOKOLA PĀRTRAUKŠANAS PUNKTS

Ja procedūra tiek pārtraukta, uzglabājiet līdz 30 dienām temperatūrā no -25 °C līdz -15 °C.

DNS fragmentu banku attīrīšana

Šajā darbībā amplificēto DNS fragmentu banku attīrīšanai izmanto abpusēju lodīšu attīrīšanas procedūru.

Palīgmateriāli

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Svaigi sagatavots 80 % etanols (EtOH)
- 96 iedobju 0,8 ml Polypropylene Deepwell Storage Plate (MIDI plate)
- 96 iedobju PQR plate
- MIDI plates magnētiskais statīvs
- PQR plates magnētiskais statīvs
- 1,5 ml mikrocentrifūgas mēģenes
- Ūdens, kas nesatur nukleāzi

Par reaģentiem

- Cleanup Beads
 - Pirms katras lietošana samaisiet.
 - Lai nodrošinātu vienmērīgu lodīšu sadalījumu, bieži samaisiet.
 - Šķīduma viskozitātes dēļ aspirējiet un dozējiet lēnām.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus palīgmateriālus:

Ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
CB	Istabas temperatūra	Lai samaisītu, līdz šķidruma krāsa ir viendabīga, samaisiet un apvērsiet.
RSB	No 2 °C līdz 8 °C	Atkausējiet 30 minūtes istabas temperatūrā. Lai sajauktu, maisiet.

Procedūra

1. Kratiet 96 iedobju PQR plati 1 minūti ar ātrumu 1800 apgr./min. un pēc tam īsu brīdi centrifugējiet.
2. Novietojiet uz PQR plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (1 minūtes).
3. Samaisiet CB 3 reizes 10 sekundes un pēc tam apvērsiet, lai resuspendētu.
4. Izmantojot augstas kvalitātes gDNS, rīkojieties, kā aprakstīts tālāk.

- a. Jaunas MIDI plates katrā iedobē pievienojiet 77 µl ūdeni, kas nesatur nukleāzi.
 - b. Katrā MIDI plates iedobē pievienojiet 88 µl CB.
 - c. Pārnesiet 45 µl virsslāņa no katras PQR plates iedobes attiecīgajā MIDI plates iedobē.
 - d. Izmetiet PQR plati.
 - e. Lai sajauktu, pipetējiet katrā iedobē 10 reizes. Vai arī pārklājiet plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1800 apgr./min.
 - f. Pārklājiet un inkubējiet plati 5 minūtes istabas temperatūrā.
 - g. Pārbaudiet, vai materiālā nav gaisa burbuļu. Ja tie ir, centrifugējiet.
 - h. Novietojiet uz MIDI plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (5 minūtes).
 - i. Inkubēšanas laikā rūpīgi samaisiet CB un pievienojiet 20 µl jaunas MIDI plates katrā iedobē.
 - j. Pārnesiet 200 µl virsslāņa no pirmās MIDI plates katras iedobes jaunas MIDI plates attiecīgajā iedobē (satur 20 µl CB).
 - k. Izmetiet pirmo MIDI plati.
 - l. Lai sajauktu, pipetējiet jaunās MIDI plates katrā iedobē 10 reizes. Vai arī pārklājiet plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1800 apgr./min.
5. Izmantojot ekstrahētu FFPE, rīkojieties, kā aprakstīts tālāk.
- a. Pievienojiet 81 µl CB katrā jaunas MIDI plates iedobē.
 - b. Pārnesiet 45 µl virsslāņa no katras PQR plates iedobes attiecīgajā MIDI plates iedobē.
 - c. Izmetiet PQR plati.
 - d. Lai sajauktu, pipetējiet katrā iedobē 10 reizes. Vai arī pārklājiet plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1800 apgr./min.
6. Inkubējiet 5 minūtes istabas temperatūrā.
7. Pārbaudiet, vai materiālā nav gaisa burbuļu. Ja tie ir, centrifugējiet.
8. Novietojiet uz MIDI plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (5 minūtes).
9. Nepieskaroties lodītēm, noņemiet virsslāni un atbrīvojieties no tā.
10. Mazgājiet lodītes, kā aprakstīts tālāk.
- a. Kad plate ir novietota uz magnētiskā statīva, pievienojiet 200 µl svaiga 80 % EtOH bez maisīšanas.
 - b. Inkubējiet 30 sekundes.
 - c. Nepieskaroties lodītēm, noņemiet virsslāni un atbrīvojieties no tā.
11. Mazgājiet lodītes **otro** reizi.
12. Dabīgi žāvējiet 5 minūtes, nenoņemot no magnētiskā statīva.
13. Dabīgās žāvēšanas procesā izmantojiet 20 µl pipeti, lai noņemtu lieko EtOH un atbrīvotos no tā.
14. Noņemiet plati no magnētiskā statīva.
15. Pievienojiet lodītēm 17 µl RSB.
16. Pārklājiet plati un kratiet 2 minūtes ar ātrumu 1800 apgr./min .
17. Inkubējiet 2 minūtes istabas temperatūrā.

18. Pārbaudiet, vai materiālā nav gaisa burbuļu. Ja tie ir, centrifugējiet.
19. Novietojiet plati uz MIDI plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).
20. Pārnesiet 15 µl virsslāņa uz 96 iedobju PQR plati.

DROŠAS PROTOKOLA PĀRTRAUKŠANAS PUNKTS

Ja procedūra tiek pārtraukta, pārklājiet plati un uzglabājiet līdz 30 dienas temperatūrā no -25 °C līdz -15 °C.

Iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku kopparauga izveide

Šajā darbībā DNS fragmentu bankas ar unikāliem indeksiem tiek apvienotas vienā kopparaugā, kas ietver līdz 12 DNS fragmentu bankas.

Kopparauga izveides metodes

Kopparaugu var izveidot attiecībā pret tilpumu vai masu. Lai noteiktu ievades elementam piemēroto metodi, izmantojiet nākamo tabulu.

2. tabula. Ieteicamās kopparauga izveides metodes

Parauga ievades elements	Kopparauga izveides metode
gDNS 10–49 ng	Masa
gDNS 50–1000 ng	Tilpums
No FFPE ekstrahēta gDNS	Masa
No asins parauga ekstrahēta gDNS	Tilpums

- Viena kompleksa papildināšanai nav jāveido kopparaugs no iepriekš papildinātām DNS fragmentu bankām. Tomēr var būt nepieciešama RSB pievienošana.
- Kad iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku kvantitatīvā noteikšana ir pabeigta, visu paraugu ievades elementu veidus var apvienot kopparaugā pēc masas, lai iegūtu optimālu indeksa balansu.
- Iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku galīgais rezultāts, kas ir iegūts, izmantojot dažādus eksperimentālus preparātus, var atšķirties. Tāpēc optimāla indeksa balansa iegūšanai ir ieteicams izveidot kopparaugu pēc masas.
- Tālāk norādītajās situācijās izmantojiet 1 kompleksa papildināšanu.
 - gDNS 10–49 ng
 - No FFPE ekstrahēta gDNS 50–1000ng
 - Zema sekundāras nozīmes alēļu biežuma noteikšana somatisko variantu izsaukšanai.

Pēc masas izveidots kopparaugs

Tālāk norādītajās situācijās kvantitatīvi nosakiet DNS fragmentu bankas, lai papildināšanai izmantotu DNS masu uz vienu DNS fragmentu banku, kā norādīts sadaļā [Iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku vienādā koncentrācijā kopparauga izveide 35. lpp.](#)

- gDNS parauga ievades elements 10–49 ng
- No FFPE parauga ievades elementa ekstrahēta gDNS 50–1000 ng
- Zema sekundāras nozīmes alēļu biežuma noteikšana somatisko variantu izsaukšanai
- No asinīm ekstrahēta gDNS optimālam indeksa balansam

Iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku kvantitatīvā noteikšana

1. Apstrādājiet iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku 1 µl, izmantojot izvēlēto fluorescences kvantitatīvās noteikšanas metodi, kurā izmanto dsDNS interkalējošu krāsvielu.
 - Izmantojot augstas kvalitātes gDNS 50–1000 ng, paredzamais iepriekš bagātinātas DNS fragmentu bankas rezultāts ≥ 500 ng.
 - Izmantojot no FFPE ekstrahētas gDNS 50–1000 ng, paredzamais iepriekš bagātinātas DNS fragmentu bankas rezultāts ir 500–6000 ng atkarībā no sākotnējā parauga kvalitātes.

PIEZĪME. Izmantojot kvantitatīvās noteikšanas metodes ar dažādām novirzēm, nosakiet kvantitatīvās noteikšanas metodes kvalitāti šai darbplūsmai. Atkarībā no izmantotās metodes koncentrācijas rezultāti var atšķirties.

Iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku vienādā koncentrācijā kopparauga izveide

Lai noteiktu DNS masu vienā DNS fragmentu bankā, kas ir nepieciešama papildināšanai saskaņā ar parauga veidu un papildināšanas kompleksu daudzumu, izmantojiet nākamo tabulu. Ja tiek izmantoti zemāki iepriekš papildinātas DNS fragmentu bankas rezultāti, nekā ieteikts, nevar garantēt optimālus papildināšanas rezultātus un analīzes veikspēju.

Kopējā DNS masa papildināšanas reakcijā nedrīkst pārsniegt 6000 ng.

Parauga ievades elements	Papildināšanas kompleksu daudzums	DNS masa vienā DNS fragmentu bankā (ng)	Kopējā DNS fragmentu bankas masa (ng)
Augstas kvalitātes gDNS	12	250–500	3000–6000
No FFPE ekstrahēta gDNS	1	200	200

1. Reģistrējiet to DNS fragmentu banku indeksus, kuras plānojat apvienot šajā darbībā.

2. Ņemot vērā katras DNS fragmentu bankas koncentrāciju, aprēķiniet tilpumu, kas ir jāpievieno papildināšanas reakcijā, lai sasniegtu vēlamu DNS masu.
 - Augstas kvalitātes gDNS: aprēķiniet DNS fragmentu bankas tilpumu, kas ir nepieciešams ievades elementa apjomam 250–500 ng.
 - No FFPE ekstrahēta gDNS: aprēķiniet DNS fragmentu bankas tilpumu, kas ir nepieciešams ievades elementa apjomam 200 ng.
3. Pievienojiet katrai DNS fragmentu bankai aprēķināto tilpumu vienā PĶR plates iedobē.
4. Ja tiek izmantota augstas kvalitātes gDNS, veiciet vienu no šādām darbībām saskaņā ar apvienoto iepriekš papildināto DNS fragmentu banku kopējo tilpumu:
 - Ja iepriekš papildinātās DNS fragmentu bankas tilpums = 30 µl, veiciet darbību [Zonžu hibridizēšana 37. lpp.](#)
 - Ja iepriekš papildinātās DNS fragmentu bankas tilpums ir < 30 µl, pievienojiet RSB, lai sasniegtu kopējo tilpumu 30 µl.
 - Ja iepriekš papildinātās DNS fragmentu bankas tilpums ir > 30 µl, izmantojiet metodi, kas ietver lodītes, vai vakuuma koncentratoru, lai koncentrētu apvienoto paraugu. Pievienojiet koncentrētajam apvienotajam paraugam RSB, lai sasniegtu kopējo tilpumu 30 µl.
5. Ja tiek izmantota no FFPE ekstrahēta gDNS, veiciet vienu no tālāk aprakstītajām darbībām, ņemot vērā apvienoto iepriekš papildināto DNS fragmentu banku kopējo tilpumu.
 - Ja iepriekš papildinātās DNS fragmentu bankas tilpums = 7,5 µl, veiciet darbību [Zonžu hibridizēšana 37. lpp.](#)
 - Ja iepriekš papildinātās DNS fragmentu bankas tilpums ir < 7,5 µl, pievienojiet RSB, lai sasniegtu kopējo tilpumu 7,5 µl.

DROŠAS PROTOKOLA PĀRTRAUKŠANAS PUNKTS

Ja procedūra tiek pārtraukta, pārklājiet plati un uzglabājiet to līdz pat 30 dienas no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā.

Pēc tilpuma izveidots kopparaugs

Ja gDNS ievades elementa vērtība ir 50–1000 ng, atsevišķu tajā pašā eksperimentā ģenerētu DNS fragmentu banku kvantitatīva noteikšana un normalizēšana nav nepieciešama.

Lai iegūtu optimālu veikspēju, kopparauga izveidei izmantojiet tikai iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku paraugus, kurus sagatavojis tas pats lietotājs, reaģentu partiju un indeksa adaptera plati.

1. Reģistrējiet to DNS fragmentu banku indeksus, kuras plānojat apvienot šajā darbībā.
2. Apvienojiet tālāk norādītās iepriekš papildinātās DNS fragmentu bankas un RSB tilpumus jaunas PĶR plates vienā iedobē, lai iegūtu papildināšanas kompleksu.
Iegūtais tilpums ir 30 µl.

Papildināšanas kompleksu daudzums*	Katras iepriekš papildinātās DNS fragmentu bankas tilpums (µl)	RSB tilpums (µl)
1 komplekss	14	16
2 kompleksi	14	2
3 kompleksi	10	0
4 kompleksi	7,5	0
5 kompleksi	6	0
6 kompleksi	5	0
7 kompleksi	4,2	0,6
8 kompleksi	3,7	0,4
9 kompleksi	3,3	0,3
10 kompleksi	3	0
11 kompleksi	2,7	0,3
12 kompleksi	2.5	0

*Informāciju par nestandarta kompleksiem (no 2 kompleksiem līdz 11 kompleksiem) skatiet sadaļā [Procedūras ierobežojumi 2. lpp.](#)

DROŠAS PROTOKOLA PĀRTRAUKŠANAS PUNKTS

Ja procedūra tiek pārtraukta, pārklājiet plati un uzglabājiet to līdz pat 30 dienas no -25 °C līdz -15 °C temperatūrā.

Kvalitatīvā noteikšana iepriekš papildinātām DNS fragmentu bankām [nav obligāti]

Ja kopparaugs tiek izveidots pēc tilpuma, iepriekš papildināto DNS fragmentu banku kvantitatīvajā noteikšanā izmanto fluorometrikas metodi, kurā izmanto dsDNS interkalējošo krāsvielu. DNS fragmentu banku kvantitatīvai noteikšanai izmanto DNS fragmentu analizatoru un attiecīgo fragmentu analīzes komplektu.

DNS fragmentu banku kvantitatīvai noteikšanai kopā izmanto 1 µl. Iepriekš papildinātu DNS fragmentu banku koncentrācija ir pietiekama, lai pieļautu nelielu atšķaidīšanu fragmentu kvantitatīvai noteikšanai.

Zonžu hibridizēšana

Šajā posmā tiek piesaistīti mērķa DNS apgabali. ar uztveršanas zondēm.

illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplekta reaģenti ir saderīgi gan ar illumina, gan trešo personu DNS oligonukleotīdu papildināšanas paneļiem. Informāciju par trešo personu paneļiem norādītajām specifikācijām skatiet sadaļā [Prasības papildināšanas zondes panelim 10. lpp.](#)

PaĻīgmateriāli

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (zils vāciņš)
- Papildināšanas zondes panelis
- 96 iedobju PĶR plate
- Lipīgs pārklājums
- Sagatavojiet turpmākai procedūrai:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (oranžs vāciņš)

Par reaģentiem

- Uzglabāšanas laikā NHB2 nogulsņējas un atdalās.
- Papildināšanas zondes panelis attiecas uz izvēlēto Illumina oligonukleotīdu papildināšanas paneli.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus paĻīgmateriālus:

Ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
EHB2	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz istabas temperatūrai. Lai sajauktu, maisiet. Ja tiek novēroti kristāli vai duļķes, atkārtojiet maisīšanu vai pipetējiet augšup un lejup, lai samaisītu šķidrumu, līdz tas ir dzidrs.
Papildināšanas zondes panelis	No -25 °C līdz -15 °C (Illumina)	Gan Illumina, gan trešo personu paneļus sasildiet līdz istabas temperatūrai. Lai sajauktu, maisiet.
NHB2 (zils vāciņš)	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet istabas temperatūrā. Kad ir sasniegta istabas temperatūra, sildiet 5 minūtes mikroparaugu inkubatorā līdz temperatūrai, kāda ir izmantotajai zondei. Katru paneli maisiet 10 sekundes ar maksimālo ātrumu 3 reizes. Īsu brīdi centrifugējiet. Pipetējiet augšup un lejup no stobriņa dibena. Ja tiek novēroti kristāli vai duļķes, atkārtojiet maisīšanu vai pipetējiet augšup un lejup, lai samaisītu šķidrumu, līdz tas ir dzidrs. Lai novērstu nogulšņu veidošanos, izmantojiet, kamēr materiāls ir silts.

Ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
SMB3*	No 2 °C līdz 8 °C	Ja uzreiz pēc 90 minūšu aizturēšanas HYB programmā tiek veikta nākamā procedūra, sasildiet līdz istabas temperatūrai vismaz 2 stundas pirms HYB programmas palaišanas.
EEW* (oranžs stobriņš)	No -25 °C līdz -15 °C	Ja uzreiz pēc 90 minūšu aizturēšanas HYB programmā tiek veikta nākamā procedūra, sasildiet līdz istabas temperatūrai vismaz 2 stundas pirms HYB programmas palaišanas. Kad istabas temperatūra ir sasniegta, sasildiet mikroparaugu inkubatorā līdz piemērotai hibridizācijai un saglabājiet temperatūru 30 minūtes, pirms HYB programma ir beigusies.

*Ja pirms nākamās procedūras tiek ieturēta pauze, sagatavojiet šo reaģentu tikai tad, kad vēlaties sākt šo procedūru.

2. Saglabājiet HYB programmu termoprocesorā, izmantojot ciklu attiecīgo skaitu, kas ir norādīts šeit: [3. tabula](#).

- Izvēlieties iepriekšējās uzsildīšanas vāka opciju un iestatiet 100 °C temperatūru
- Reakcijas tilpuma iestatīšana
 - [Augstas kvalitātes gDNS] 100 µl
 - [No FFPE ekstrahēta gDNS] 25 µl
- 98°C 5 minūtes
- X cikli, katrs 1 minūti, sākot ar 98 °C temperatūru pirmajam ciklam, pēc tam samazinot temperatūru par 2 °C vienā ciklā
- Turiet 90 minūtes attiecīgajā temperatūrā:
 - [No FFPE ekstrahēta gDNS] 58 °C
 - [80 mer vienam zondes panelim] 58 °C
 - [Somatiskā varianta izsaušana] 58 °C
 - [Visi pārējie] 62 °C

Kopējais apstrādes laiks ir ~115 minūtes.

3. tabula. Ciklu skaits vienam paraugam vai panelim

Parauga un paneļa veids	Ciklu skaits (X)
No FFPE ekstrahēta gDNS (neatkarīgi no paneļa veida)	20
80 mer zondes paneļi (neatkarīgi no parauga veida)	20
Somatiskā varianta izsaušana	20
Visi pārējie paraugi un paneļi	18

Procedūru

1. **[Augstas kvalitātes gDNS]** Katrai apvienotajai DNS fragmentu bankai PĶR platē pievienojiet tālāk norādītos reaģentus minētajā secībā.
Neizveidojiet galveno maisījumu. Galvenā maisījuma izveidošana, izmantojot NHB2 un EHB2, negatīvi ietekmē papildināšanas veikspēju.
 - NHB2 (zils vāciņš) (50 µl)
 - Papildināšanas zondes panelis (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. **[Augstas kvalitātes gDNS]** Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 90 µl, pipetējiet katru iedobi 10 reizes, lai samaisītu.
3. **[No FFPE ekstrahēta gDNS]** Katrai apvienotajai DNS fragmentu bankai *PĶR platē pievienojiet* tālāk norādītos reaģentus minētajā secībā.
Neizveidojiet galveno maisījumu. Galvenā maisījuma izveidošana, izmantojot NHB2 un EHB2, negatīvi ietekmē papildināšanas veikspēju.
 - NHB2 (zils vāciņš) (12,5 µl)
 - Papildināšanas zondes panelis (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[No FFPE ekstrahēta gDNS]** Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 20 µl, pipetējiet katru iedobi 10 reizes, lai samaisītu.
5. Pārklājiet plati un centrifugējiet 10 sekundes ar ātrumu 280 × g.
6. Ievietojiet parauga plati iepriekš ieprogrammētā termoprocēsorā un palaidiet HYB programmu.
7. Kad HYB programmas aizturēšanas temperatūras laiks ir beidzies, nekavējoties izpildiet nākamo procedūru.



UZMANĪBU!

Ja hibridizācijas temperatūra kļūst zemāka par istabas temperatūru, rodas nogulsnes.

Hibridizēto zonžu uztveršana

Šajā darbībā izmanto Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) magnētiskās lodītes, lai uztvertu zondes, kas ir hibridizētas līdz interesējošajiem mērķa apgabaliem.

Palīgmateriāli

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (oranžs vāciņš)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)

- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņš
- 96 iedobju MIDI plate
- 96 iedobju PQR plate
- Lipīgs pārklājums
- MIDI plates magnētiskais statīvs
- Sagatavojiet turpmākai procedūrai:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Par reaģentiem

- EEW
 - Nodrošiniet, lai EEW pirms iepriekšējas sildīšanas mikroparaugu inkubatorā tiek atkausēts vismaz 2 stundas istabas temperatūrā.
 - Nodrošiniet, lai EEW tiek sasildīts mikroparaugu inkubatorā 30 minūtes, pirms HYB programma ir beigusies.
 - Ja EEW netiek izmantots, atstājiet to mikroparaugu inkubatorā. EEW jāturpina sildīt visā protokola izpildes laikā.
 - Sasniedzot istabas temperatūru, tas var būt duļķains.
 - Var izskatīties dzeltens.
- SMB3
 - Pirms lietošanas SMB3 ir jāsasniedz istabas temperatūra.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet tālāk norādītos palīgmateriālus.

Ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
SMB3	No 2 °C līdz 8 °C	Lai sasniegtu istabas temperatūru, atstājiet uz 2 stundām. Apvērsiet un pēc tam maisiet, līdz tas ir pilnībā resuspendēts.
EEW (oranžs stobriņš)	No -25 °C līdz -15 °C	Pēc 2 stundu inkubēšanas istabas temperatūrā un pirms HYB programma ir beigusies sildiet mikroparaugu inkubatorā līdz piemērotai hibridizācijas un uztveršanas temperatūrai 30 minūtes.
EE1	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet istabas temperatūrā un pēc tam maisiet.
HP3	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet istabas temperatūrā un pēc tam maisiet.

Ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
ET2	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz istabas temperatūrai. Lai sajauktu, maisiet.
EPM	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet vienu stundu uz ledus. Apvērsiet, lai samaisītu, un pēc tam īsu brīdi centrifugējiet. Nolieciet malā uz ledus.
PPC	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet vienu stundu uz ledus. Maisiet un pēc tam īsu brīdi centrifugējiet. Nolieciet malā uz ledus.

- Lai parauga plati inkubētu līdz vienai no tālāk norādītajām temperatūrām, iepriekš to sasildiet mikroparaugu inkubatorā, izmantojot MIDI termobloka ieliktni. EEW iepriekšējai uzsildīšanai var izmantot otru mikroparaugu inkubatoru (papildaprīkojums). Novietojiet EEW MIDI termobloka ieliktni augšpusē.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer uz vienu zondes paneli] 58 °C
 - [Somatiskā varianta izsaukšana] 58 °C
 - [Visi pārējie] 62 °C

Procedūra

legūšana

- Pievienojiet SMB3 attiecīgā MIDI plates iedobē, kā norādīts tālāk.
 - [Augstas kvalitātes gDNS] Pievienojiet 250 µl SMB3.
 - [No FFPE ekstrahēta gDNS] Pievienojiet 62,5 µl SMB3.
- Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 100 µl darbam ar augstas kvalitātes gDNS vai uz 25 µl darbam ar FFPE, pārnesiet katru DNS fragmentu bankas kopparaugu no 96 iedobju PQR plates uz attiecīgo MIDI plates iedobi.
- Pārklājiet plati un kratiet 4 minūtes ar ātrumu 1200 apgr./min.
- Ja materiāls izšķīst, īsu brīdi centrifugējiet plati.
- Novietojiet apvienoto DNS fragmentu banku plati uz MIDI termobloka ieliktni mikroparaugu inkubatorā zem EEW stobriņa, aiztaisiet vāku un pēc tam inkubējiet 15 minūtes attiecīgajā temperatūrā:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer zondes panelis] 58 °C
 - [Somatiskā varianta izsaukšana] 58 °C
 - [Visi pārējie] 62 °C
- Izņemiet apvienoto DNS fragmentu banku plati un centrifugējiet to 30 sekundes ar ātrumu 280 × g.
- Nekavējoties novietojiet uz MIDI plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).

8. **[Augstas kvalitātes gDNS]** Izmantojot uz 200 µl iestatītu pipeti un neskarot lodīšu granulas, noņemiet katras iedobes virsslāni un atbrīvojieties no tā.
9. **[No FFPE ekstrahēta gDNS]** Izmantojot uz 90 µl iestatītu pipeti un neskarot lodīšu granulas, noņemiet katras iedobes virsslāni un atbrīvojieties no tā.
10. Noņemiet visu lieko virsslāni un atbrīvojieties no tā.

Mazgāšana

1. Noņemiet plati no magnētiskā statīva.
2. **[Augstas kvalitātes gDNS]** Ātri izņemiet EEW no mikroparaugu inkubatora un pievienojiet 200 µl katrā iedobē.
3. **[No FFPE ekstrahēta gDNS]** Ātri izņemiet EEW no mikroparaugu inkubatora un pievienojiet 50 µl katrā iedobē.
4. Neizmanto EEW ievietojiet atpakaļ mikroparaugu inkubatorā un turpiniet sildīt.
5. Pārklājiet plati un kratiet 4 minūtes ar ātrumu 1800 apgr./min.

MadCap:conditions="Info_Type.Standard">

6. Novietojiet parauga plati uz MIDI termobloka ieliktna mikroparaugu inkubatorā zem EEW stobriņa, aiztaisiet vāku un pēc tam inkubējiet 5 minūtes attiecīgajā temperatūrā:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer vienam zondes panelim] 58 °C
 - [Somatiskā varianta izsaukšana] 58 °C
 - [Visi pārējie paneļi] 62 °C
7. Nekavējoties novietojiet uz MIDI plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).
8. Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 200 µl augstas kvalitātes gDNS vai 50 µl FFPE, noņemiet katras iedobes virsslāni un atbrīvojieties no tā.
9. Kopā mazgājot trīs reizes, atkārtojiet 1–8 darbību divas reizes.

Pārneses mazgāšana

1. Noņemiet plati no magnētiskā statīva.
2. **[Augstas kvalitātes gDNS]** Ātri izņemiet EEW no mikroparaugu inkubatora un pievienojiet 200 µl katrā iedobē.
3. **[No FFPE ekstrahēta gDNS]** Ātri izņemiet EEW no mikroparaugu inkubatora un pievienojiet 50 µl katrā iedobē.
4. Pārklājiet plati un kratiet 4 minūtes ar ātrumu 1800 apgr./min. Ja šķidrums izšķīstās, samaziniet ātrumu līdz 1600 apgr./min.

5. Pārnesiet resuspendēto lodīšu šķīdumu uz jaunu MIDI plati.
Nedaudz parauga var palikt iedobēs.



UZMANĪBU!

Reaģenta pārnešana samazina atlikušo reaģentu pārnesi, kas var inhibēt pakārtoto PĶR.

6. Novietojiet parauga plati uz MIDI termobloka ieliktna mikroparaugu inkubatorā, aiztaisiet vāku un pēc tam inkubējiet 5 minūtes attiecīgajā temperatūrā:
- [FFPE] 58 °C
 - [80 mer vienam zondes panelim] 58 °C
 - [Somatiskā varianta izsaukšana] 58 °C
 - [Visi pārējie] 62 °C
7. Nekavējoties novietojiet uz MIDI plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).
8. Izmantojot pipeti, kas iestatīta uz 200 µl augstas kvalitātes gDNS vai 50 µl FFPE, noņemiet katras iedobes virsslāni un atbrīvojieties no tā.
9. Centrifugējiet plati 30 sekundes ar ātrumu 280 × g.
10. Novietojiet uz MIDI plates magnētiskā statīva uz 10 sekundēm.
11. Izmantojiet 20 µl pipeti, lai no katras iedobes noņemtu lieko šķidrumu un atbrīvotos no tā.
12. Lai novērstu pārmērīgu izžūšanu un DNS fragmentu bankas rezultāta zudumu, nekavējoties veiciet darbību, kas aprakstīta šeit: [Eluēšana 44. lpp.](#)

Eluēšana

1. Lai sagatavotu eluēšanas galveno maisījumu, sajauciet tālāk norādītos tilpumus. Reiziniet katra tilpuma vērtību ar apstrādājamo apvienoto DNS fragmentu banku skaitu.
- EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)
- Papildu reaģenta pārpalikums ir iekļauts tilpumā.
2. Samaisiet un pēc tam īsu brīdi centrifugējiet.
3. Noņemiet MIDI plati no magnētiskā statīva.
4. Pievienojiet 23 µl eluēšanas galveno maisījuma katrā iedobē.
5. Pārklājiet plati un kratiet 2 minūti ar ātrumu 1800 apgr./min.
6. Inkubējiet plati 2 minūtes istabas temperatūrā.
7. Centrifugējiet 30 sekundes ar ātrumu 280 × g.
8. Novietojiet uz MIDI plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).
9. Pārnesiet 21 µl virsslāņa no katras MIDI plates jaunas 96 iedobju PĶR plates attiecīgajā iedobē.
10. Izmetiet MIDI plati.
11. Pievienojiet 4 µl ET2 katrā iedobē, kura satur 21 µl virsslāņa.

12. Iestatiet pipeti uz 20 µl un lēni pipetējiet katrā iedobē 10 reizes, lai samaisītu.
13. Pārklājiet plati un pēc tam centrifugējiet 10 sekundes ar ātrumu 280 × g.
14. Inkubējiet plati 1 minūti istabas temperatūrā.

Papildinātas DNS fragmentu bankas amplificēšana

Šajā darbībā izmanto PĶR, lai amplificētu papildināto DNS fragmentu banku.

Paļīgmateriāli

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Lipīgs pārklājums

Sagatavošana

1. Sagatavojiet šādus paļīgmateriālus:

ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
EPM	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet vienu stundu 4 °C temperatūrā vai uz ledus. Apvērsiet, lai samaisītu, un pēc tam īsu brīdi centrifugējiet. Nolieciet malā uz ledus.
PPC	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet vienu stundu 4 °C temperatūrā uz ledus. Maisiet un pēc tam īsu brīdi centrifugējiet. Nolieciet malā uz ledus.

2. Saglabājiet tālāk norādīto AMP programmu termoprocessorā, izmantojot attiecīgo PĶR ciklu skaitu, kas ir norādīts nākamajā tabulā.
 - Izvēlieties iepriekšējas uzsildīšanas vāka opciju un iestatiet 100 °C temperatūru
 - Iestatiet reakcijas tilpumu 50 µl
 - 98 °C 45 sekundes
 - (X) šādi cikli:
 - 98 °C 30 sekundes
 - 60 °C 30 sekundes
 - 72°C 30 sekundes
 - 72 °C 5 minūtes
 - Turiet 10 °C temperatūrā

Kopējais apstrādes laiks ir ~35 minūtes.

Parauga un paneļa veids	(X) Cikli
FPPE	14
illumina Exome Panel (CEX) darbam ar augstas kvalitātes gDNS	10
illumina Exome Panel (CEX) darbam ar FFPE	12
Visi pārējie paraugi un paneļi	12 ¹²³⁴

¹ Maziem trešo personu paneļiem var pielāgot līdz pat 15 cikliem, izmantojot turpmāku optimizāciju. Izmantojot FFPE, ciklu skaitu var pielāgot līdz pat 17.

² Trešo personu paneļiem, kuros ir tikai 500 zondes, var pielāgot līdz pat 17 cikliem. Izmantojot FFPE, ciklu skaitu var pielāgot līdz pat 19.

³ FFPE paraugiem var pielāgot līdz pat 14 cikliem.

⁴ PQR ciklu skaita palielināšana FFPE paraugiem var radīt augstāku dublikātu attiecību un mazāku fragmentu izmēru.

Procedūra

1. Katrā iedobē pievienojiet 5 µl PPC.
2. Katrā iedobē pievienojiet 20 µl EPM.
3. Pārklājiet plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1200 apgr./min.
4. Centrifugējiet plati 10 sekundes ar ātrumu 280 × g.
5. Ievietojiet iepriekš ieprogrammētā termoprocesorā un palaidiet AMP programmu.

DROŠAS PROTOKOLA PĀRTRAUKŠANAS PUNKTS

Ja procedūra tiek pārtraukta, uzglabājiet līdz divas dienas no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā. Vai arī atstājiet termoprocesorā līdz pat 24 stundas.

Amplificētas papildinātas DNS fragmentu bankas attīrīšana

Šajā darbībā izmanto Cleanup Beads lodītes, lai attīrītu papildinātu DNS fragmentu banku un atdalītu nevēlamus produktus.

Palīgmateriāli

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Svaigi sagatavots 80 % etanols (EtOH)
- Lipīgi pārklājumi
- 96 iedobju MIDI plate
- 96 iedobju PQR plate
- MIDI plates magnētiskais statīvs

Par reaģentiem

- Cleanup Beads
 - Pirms katras lietošana samaisiet.
 - Lai nodrošinātu vienmērīgu lodīšu sadalījumu, bieži samaisiet.
 - Šķīduma viskozitātes dēļ aspirējiet un dozējiet lēnām.

Sagatavošana

1. Sagatavojiet tālāk norādītos palīgmateriālus.

Ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
CB	Istabas temperatūra	Lai samaisītu, līdz šķidrums ir viendabīgs, samaisiet un apvērsiet.
RSB	No 2 °C līdz 8 °C	Sasildiet līdz istabas temperatūrai. Lai sajauktu, maisiet.

2. Sagatavojiet svaigu 80 % EtOH, izmantojot absolūtu etanolu.

Procedūra

1. Centrifugējiet PQR plati 10 sekundes ar ātrumu 280 × g.
2. Samaisiet CB 3 reizes 10 sekundes un pēc tam apvērsiet.
3. Pievienojiet 40,5 µl CB katrā jaunās **MIDI** plates iedobē.
4. Pārnesiet 45 µl no katras PQR plates iedobes attiecīgajā MIDI plates iedobē.
5. Pārklājiet plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1800 apgr./min.
6. Inkubējiet MIDI plati 5 minūtes istabas temperatūrā.
7. Centrifugējiet 10 sekundes ar ātrumu 280 × g.
8. Novietojiet uz MIDI plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (5 minūtes).
9. Izmantojot uz 95 µl iestatītu pipeti, noņemiet katras iedobes virsslāni un atbrīvojieties no tā.
10. Mazgājiet divas reizes, kā aprakstīts tālāk.
 - a. Kad plate ir novietota uz magnētiskā statīva, pievienojiet 200 µl svaiga 80 % EtOH bez maisīšanas.
 - b. Inkubējiet 30 sekundes.
 - c. Nepieskaroties lodītēm, noņemiet virsslāni un atbrīvojieties no tā.
11. Dabīgi žāvējiet 5 minūtes, nenoņemot no magnētiskā statīva.
12. Izmantojiet 20 µl pipeti, lai no katras iedobes noņemtu lieko EtOH un atbrīvotos no tā.
13. Noņemiet plati no magnētiskā statīva un pievienojiet 32 µl RSB katrā iedobē.
14. Pārklājiet plati un kratiet 1 minūti ar ātrumu 1800 apgr./min.
15. Inkubējiet plati 5 minūtes istabas temperatūrā.
16. Centrifugējiet 10 sekundes ar ātrumu 280 × g.

17. Novietojiet uz MIDI plates magnētiskā statīva un nogaidiet, līdz šķidrums ir dzidrs (2 minūtes).
18. Pārnesiet 30 µl virsslāņa no katras 96 iedobju MIDI plates jaunas PĶR plates attiecīgajā iedobē.
19. Izmetiet MIDI plati.

DROŠAS PROTOKOLA PĀRTRAUKŠANAS PUNKTS

Ja procedūra tiek pārtraukta, pārklājiet plati un uzglabāiet līdz 7 dienas temperatūrā no -25 °C līdz -15 °C.

Papildināto DNS fragmentu banku pārbaude

Lai kvantitatīvi noteiktu dubultspirāles gDNS ievades elementu, izmantojiet no fluorescences atkarīgu metodi, kurā izmanto interkalējošu krāsvielu. Nav ieteicams izmantot metodes, kurās mēra kopējo nukleīnskābju daudzumu, piemēram, NanoDrop vai citas UV absorbcijas metodes.

1. Apstrādājiet 1 µl papildināto DNS fragmentu bankas, izmantojot kvantitatīvās noteikšanas metodei.

PIEZĪME. Kopējā zondes molaritāte proporcionāli ietekmē DNS fragmentu bankas rezultātu pēc papildināšanas.

Sagaidāms vidējais fragmenta izmērs 125–235 bp un DNS fragmentu ar izmēra diapazonu no ~200 bp līdz ~1000 bp sadalījums.

DNS fragmentu banku atšķaidīšana līdz sākuma koncentrācijai

Šajā darbībā DNS fragmentu banku atšķaida līdz konkrētās sekvencēšanas sistēmas sākuma koncentrācijai, un tā ir pirmā darbība sērijas atšķaidīšanas procesā. Kad DNS fragmentu bankas ir atšķaidītas līdz sākuma koncentrācijai, tās var denaturēt un atšķaidīt līdz galīgajai ievietošanas koncentrācijai.

Neatkarīgi no izmantotā papildināšanas zondes paneļa sekvencēšanai Illumina iesaka iestatīt DNS sekvenču pāru izpildi ar 151 ciklu vienam nolasāmajam fragmentam (2 × 151) un 10 cikliem indeksa nolasāmajam fragmentam. Ja vēlaties izmantot mazāk pārklātos nolasāmos fragmentus vai mazāk rindu pārklājumu, var sekvencēt līdz 2 × 126 vai 2 × 101.

1. Aprēķiniet DNS vai apvienoto fragmentu banku molaritāti, izmantojot tālāk norādīto formulu.
 - DNS fragmentu analizatoram atbilstošām DNS fragmentu bankām izmantojiet tām iegūto vidējo izmēru.
 - Visām pārējām kvalitatīvās noteikšanas metodēm kā vidējo DNS fragmentu bankas izmēru izmantojiet 350 bp.

$$\frac{\text{ng} / \mu\text{l} \times 10^6}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \frac{\text{vidējais DNS fragmentu bankas lielums (bp)}}{}} = \text{Molaritāte (nM)}$$

Piemēram, ja konkrētās DNS fragmentu bankas koncentrācija ir 20 ng/µl un vidējais izmērs ir 350 bp, iegūtā molaritātes vērtība ir 86,58 nM.

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

2. Izmantojot molaritātes vērtību, aprēķiniet RSB un DNS fragmentu bankas tilpumu, kas ir nepieciešams, lai tās varētu atšķaidīt līdz sākuma koncentrācijai konkrētajā sistēmā.

Sekvencēšanas sistēma	Minimālais nepieciešamais DNS fragmentu bankas tilpums (μl)	Sākuma koncentrācija (nM)	Galīgā ievietošanas koncentrācija (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) vai 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM ir sākumkoncentrācija 350 pM galīgās ievietošanas koncentrācijas iegūšanai. Ja nepieciešams, pielāgojiet galīgo ievietošanas koncentrāciju saskaņā ar turpmāk sniegto tabulu.

Galīgā ievietošanas koncentrācija (pM)	Apvienotās DNS fragmentu bankas koncentrācija (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Atšķaidiet DNS fragmentu bankas, izmantojot RSB:
- **DNS fragmentu bankas, kuras ir kvantitatīvi noteiktas kā vairāku kompleksu DNS fragmentu banku kopparaugs** — atšķaidiet kopparaugu līdz konkrētās sistēmas sākuma koncentrācijai.
 - **DNS fragmentu bankas, kuras ir kvantitatīvi noteiktas individuāli** — atšķaidiet katru DNS fragmentu banku līdz konkrētās sistēmas sākuma koncentrācijai. Pievienojiet stobriņā 10 μl no katras atšķaidītās DNS fragmentu bankas, lai izveidotu vairāku kompleksu DNS fragmentu banku kopparaugu.
4. Lai atšķaidītu līdz galīgajai ievietošanas koncentrācijai, ievērojiet denaturācijas un atšķaidīšanas norādījumus konkrētajai sistēmai.

- NextSeq 550Dx sistēmas gadījumā skatiet sadaļu [Sekvencēšanas NextSeq 550Dx instrumentā sagatavošana 50. lpp.](#)
- MiSeqDx sistēmas gadījumā skatiet sadaļu [Sekvencēšanas MiSeqDx instrumentā sagatavošana 51. lpp.](#)
- NextSeq 6000Dx sistēmas gadījumā skatiet sadaļu [Sekvencēšanas NovaSeq 6000Dx instrumentā sagatavošana 53. lpp.](#)

Galīgās ievietošanas koncentrācijas ir sākuma punkts un vispārēja norāde. Optimizējiet konkrētās darbplūsmas koncentrācijas un kvantitatīvās noteikšanas metodes, izmantojot turpmākās sekvencēšanas izpildes vai veicot plūsmas kivešu titrēšanu.

Sekvencēšanas NextSeq 550Dx instrumentā sagatavošana

Sekvencēšanai NextSeq 550Dx instrumentā ievērojiet tālāk sniegtos norādījumus par DNS fragmentu banku denaturēšanu un atšķaidīšanu.

Palīgmateriāli

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

Sagatavošana

Sagatavojiet *svaigu* 0,2N NaOH šķīdumu, lai denaturētu DNS fragmentu bankas sekvencēšanai. Lai novērstu nelielu pipetēšanas kļūdu ietekmi uz galīgo NaOH koncentrāciju, tiek sagatavots papildu tilpums.



UZMANĪBU!

Svaigi atšķaidīts 0,2N NaOH ir būtiski nepieciešams denaturācijas procesā. Nepareiza denaturēšana var samazināt rezultātu.

1. Lai atšķaidītu 1N NaOH un iegūtu 0,2N NaOH, mikrocentrifūgas stobriņā apvienojiet tālāk norādītos tilpumus.
1. Sagatavojiet tālāk norādītos palīgmateriālus.

ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
HT1	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet istabas temperatūrā. Uzglabājiet no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā, līdz denaturētās DNS fragmentu bankas var denaturēt.

2. Lai pagatavotu *svaigu* NaOH atšķaidījumu, mikrocentrifūgas mēģenē apvienojiet šādus tilpumus:
 - Laboratorijas kvalitātes ūdens (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)legūtais rezultāts ir 1 ml 0,2N NaOH.
3. Apvērsiet stobriņu vairākas reizes, lai samaisītu.

illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis illumina®

4. Mikrocentrifūgas stobriņā apvienojiet tālāk norādītos tilpumus, lai sagatavotu 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.
 - Laboratorijas klases ūdens (800 µl)
 - 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)legūtais rezultāts ir 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

PIEZĪME. Stobriņiem jābūt aizvākotiem. Izmantojiet svaigu atšķaidījumu **12 stundu** laikā.

DNS fragmentu banku denaturācija

1. Mikrocentrifūgas stobriņā apvienojiet tālāk norādītos DNS fragmentu bankas un svaigi atšķaidīta 0,2N NaOH tilpumus.
 - DNS fragmentu banka 10 µl
 - 10 µl 0,2N NaOH
2. Īsu brīdi maisiet un pēc tam 1 minūti centrifugējiet ar ātrumu 280 × g.
3. Inkubējiet 5 minūtes istabas temperatūrā.
4. Pievienojiet 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Denaturēto DNS fragmentu banku atšķaidīšana līdz 20 pM

1. Pievienojiet stobriņā ar denaturētām DNS fragmentu bankām 970 µl iepriekš atdzesēta HT1. legūtais rezultāts ir 20 pM denaturēta DNS fragmentu banka.
2. Īsu brīdi maisiet un pēc tam 1 minūti centrifugējiet ar ātrumu 280 × g.
3. Novietojiet 20 pM denaturētās DNS fragmentu bankas uz ledus, līdz var veikt galīgo atšķaidīšanu.

DNS fragmentu banku atšķaidīšana līdz ievietošanas koncentrācijai

1. Lai atšķaidītu denaturētas 20 pM DNS fragmentu bankas šķīdumu līdz 1,2 pM, pievienojiet tālāk norādītos tilpumus.
 - Denaturētas fragmentu bankas šķīdums (78 µl)
 - Iepriekš atdzesēts HT1 (1222 µl)Kopējais tilpums ir 1,3 ml pie 1,2 pM.
2. Apvēršiet, lai samaisītu, un pēc tam apstrādājiet impulsveida centrifūgā.
3. Pēc tam veiciet sekvencēšanu. Norādījumus skatiet *NextSeq 550Dx instrumenta atsauces rokasgrāmatā (dokuments Nr. 100000009513)*.

Sekvencēšanas MiSeqDx instrumentā sagatavošana

Sekvencēšanai MiSeqDx instrumentā ievērojiet tālāk sniegtos norādījumus par DNS fragmentu banku denaturēšanu un atšķaidīšanu.

Palīgmateriāli

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1N NaOH

Sagatavošana

Sagatavojiet *svaigu* 0,2N NaOH šķīdumu, lai denaturētu DNS fragmentu bankas sekvencēšanai. Lai novērstu nelielu pipetēšanas kļūdu ietekmi uz galīgo NaOH koncentrāciju, tiek sagatavots papildu tilpums.



UZMANĪBU!

Svaigi atšķaidīts 0,2N NaOH ir būtiski nepieciešams denaturācijas procesā. Nepareiza denaturēšana var samazināt rezultātu.

1. Lai atšķaidītu 1N NaOH un iegūtu 0,2N NaOH, mikrocentrifūgas stobriņā apvienojiet tālāk norādītos tilpumus.
1. Sagatavojiet tālāk norādītos palīgmateriālus.

ierīce	Uzglabāšana	Norādījumi
HT1	No -25 °C līdz -15 °C	Atkausējiet istabas temperatūrā. Uzglabājiet no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā, līdz denaturētās DNS fragmentu bankas var denaturēt.

2. Lai pagatavotu *svaigu* NaOH atšķaidījumu, mikrocentrifūgas mēģenē apvienojiet šādus tilpumus:
 - Laboratorijas kvalitātes ūdens (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)legūtais rezultāts ir 1 ml 0,2N NaOH.

PIEZĪME. Stobriņiem jābūt aizvākotiem. Izmantojiet *svaigu* atšķaidījumu **12 stundu** laikā.

4 nM DNS fragmentu bankas denaturācija

1. Mikrocentrifūgas stobriņā apvienojiet tālāk norādītos tilpumus.
 - 4 nM DNS fragmentu banka (5 µl)
 - 0,2N NaOH (5 µl)
2. Īsu brīdi maisiet un pēc tam 1 minūti centrifugējiet ar ātrumu 280 × g.
3. Inkubējiet 5 minūtes istabas temperatūrā.
4. Pievienojiet stobriņā ar denaturētu DNS fragmentu banku 990 µl iepriekš atdzesētu HT1. legūtais rezultāts ir 1 ml 20 pM denaturētas DNS fragmentu banka.

Denaturētas 20 pM DNS fragmentu bankas atšķaidīšana

1. Atšķaidiet līdz vēlamajai koncentrācijai, izmantojot tālāk norādītos tilpumus.

Koncentrācija	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM DNS fragmentu banka	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Iepriekš atdzesēts HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Apvērsiet, lai samaisītu, un pēc tam apstrādājiet impulsveida centrifūgā.
3. Pēc tam veiciet sekvencēšanu. Norādījumus skatiet *MiSeqDx instrumenta uzziņu rokasgrāmatā par MOS v4* (dokuments Nr. 1000000157953).

Sekvencēšanas NovaSeq 6000Dx instrumentā sagatavošana

Sekvencēšanai NovaSeq 6000Dx instrumentā ievērojiet tālāk sniegtos norādījumus par DNS fragmentu banku denaturēšanu un atšķaidīšanu.

Palīgmateriāli

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

Sagatavošana

Sagatavojiet *svaigu* 0,2N NaOH šķīdumu, lai denaturētu DNS fragmentu bankas sekvencēšanai. Lai novērstu nelielu pipetēšanas kļūdu ietekmi uz galīgo NaOH koncentrāciju, tiek sagatavots papildu tilpums.



UZMANĪBU!

Svaigi atšķaidīts 0,2N NaOH ir būtiski nepieciešams denaturācijas procesā. Nepareiza denaturēšana var samazināt rezultātu.

1. Lai atšķaidītu 1N NaOH un iegūtu 0,2N NaOH, mikrocentrifūgas stobriņā apvienojiet tālāk norādītos tilpumus.

4. tabula. S2 režīms

Reāģents	Viena plūsmas elementa tilpums (µl)	Divu plūsmas elementu tilpums (µl)
Laboratorijas klases ūdens	40	80
Bāzes 1N NaOH	10	20

Šie tilpumi veido 50 µl 0,2N NaOH šķīduma vienam plūsmas elementam vai 100 µl 0,2N NaOH šķīduma diviem plūsmas elementiem.

5. tabula. S4 režīms

Reāģents	Viena plūsmas elementa tilpums (µl)	Divu plūsmas elementu tilpums (µl)
Laboratorijas klases ūdens	80	160
Bāzes 1N NaOH	20	40

Šie tilpumi veido 100 µl 0,2N NaOH šķīduma vienam plūsmas elementam vai 200 µl 0,2N NaOH šķīduma diviem plūsmas elementiem.

- Lai samaisītu, vairākas reizes apvērsiet vai arī rūpīgi samaisiet.

PIEZĪME. Stobriņiem jābūt aizvākotiem. Izmantojiet svaigu atšķaidījumu **12 stundu** laikā.

Standartizētas DNS fragmentu bankas kopparauga izveide

Ievietošanas koncentrācija var atšķirties atkarībā no DNS fragmentu bankas sagatavošanas, kvantitatīvās noteikšanas un normalizācijas metodēm.

Ievērojiet turpmāk sniegtos norādījumus, lai standartizētu DNS fragmentu bankas līdz atbilstošai koncentrācijai un pēc tam izveidotu kopparaugu. DNS fragmentu bankas, kas sekvencētas vienā plūsmas elementā, ir jāapvieno vienā standartizētā kopparaugā.

PIEZĪME. Vienā joslā, izmantojot Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit komplektu maksimāli var apstrādāt 192 paraugus. Šo ierobežojumu nosaka UD indeksu kopējais skaits A un B kopā.

DNS fragmentu banku standartizēšana kopparauga izveidei

- Nosakiet nepieciešamo DNS fragmentu bankas kopparauga koncentrāciju, pamatojoties uz vēlamo galīgo ievietošanas koncentrāciju.
 - Ja galīgā ievietošanas koncentrācija ir 350 pM, nepieciešamā DNS fragmentu bankas kopparauga koncentrācija ir 1,75 nM.
 - Lai noteiktu DNS fragmentu bankas kopparauga koncentrāciju atšķirīgai galīgajai ievietošanas koncentrācijai, skatiet sadaļu [DNS fragmentu banku atšķaidīšana līdz sākuma koncentrācijai 48. lpp.](#)
- Normalizējiet DNS fragmentu bankas līdz vēlamajai DNS fragmentu bankas kopparauga koncentrācijai, izmantojot 10 Tris-HCl, pH 8,5. Informāciju par DNS fragmentu banku atšķaidīšanu līdz atbilstošai koncentrācijai skatiet Illumina tīmekļa vietnes sadaļā [Kopparauga izveides kalkulators](#).

Ieteicamās ievietošanas koncentrācijas

Optimālā DNS ievietošanas koncentrācija ir atkarīga no DNS fragmentu bankas tipa un ievietošanas lieluma. DNS fragmentu bankām > 450 bp var būt nepieciešama lielāka ievietošanas koncentrācija.

Standartizētu DNS fragmentu banku kopparauga izveide un papildu PhiX kontroles pievienošana

1. Apvienojiet atbilstošu katras standartizētās DNS fragmentu bankas tilpumu jaunā mikrocentrifūgas stobriņā, lai iegūtu kādu no šādiem galīgajiem tilpumiem:

Režīms	Galīgais tilpums (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Nav obligāti]** Pievienojiet 1 % nedenaturētu PhiX, kā norādīts tālāk.
 - a. Atšķaidiet 10 nM PhiX līdz 2,5 nM, izmantojot 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
 - b. Stobriņā ar nedenaturētu DNS fragmentu banku kopparaugu pievienojiet atbilstošu nedenaturēta 2,5 nM PhiX tilpumu.

Režīms	Nedenaturēts 2,5 nM PhiX (µl)	Nedenaturēts DNS fragmentu bankas kopparaugs (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Pievienojot vielas PhiX, ieteicamais apjoms labi sabalansētām DNS fragmentu bankām ir 1 %. Zemas daudzveidības DNS fragmentu bankām var būt nepieciešams lielāks apjoms. Lai iegūtu norādījumus, kā izmantot PhiX kontroli zemas daudzveidības DNS fragmentu bankām, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.

Denaturēts DNS fragmentu banku kopparaugs un papildu PhiX kontrole

1. Stobriņā ar nedenaturētu DNS fragmentu bankas kopparaugu un papildu PhiX pievienojiet 0,2N NaOH, kā novērtēts tālāk.

Plūsmas elements	0,2N NaOH	Nedenaturēts DNS fragmentu bankas kopparaugs (µl)	legūtais tilpums
S2	37	150	187 µl vai 187,9 µl ar PhiX
S4	77	310	387 µl vai 388,9 µl ar PhiX

2. Aizvākojiet un īsu brīdi maisiet.
3. Centrifugējiet līdz 1 minūtei ar ātrumu 280 × g.

- Inkubējiet 8 minūtes istabas temperatūrā, lai denaturētu.
- Lai neitralizētu, pievienojiet 400 mM Tris-HCl, pH 8,0, kā norādīts tālāk.

Režīms	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	legūtais tilpums
S2	38	225 µl vai 225,9 µl ar PhiX
S4	78	465 µl vai 466,9 µl ar PhiX

- Aizvākojiet un īsu brīdi maisiet.
- Centrifugējiet līdz 1 minūtei ar ātrumu 280 × g.
- Pārnesiet visu denaturētās DNS fragmentu bankas tilpumu vai denaturētās DNS fragmentu bankas un PhiX tilpumu NovaSeq 6000Dx DNS fragmentu bankas stobriņā.
- Pēc tam veiciet sekvencēšanu. Norādījumus skatiet *NovaSeq 6000Dx instrumenta izstrādājuma dokumentācijā (dokuments Nr. 200010105)*.

Problēmu novēršana

Lai novērstu problēmas, kuras rodas darbplūsmas gaitā, izmantojiet nākamo tabulu. Ja sekvencēšanas izpilde vai DNS fragmentu bankas parauga sagatavošana neizdodas divas reizes, iespējams, ka ir jānovērš papildu problēmas. Sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.

Novērotā problēma	Iespējamais iemesls	Ieteicamā rīcība
Sekvencēšanas izpilde neatbilst izpildes kvalitātes kontroles specifikāciju kritērijiem	Lietotāja vai laboratorijas aprīkojuma kļūda analīzes darbplūsmā	<p>Nosakiet papildināto DNS fragmentu banku kvalitāti, lai nodrošinātu atbilstošu DNS fragmentu bankas rezultātu un fragmentu izmēra sadalījumu. Atkarībā no tā, kurā vietā radās aizdomas par izmantošanu vai aprīkojuma kļūdu, atkārtojiet DNS fragmentu bankas sagatavošanu, izpildot vienu no tālāk aprakstītajām darbībām. Ja tas nav zināms vai ir radušās citas kļūdas, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu, lai tā darbinieki novērš konkrētās izpildes problēmu.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Atkārtoti sekvencējiet DNS fragmentu banku. Skatiet sadaļu Sekvencēšanas NextSeq 550Dx instrumentā sagatavošana 50. lpp, Sekvencēšanas MiSeqDx instrumentā sagatavošana 51. lpp vai Sekvencēšanas NovaSeq 6000Dx instrumentā sagatavošana 53. lpp. • Atkārtoti papildiniet DNS fragmentu bankas. Skatiet sadaļu Zonžu hibridizēšana 37. lpp. • Sagatavojiet DNS fragmentu banku, izpildot darbplūsmu no sākuma. Skatiet sadaļu Lietošanas instrukcijas 22. lpp.
	Instrumenta problēma	Sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.
FASTQ izveides vai vispārēja sekvencēšanas sistēmas kļūda (piemēram, tīkla, reaģentu ievietošanas/izņemšanas kļūda utt.)	Programmatūras vai instrumenta problēma	<p>Papildinformāciju par FASTQ ģenerēšanu skatiet <i>Local Run Manager programmatūras rokasgrāmatā (dokuments Nr. 100000002702)</i> vai <i>NextSeq 550Dx instrumenta atsaucēs rokasgrāmatā (dokuments Nr. 1000000009513)</i>, <i>MiSeqDx instrumenta uzziņu rokasgrāmatā programmatūrai MOS v4 (dokuments Nr. 1000000157953)</i> vai <i>NextSeq 6000Dx instrumenta izstrādājuma dokumentācijā (dokuments Nr. 200010105)</i>.</p> <p>Sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu, lai saņemtu papildu palīdzību.</p>

Novērotā problēma	Iespējamais iemesls	Ieteicamā rīcība
No DNS fragmentu bankām nevar iegūt atbilstošu rezultātu, lai to varētu izmantot sekvencēšanai	Nav ievērotas prasības parauga ievades elementam	Pārbaudiet, vai ir piemērots parauga ievades elements, un atkārtojiet DNS fragmentu bankas sagatavošanu. Skatiet sadaļu Ieteikumi par parauga ievades elementu 18. lpp.
	Lietošanas vai aprīkojuma kļūda analīzes darbplūsmā	Atkarībā no tā, kurā vietā radās aizdomas par izmantošanu vai aprīkojuma kļūdu, atkārtojiet DNS fragmentu bankas sagatavošanu, izpildot vienu no tālāk aprakstītajām darbībām. Ja tas nav zināms vai ir radušās citas kļūdas, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu, lai tā darbinieki novērs konkrētās izpildes problēmu. <ul style="list-style-type: none"> • Atkārtoti sekvencējiet DNS fragmentu banku. Skatiet sadaļu Sekvencēšanas NextSeq 550Dx instrumentā sagatavošana 50. lpp., Sekvencēšanas MiSeqDx instrumentā sagatavošana 51. lpp. vai Sekvencēšanas NovaSeq 6000Dx instrumentā sagatavošana 53. lpp. • Atkārtoti papildiniet DNS fragmentu bankas. Skatiet sadaļu Zonžu hibridizēšana 37. lpp. • Sagatavojiet DNS fragmentu banku, izpildot darbplūsmu no sākuma. Skatiet sadaļu Lietošanas instrukcijas 22. lpp.
	Nav ievērotas prasības papildināšanas zondes panelim	Pārbaudiet, vai papildināšanas zondes panelis ir piemērots, un atkārtojiet DNS fragmentu bankas sagatavošanu. Skatiet sadaļu Prasības papildināšanas zondes panelim 10. lpp.

Veiktspējas raksturlielumi

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NovaSeq 6000Dx veiktspējas parametri ir sniegti *NovaSeq 6000Dx instrumenta iepakojuma ieliktnī (dokumenta Nr. 200025276)*.

Veiktspēja, izmantojot pilnus eksomu paneļus

Eksomu paneļu veiktspēju testēja, izmantojot ieteikto zemāko (50 ng) un augstāko (1000 ng) Coriell Cell Line gDNA NA12878 ievades elementu ar zināmo patiesības kopumu dzimumšūnas līnijas noteikšanai (Coriell platīna genoms). Kā reprezentatīvie paneļi tika izmantoti eksoma panelis Nr. 1 (45 Mb) un eksoma panelis Nr. 2 (36,8 Mb). Tika veikta testēšana ar 24 tehniskiem atkārtojumiem, izmantojot Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzē analīzi un eksoma paneli Nr 1 (45 Mb), ar divām 12 kompleksu papildināšanas reakcijām. Tika veikta

illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis

testēšana ar 12 tehniskiem atkārtojumiem, izmantojot Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi un eksomu paneli Nr. 2 (36,8 Mb), ar vienu 12 kompleksu papildināšanas reakciju. Papildinātās DNS fragmentu bankas sekvencēja, izmantojot NextSeq 550Dx sekvencēšanas sistēmu ar DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager moduli.

Nākamajā tabulā ir norādītas tehniskos atkārtojumus testētā katra paneļa sekundārās sekvencēšanas un variantu izsaukšanas veiktspējas rādītāju vidējās vērtības.

6. tabula. Analīzes veiktspēja ar diviem pilniem eksomu paneļiem

Panelis	Papildu unikālā nolasāmā fragmenta papildināšana	Aptvēruma viendabīgums	Fragmenta garuma mediāna	SNV pārklājums ¹	SNV precizitāte ²	Delēcijas pārklājums ¹	Delēcijas precizitāte ²
Eksomu panelis Nr. 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Eksomu panelis Nr. 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹Pārklājums=pozitīvs/(pareizi pozitīvi rezultāti + kļūdaini negatīvi rezultāti)

²Precizitāte=pareizi pozitīvi rezultāti/(pareizi pozitīvi rezultāti + kļūdaini negatīvi rezultāti)

Noteikšanas robeža

Noteikšanas robežas testēšanai izmantoja Horizon HD799 DNS atsaucis standartu. HD799 veido vidēji bojāta ar formalīnu apstrādāta DNS ar zināmām atsevišķām nukleotīdu variācijām (single nucleotide variation, SNV) ar alēļu biežumu 1–24,5 %. Tika izmantota viszemākā ieteicamā DNS ievade (50 ng), un tika novērtēta SNV noteikšanas attiecība ar $\geq 5,0$ % varianta alēļu biežumu (VAF). Tika veikta testēšana ar 16 tehniskiem atkārtojumiem, izmantojot Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi un FFPE darbplūsmu, kuru papildināja ar vēža parauga papildināšanas paneli (1,94 Mb) 16 (1 komplekss) papildināšanas elementos un pēc tam sekvencēja, izmantojot NextSeq 550Dx instrumentu ar DNA GenerateFASTQ Dx moduli.

Visi paraugi atbilda no paneļa atkarīgas parauga veiktspējas prasībām, kā redzams nākamajā tabulā.

7. tabula. Parauga veikspēja attiecībā uz noteikšanas robežu

Panelis	Atsevišķu nukleotīdu variāciju (SNV) varianta noteikšanas attiecība $\geq 5,0\%$ VAF	Vidējā vērtība Aptvēruma viendabīgums
Jebkāda vēža parauga papildināšanas panelis (1,94 Mb, 523 gēni)	100 %	99 %

Interferējošas vielas

Potenciālo interferentu ietekme tika novērtēta, izmantojot illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi un novērojot analīzes veikspēju interferējošo vielu klātbūtnē.

Mijiedarbība ar nesadalītām asinīm

Pirms DNS ekstrahēšanas pārbaudīja acetaminofēnu (eksogēns savienojums, zāles), kreatinīnu un triglicerīdus (endogēni metabolīti), tos pievienojot cilvēka nesadalītām asinīm. Lai novērtētu interferenci, kuru rada asins paraugu ņemšana (nepietiekama daudzuma parauga ņemšana), nesadalītu asiņu parauga materiāliem pievienoja EDTA. Lai novērtētu interferenci, kas saistīta ar paraugu sagatavošanu, no nesadalītām asinīm ekstrahētai DNS pievienoja arī molekulāras kvalitātes etanolu.

Nākamajā tabulā ir norādīta katra interferenta koncentrācija.

8. tabula. Potenciāli interferējošas vielas un koncentrācijas, kuras testētas, izmantojot nesadalītas asinis

Testētā viela	Testētā koncentrācija
Acetaminofēns	15,6 mg/dl* Trīs reizes augstāka koncentrācija, kas sagaidāma pēc zāļu terapeitiskās devas.
Kreatinīns	15 mg/dl* Augstākā populācijā novērotā koncentrācija.
Triglicerīdi	1,5 g/dl* Augstākā populācijā novērotā koncentrācija.
EDTA	6 mg/ml Trīs reizes augstāka koncentrācija nekā sagaidāmā koncentrācija asins paraugam, kas paņemts EDTA stobriņos.
Molekulāras kvalitātes etanols	15 % v/v Eluātā pēc DNS ekstrahēšanas.

*Saskaņā ar CLSI EP37-ED1:2018

illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis

Katra interferējošā viela tika testēta ar 12 tehniskiem atkārtojumiem, izmantojot Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi, kuru papildināja ar eksomu paneli Nr. 1 (45 Mb) vienā (12 kompleksi) papildināšanas reizē, un pēc tam tās sekvencēja NextSeq 550Dx instrumentā, izmantojot DNA GenerateFASTQ Dx moduli.

Testēto vielu visi 12 parauga materiāli atbilda veikspējas prasībām, kā arī netika novērota interference ar analīzes veikspēju.

Interference ar FFPE audiem

Divi kolorektālās zarnas FFPE paraugi tika testēti ar un bez hemoglobīna klātbūtnes ar 0,1 mg vienā 10 µm FFPE histoloģijas paraugā, lai iegūtu sliktāko iespējamo scenāriju — 50 % FFPE audu paraugu piesārņojums ar asinīm ar augstu hemoglobīna līmeni. Parauga materiālus testēja, izmantojot Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi un jebkāda vēža parauga papildināšanas paneli Nr. 1 (1,94 Mb) kā reprezentatīvu paneli viena kompleksa papildināšanas elementos. Papildinātās DNS fragmentu bankas pēc tam tika sekvencētas, izmantojot NextSeq 550Dx instrumentu ar DNA GenerateFASTQ Dx moduli. Visi paraugu materiāli atbilda parauga veikspējas prasībām, un tika pierādīts, ka hemoglobīns neietekmē analīzes veikspēju.

Lai novērtētu interferenci, kas rodas paraugu sagatavošanas laikā, no urīnpūšļa vēža FFPE audu parauga ekstrahētajā DNS tika iekļauti divi eksogēni savienojumi. Testētās eksogēnās vielas ir ekstrakcijas šķīdumi, ko parasti izmanto DNS ekstrakcijas procesā, un tās kopā ar testētajiem daudzumiem ir norādītas nākamajā tabulā.

Testējamās vielas šķīdumi ir pieejami pārdošanā DNS izolācijas komplektos, kas ir norādīti ailē.

9. tabula. Potenciāli interferējošas eksogēnās vielas un testētās koncentrācijas, izmantojot FFPE paraugus

Testētā viela	Testētā koncentrācija (µl/30 µl eluāts)
Deparafinizācijas šķīdums	113 x 10 ⁻⁶
Mazgāšanas buferšķīdums AW2	0,417

Katra interferējošā viela tika testēta ar astoņiem tehniskiem atkārtojumiem, izmantojot Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi, kuru papildināja ar jebkāda vēža parauga papildināšanas paneli (1,94 Mb) viena kompleksa papildināšanas elementos un pēc tam sekvencēja, izmantojot NextSeq 550Dx instrumentu ar DNA GenerateFASTQ Dx moduli.

Attiecībā uz abām testētajām vielām visi astoņi paraugi atbilda parauga veikspējas prasībām, un netika novērota nekāda analīzes veikspējas interference.

Savstarpēja kontaminācija

Izmantojot Illumina DNA Prep with Enrichment Dx analīzi, testēja Coriell Cell Line gDNA NA12878 (sieviešu, 10 paraugu), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (vīriešu, 12 paraugi) un kontroli bez matricas (NTC, 2 paraugi) šaha dēlīša veida plates izkārtjumā. Paraugu savstarpējās kontaminācijas novērtēšanai kā visstingrāko nosacījumu visiem paraugiem izmantoja visaugstāko ieteikto gDNS ievades elementa vērtību (1000 ng). Testēšanu veica divas reizes divi atsevišķi lietotāji. 12 kompleksu papildināšanas reakcijās izmantoja eksomu paneli Nr. 1

illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis

(45 Mb). Papildinātās DNS fragmentu bankas sekvencēja NextSeq 550Dx instrumentā ar DNA GenerateFASTQ Dx moduli. Novērtējums tika veikts, novērtējot vīriešiem specifiskās Y hromosomas pārklājumu sieviešu paraugos, salīdzinot ar pilnas sieviešu paraugu plates fona līmeņiem, kā arī ar NTC paraugu indeksa attēlojumu.

10. tabula. Savstarpējas kontaminācijas rezultāti

Sieviešu audu paraugu ar vīriešu Y hromosomām pārklājums, ja bāzes līnijas troksnis ir < 3x	Indeksa attēlojums kontrolē bez matricas (NTC)
100 %	< 0,0005 %

Pielikums. Illumina UD indeksu adaptera sekvences

Šie unikālie dubultie (UD) indeksu adapteri platē ir sakārtoti, lai uzlabotu ieteikto sapārošanas stratēģiju. Šo indeksa adapteru garums ir 10 bāzes, nevis 8 bāzes kā parasti.

Indeksa Nr. 1 (i7) adapteri

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Indeksa Nr. 2 (i5) adapteri

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Nolasāmā fragmenta Nr. 1 un Nr. 2 apgriešanai izmantot tālāk norādītās sekvences.

CTGTCTCTTATACACATCT

Plates A/komplekta Nr. 1 indeksa adapteri

Indeksa nosaukums	i7 bāzes adapterā	i5 bāzes adapterā
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

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis

Indeksa nosaukums	i7 bāzes adapterā	i5 bāzes adapterā
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis

Indeksa nosaukums	i7 bāzes adapterā	i5 bāzes adapterā
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA

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

Plates B/komplekta Nr. 2 indeksa adapteri

Indeksa nosaukums	i7 bāzes adapterā	i5 bāzes adapterā
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis

Indeksa nosaukums	i7 bāzes adapterā	i5 bāzes adapterā
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGATT

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis

Indeksa nosaukums	i7 bāzes adapterā	i5 bāzes adapterā
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx iepakojuma ieliktnis

Indeksa nosaukums	i7 bāzes adapterā	i5 bāzes adapterā
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTGTAT
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	GAGATGTCTGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT

Indeksa nosaukums	i7 bāzes adapterā	i5 bāzes adapterā
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTA CT

Pārskatījumu vēsture

Dokuments	Datums	Izmaiņu apraksts
Dokuments Nr. 200019584 v02	2022. gada septembris	Pievienots saturs, lai atbalstītu sekvenčēšanu ar NovaSeq 6000Dx instrumentu.
Dokuments Nr. 200019584 v01	2022. gada maijs	Pievienoti sekvenčēšanas sistēmu nosaukumi un kataloga numuri. Noņemta informācija par unikālo dubulto indeksēšanu viena indeksa DNS fragmentu bankām.
Dokuments Nr. 200019584 v00	2022. gada maijs	Sākotnējais laidieni.

Patenti un preču zīmes

Šī dokumenta un tā satura īpašumtiesības pieder uzņēmumam Illumina, Inc. un tā saistītajiem uzņēmumiem ("Illumina"), un klients to drīkst izmantot tikai līgumā noteiktajā veidā saistībā ar šajā dokumentā aprakstīto izstrādājumu lietošanu, un nekādiem citiem nolūkiem. Šo dokumentu un tā saturu nedrīkst izmantot vai izplatīt nekādiem citiem nolūkiem un/vai citādi publiskot, atklāt vai reproducēt jebkādā veidā bez iepriekšējas rakstiskas Illumina piekrišanas. Ar šo dokumentu Illumina nenodod nekādas licences, ko paredz tā patents, preču zīmes, autortiesības vai anglosakšu tiesības, nedz arī līdzīgas jebkuras trešās puses tiesības.

Šajā dokumentā sniegtie norādījumi ir stingri un precīzi jāievēro kvalificētiem un atbilstoši apmācītiem darbiniekiem, lai nodrošinātu šeit aprakstītā(-o) produkta(-u) pareizu un drošu lietošanu. Pirms šī izstrādājuma(-u) lietošanas ir pilnībā jāizlasa un jāizprot viss šī dokumenta saturs.

PILNĪBĀ NEIZLASOT UN PRECĪZI NEIEVĒROJOT VISUS ŠAJĀ DOKUMENTĀ IEKĻAUTOS NORĀDĪJUMUS, VAR RASTIES PRODUKTA(-U) BOJĀJUMI, PERSONU MIESAS BOJĀJUMI, TOSTARP LIETOTĀJU UN CITU PERSONU, UN CITA ĪPAŠUMA BOJĀJUMI, TURKLĀT TIKS ANULĒTAS VISAS PRODUKTAM(-IEM) PIEMĒROJAMĀS GARANTIJAS.

ILLUMINA NEUZŅEMAS NEKĀDU ATBILDĪBU, KAS IZRIET NO NEPAREIZAS ŠAJĀ DOKUMENTĀ APRAKSTĪTO PRODUKTU (TOSTARP TĀ DAĻU VAI PROGRAMMATŪRAS) LIETOŠANAS.

© 2022 Illumina, Inc. Visas tiesības paturētas.

Visas preču zīmes ir Illumina, Inc. vai to attiecīgo īpašnieku īpašums. Konkrētu informāciju par preču zīmēm skatiet vietnē:

www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformācija



illumina
5200 illumina Way
San Diego, California 92122, ASV
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (ārpus Ziemeļamerikas)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Nīderlande

Austrālijas sponsors

illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Austrālija

Produktu marķēšana

Vispusīgu atsauci uz simboliem, kas redzami uz konkrētā komplekta produkta iepakojuma un marķējuma, skatiet simbolu atslēgā vietnes support.illumina.com cilnē *Dokumentācija*.