

NA DIAGNOSTICKÉ POUŽITIE IN VITRO
IBA NA EXPORT

Účel použitia

Súprava Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx je súpravou reagensí a spotrebného materiálu, ktorá sa používa na prípravu knižníc vzoriek z genómovej DNA získanej z ľudských buniek a tkanív. Panely sond na prípravu knižníc, ktoré cieľia na špecifické genómové oblasti, musí zabezpečiť používateľ. Vytvorené knižnice vzoriek sú určené na použitie so sekvenovacími systémami spoločnosti Illumina.

Zásady postupu

Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je určená na prípravu knižníc DNA na sekvenovanie obohatených o cieľové oblasti z genómovej DNA získanej z ľudských buniek a tkaniva.

Na cieľové obohatenie sa vyžadujú používateľom dodané biotinylované panely oligonukleotidov. Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilná s mnohými veľkosťami panelov od malých (< 20 000 sond) až po veľké (> 200 000 sond). Vytvorené obohatené knižnice sú určené na použitie so sekvenovacími systémami spoločnosti Illumina.

Postup práce so súpravou Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sa skladá z týchto krokov:

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

Enrichment Dx sú kompatibilné s oligonukleotidovými panelmi na obohatenie DNA vyrobenými spoločnosťou Illumina alebo tretími stranami, pokiaľ spĺňajú požadované parametre. Informácie o požadovaných parametroch panelov tretích strán nájdete v časti [Požiadavky na panel sond na obohatenie na strane 10](#).

- **Zachytenie hybridizovaných sond** – používa magnetické guľôčky so streptavidínom (SMB3, Streptavidin Magnetic Beads) na zachytenie biotinylovaných sond hybridizovaných na požadované cieľové oblasti.
- **Amplifikácia obohatených knižníc** – používa PCR na amplifikáciu obohatených knižníc.
- **Prečistenie amplifikovaných obohatených knižníc** – používa postup purifikácie na guľôčkach (beads) na purifikáciu obohatených knižníc pripravených na sekvenovanie.
- **Sekvenovanie** – sekvenovanie obohatených knižníc sa vykonáva v sekvenovacích systémoch MiSeqDx, NextSeq 550Dx alebo NovaSeq 6000Dx. Na nastavenie sekvenovacieho chodu, monitorovanie chodu a primárnu analýzu v systémoch MiSeqDx a NextSeq 550Dx sa používa integrovaný modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager (vytvorenie FASTQ z volaní bázy). V systéme NovaSeq 6000Dx sa na nastavenie chodu a sekundárnu analýzu s viacerými dostupnými pracovnými postupmi používa aplikácia DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Obmedzenia postupu

- Na diagnostické použitie *in vitro*.
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilná s genómovou DNA získanou z ľudských buniek a tkaniva.
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilná so vstupným množstvom dvojláknovej gDNA 50 – 1 000 ng. Nezaručuje sa správna výkonnosť, keď sa vstupné parametre nenachádzajú v tomto rozpätí.
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx neobsahuje reagenty na extrakciu DNA. Získali sa analytické testovacie výsledky vrátane testovania interferencií uvedeného v časti [Výkonnosť charakteristiky na strane 57](#) v prípade plnej krvi a FFPE ako reprezentatívnych typov vzoriek s reprezentatívnymi súpravami na extrakciu DNA. Všetky diagnostické testy vyvinuté na použitie s reagentami súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vyžadujú plnú validáciu všetkých aspektov výkonnosti s vybranou súpravou na extrakciu DNA.
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sa neodporúča pri vzorkách FFPE slabšej kvality s $\Delta Cq > 5$. Použitie vzoriek s $\Delta Cq > 5$ môže zvýšiť pravdepodobnosť zlyhania prípravy knižnice a znížiť výkon testu.
- Reagenty súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx boli konfigurované a testované na vloženie vzorky, reakcie obohatenia a násobnosť uvedenú v nasledujúcej tabuľke.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx	Vstupná vzorka	Reakcie obohatenia	Násobnosť obohatenia
Súprava so 16 vzorkami	Nízka kvalita (FFPE)	16 reakcií	1-násobné
Súprava so 96 vzorkami	Vysoká kvalita (napr. plná krv)	8 reakcií	12-násobné

- Postup vkladania FFPE bol testovaný a odporúča sa len pri 1-násobných reakciách obohatenia pri použití súpravy so 16 vzorkami.
- Pri súprave s 96 vzorkami možno použiť neštandardnú násobnosť (2 až 11), existujú však tieto obmedzenia:
 - Spracúvanie vzoriek v 2-násobných až 11-násobných reakciách obohatenia znižuje výkonnosť súpravy.
 - Nie sú zaručené optimálne výsledky. Na dosiahnutie vhodného výťažku obohatenia pri neštandardných násobnostiach môže byť potrebná dodatočná optimalizácia.
 - Pri stratégiách združovania s nízkou násobnosťou (2-násobné až 8-násobné) je potrebné vybrať adaptéry indexov s rôznymi sekvenciami, aby sa optimalizovala rovnováha farieb na úspešné sekvenovanie a analýzu údajov. Modul DNA GenerateFASTQ Dx na prístrojoch MiSeqDx a NextSeq 550Dx poskytuje možnosti farebne vyvážených indexových kombinácií počas nastavenia chodu. Viac informácií o metódach združovania nájdete v časti [Metódy združovania na strane 33](#).
- Použitie súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je obmedzené na dodanie obohatených knižníc sekvenovaných len v prístrojoch MiSeqDx, NextSeq 550Dx a NovaSeq 6000Dx. Použitie iných sekvenovacích systémov vyžaduje plnú validáciu všetkých aspektov výkonnosti.
- Panely na obohatenie nie sú súčasťou tohto výrobku. Výsledky analytického testovania uvedené v časti [Výkonnosť charakteristiky na strane 57](#) boli získané pomocou reprezentatívnych panelov na obohatenie a slúžia len na informačné účely. Charakteristiky analytickej výkonnosti slúžia ako príklad všeobecných schopností analýzy a nestanovujú schopnosti alebo vhodnosť v súvislosti so špecifickými nárokmi na analýzu. Všetky diagnostické testy vyvinuté na použitie s týmito reagenciami vyžadujú plnú validáciu všetkých aspektov výkonnosti.
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilná s panelmi na obohatenie vyrobenými spoločnosťou Illumina alebo tretími stranami. S panelmi na obohatenie vyrobenými tretími stranami, ktoré nespĺňajú požiadavky na panely, sa však nezaručuje správna výkonnosť. Informácie o požiadavkách na panel sond na obohatenie nájdete v časti [Požiadavky na panel sond na obohatenie na strane 10](#).
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx používa 2-hodinovú hybridizáciu. Dlhší čas hybridizácie môže ovplyvniť metriku výkonnosti.
- Moduly DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager pre MiSeqDx a NextSeq 550Dx poskytujú len súbory FASTQ. Ak používate tieto moduly, je potrebné, aby ste vykonali sekundárnu validáciu analýzy.
- Aplikácia DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je dostupná pre prístroj NovaSeq 6000Dx. Táto aplikácia podporuje viacero pracovných postupov sekundárnej analýzy vrátane generovania FASTQ,

generovania FASTQ a VCF na detekciu germinálneho variantu a generovanie FASTQ a VCF na detekciu somatického variantu. Ak používate aplikáciu na generovanie VCF, nemusíte vykonať sekundárnu validáciu analýzy.

- Z dôvodu obmedzení aplikácie DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pri použití s prístrojom NovaSeq 6000Dx si preštudujte príbalový leták prístroja *NovaSeq 6000Dx* (dokument č. 200025276).

Súčasti produktu

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

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

Dodávané reagensie

Vykonanie testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vyžaduje použitie súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A alebo súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes B. Môžete vykonať nasledujúci počet reakcií prípravy a obohatenia knižníc použitím súpravy so 16 alebo s 96 vzorkami.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx	Vstupná vzorka	Reakcie obohatenia	Násobnosť obohatenia
Súprava so 16 vzorkami	Nízka kvalita (FFPE)	16 reakcií	1-násobné
Súprava so 96 vzorkami	Vysoká kvalita (napr. plná krv)	8 reakcií	12-násobné

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

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, skladovanie pri teplote 15 °C až 30 °C

Nasledujúce reagenty sa prepravujú pri izbovej teplote. Reagenty rýchlo uskladnite v prostredí so stanovenou teplotou skladovania, aby ste zabezpečili ich správnu funkčnosť.

Názov reagentie	Množstvo skúmaviek		Farba viečka	Objem plnenia	Aktívne látky
	16 vzoriek (č.20050020)	96 vzoriek (č.20050025)			
Pufer na zastavenie tagmentácie 2 (ST2, Stop Tagment Buffer 2)	1	4	Červená	350 µl	Čistiaci roztok vo vode.
Preplachovací pufer na tagmentáciu 2 (TWB2, Tagment Wash Buffer 2)	1	1	Zelená	41 ml	Pufrovaný vodný roztok s obsahom čistiaceho prostriedku a soli.
Čistiace guľôčky (CB, Cleanup Beads)	1	Nevzťahuje sa*	Červená	10 ml	Paramagnetické guľôčky v pevnom skupenstve v pufrovanom vodnom roztoku.

* Čistiace guľôčky pre 96 vzoriek sú zahrnuté vo výrobku Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (č. 20050030).

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

Pri súpravách na 96 vzoriek sú čistiace guľôčky zahrnuté vo výrobku Illumina Prep Dx Cleanup Beads (katalógové č. 20050030). Nasledujúca reagentia sa prepravuje pri izbovej teplote. Reagenty rýchlo uskladnite v prostredí so stanovenou teplotou skladovania, aby ste zabezpečili ich správnu funkčnosť. Pri súpravách na 16 vzoriek sú čistiace guľôčky zahrnuté vo výrobku Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (katalógové č. 20050020).

Názov reagentie	Množstvo	Farba viečka	Objem plnenia	Aktívne látky
Čistiace guľôčky (CB, Cleanup Beads)	4	Červená	10 ml	Paramagnetické guľôčky v pevnom skupenstve v pufrovanom vodnom roztoku.

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

Nasledujúce reagencie sa prepravujú chladené. Reagencie rýchlo uskladnite v prostredí so stanovenou teplotou skladovania, aby ste zabezpečili ich správnu funkčnosť. Skúmavku so zásobou eBLTS skladujte vo zvislej polohe, aby boli guľôčky stále ponorené v pufri.

Názov reagencie	Množstvo skúmaviek		Farba viečka	Objem plnenia		Aktívne látky
	16 vzoriek (č.20050021)	96 vzoriek (č.20050026)		16 vzoriek	96 vzoriek	
Malý BLT panel na obohatenie (eBLTS, Enrichment BLT Small)	1	4	Žltá	200 µl	290 µl	Magnetické guľôčky so streptavidínom spojené s transpozónmi v pufrovanom vodnom roztoku s obsahom glycerolu, EDTA, ditiotreitolu, soli a čistiaceho prostriedku.
Pufer na resuspenziu (RSB, Resuspension Buffer)	1	4	Číra	1,8 ml	1,8 ml	Pufrovaný vodný roztok.

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

Nasledujúce reagencie sa prepravujú zmrazené. Reagencie rýchlo uskladnite v prostredí so stanovenou teplotou skladovania, aby ste zabezpečili ich správnu funkčnosť.

Názov reagencie	Množstvo skúmaviek		Farba viečka	Objem plnenia		Aktívne látky
	16 vzoriek (č.20050022)	96 vzoriek (č.20050027)		16 vzoriek	96 vzoriek	
Tagmentačný pufer 1 (TB1, Tagmentation Buffer 1)	1	4	Číra	290 µl	290 µl	Pufrovaný vodný roztok s obsahom horčíkovej soli a dimetylformamidu.

Názov reagensie	Množstvo skúmaviek		Farba viečka	Objem plnenia		Aktívne látky
	16 vzoriek (č.20050022)	96 vzoriek (č.20050027)		16 vzoriek	96 vzoriek	
Vylepšená PCR zmes (EPM, Enhanced PCR Mix)	2	4	Číra	200 µl	610 µl	DNA polymeráza a dNTP v pufrovanom vodnom roztoku.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 vzoriek), skladovanie pri teplote 2 °C až 8 °C

Pri súpravách na 16 vzoriek sú do produktu Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 zahrnuté tieto reagensie (katalógové č. 20050023). Pri súpravách na 96 vzoriek sú do produktu Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 zahrnuté tieto reagensie (katalógové č. 20050028).

Nasledujúce reagensie sa prepravujú chladené. Reagensie rýchlo uskladnite v prostredí so stanovenou teplotou skladovania, aby ste zabezpečili ich správnu funkčnosť.

Názov reagensie	Množstvo skúmaviek	Farba viečka	Objem plnenia	Aktívne látky
Magnetické guľôčky so streptavidínom (SMB3, Streptavidin Magnetic Beads)	4	Číra	1,2 ml	Magnetické guľôčky so streptavidínom v pufrovanom vodnom roztoku s obsahom formamidu, čistiaceho prostriedku a soli.
Pufer na resuspenziu (RSB, Resuspension Buffer)	1	Číra	1,8 ml	Pufrovaný vodný roztok.
Hybridizačný pufer na obohatenie (EHB2, Enrichment Hyb Buffer 2)	1	Číra	200 µl	Pufrovaný vodný roztok s obsahom čistiaceho prostriedku a soli.
Elučný cieľový pufer 2 (ET2, Elute Target 2)	1	Číra	200 µl	Pufrovaný vodný roztok.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 vzoriek), skladovanie pri 2 °C až 8 °C

Pri súpravách na 96 vzoriek sú do produktu Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 zahrnuté tieto reagensie (katalógové č. 20050028). Pri súpravách na 16 vzoriek sú do produktu Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 zahrnuté tieto reagensie (katalógové č. 20050023).

Nasledujúce reagensie sa prepravujú chladené. Reagensie rýchlo uskladnite v prostredí so stanovenou teplotou skladovania, aby ste zabezpečili ich správnu funkčnosť.

Názov reagensie	Množstvo skúmaviek	Farba viečka	Objem plnenia	Aktívne látky
Magnetické guľôčky so streptavidínom (SMB3, Streptavidin Magnetic Beads)	2	Číra	1,2 ml	Magnetické guľôčky so streptavidínom v pufovanom vodnom roztoku s obsahom formamidu, čistiaceho prostriedku a soli.
Pufer na resuspenziu (RSB, Resuspension Buffer)	4	Číra	1,8 ml	Pufovaný vodný roztok.
Hybridizačný pufer na obohatenie (EHB2, Enrichment Hyb Buffer 2)	1	Číra	200 µl	Pufovaný vodný roztok s obsahom čistiaceho prostriedku a soli.
Elučný cieľový pufer 2 (ET2, Elute Target 2)	1	Číra	200 µl	Pufovaný vodný roztok.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, skladovanie pri teplote -25 °C až -15 °C

Nasledujúce reagensie sa prepravujú zmrazené. Reagensie rýchlo uskladnite v prostredí so stanovenou teplotou skladovania, aby ste zabezpečili ich správnu funkčnosť.

Názov reagensie	Množstvo skúmaviek		Farba viečka	Objem plnenia	Aktívne látky
	16 vzoriek (č.20050024)	96 vzoriek (č.20050029)			
Elučný pufer na obohatenie 1 (EE1, Enrichment Elution 1)	1	1	Číra	580 µl	Čistiaci roztok vo vode.
Vylepšený preplachovací pufer na obohatenie (EEW, Enhanced Enrichment Wash)	4	4	Oranžová	4,1 ml	Pufovaný vodný roztok s obsahom solí a čistiaceho prostriedku.
Kokteil PCR primérov (PPC, PCR Primer Cocktail)	1	1	Číra	320 µl	Zmes PCR primérov (oligonukleotidov).
2N NaOH (HP3)	1	1	Číra	200 µl	Roztok 2N hydroxidu sodného (NaOH).

Názov reagensie	Množstvo skúmaviek		Farba viečka	Objem plnenia	Aktívne látky
	16 vzoriek (č.20050024)	96 vzoriek (č.20050029)			
Hybridizačný pufer 2 + IDT NXT blokátory (NHB2, HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers)	2	1	Modrá	480 µl	Pufrovaný vodný roztok s Cot-1 DNA, zahusťujúcou látkou a formamidom.
Vylepšená PCR zmes (EPM, Enhanced PCR Mix)	2	1	Číra	200 µl	DNA polymeráza a dNTP v pufrovanom vodnom roztoku.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, skladovanie pri teplote -25 °C až -15 °C

Nasledujúce reagensie sa prepravujú zmrazené. Reagensie rýchlo uskladnite v prostredí so stanovenou teplotou skladovania, aby ste zabezpečili ich správnu funkčnosť. Sekvencie adaptérov indexov nájdete v časti [Príloha: Illumina UD Indexes Adapter Sequences \(sekvencie adaptérov indexov\)](#) na strane 61.

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

Reagensie, ktoré sa nedodávajú

Vyžadované reagensie, ktoré sa nedodávajú

- Reagensie na extrakciu a purifikáciu DNA
- Reagensie na kvantifikáciu DNA
- Etanol (200-proof pre molekulárnu biológiu)
- Voda bez nukleáz
- 1 M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 – 8,5
- 1N NaOH roztok, stupeň pre molekulárnu biológiu
- Ak používate sekvenovací systém NextSeq 550Dx:
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent v2.5 (300 cyklov) (katalógové č. 20028871)
- Ak používate sekvenovací systém MiSeqDx:
 - MiSeqDx Reagent v3 (katalógové č. 20037124)

- Ak používate sekvenovací systém NovaSeq 6000Dx:
 - Súprava reagensí NovaSeq 6000Dx S2 Reagent (300 cyklov) (katalógové č. 20046931)
 - Súprava reagensí NovaSeq 6000Dx S4 Reagent (300 cyklov) (katalógové č. 20046933)
 - Zásobník s pufrom NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalógové č. 20062292)
 - Zásobník s pufrom NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalógové č. 20062293)
 - Skúmavka na knižnice NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalógové č. 20062290)
 - Skúmavka na knižnice NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 kusov (katalógové č. 20062291)

Požiadavky na panel sond na obohatenie

Reagencie súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sú kompatibilné s oligonukleotidovými panelmi na obohatenie DNA vyrobenými spoločnosťou Illumina alebo tretími stranami. Ak používate biotinylované DNA sondy (nemenné alebo prispôsobené panely), uistite sa, že spĺňajú požadované parametre.

Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx bola optimalizovaná a validovaná pri použití nasledujúcich parametrov panelov tretích strán. Nezaručuje sa porovnateľná výkonnosť, ak sa použijú panely tretích strán, ktoré nespĺňajú požadované parametre.

- Dĺžka sondy 80 bp alebo 120 bp
- Od 500 do 675 000 sond
- Jednovláknová alebo dvojitá DNA
- Celkový vstup sond ≥ 3 pmol na obohatenie s násobnosťou od 1 do 12

Skladovanie a manipulácia

- Izbová teplota je definovaná ako teplota medzi 15 °C a 30 °C.
- Reagencie sú stabilné až do dátumu expirácie na štítku súpravy, pokiaľ sa skladujú pri predpísaných teplotách. Informácie o teplotách skladovania nájdete v časti [Dodávané reagencie na strane 4](#).
- Zmrazené reagencie sú stabilné maximálne počas štyroch cyklov zmrazenia a rozmrazenia pred dátumom expirácie.
- Postup práce so súpravou Illumina DNA Prep with Enrichment Dx obsahuje tieto body bezpečného zastavenia:
 - Po kroku [Amplifikácia tagmentovanej DNA na strane 29](#) sú amplifikované knižnice stabilné do 30 dní, ak sa skladujú pri teplote -25 °C až -15 °C.
 - Po kroku [Prečistenie knižníc na strane 31](#) sú prečistené amplifikované knižnice stabilné do 30 dní, ak sa skladujú pri teplote -25 °C až -15 °C.
 - Po kroku [Združovanie knižníc pred obohatením na strane 33](#) sú združené knižnice stabilné do 30 dní, ak sa skladujú pri teplote -25 °C až -15 °C.

- Po kroku [Amplifikácia obohatenej knižnice na strane 44](#) môže doštička s obohatenými amplifikovanými knižnicami ostať v termálnom cykléri do 24 hodín. Prípadne sa doštička môže skladovať pri teplote od 2 °C do 8 °C do 48 hodín.
- Konečné prečistené obohatené knižnice sú stabilné do 7 dní, ak sa skladujú pri teplote -25 °C až -15 °C.
- Ak je balenie alebo ktorákoľvek súčasť súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx poškodená alebo znehodnotená, kontaktujte zákaznícke služby spoločnosti Illumina.
- Pufer na zastavenie tagmentácie 2 (ST2, Stop Tagment Buffer) môže vytvárať viditeľné precipitáty alebo kryštály. Ak spozorujete precipitáty, zohrejte vzorku na 10 minút na 37 °C a potom vortexujte, kým sa precipitáty nerozpustia.
- Hybridizačné oligonukleotidy (HYB) a vylepšený preplachovací pufer na obohatenie (EEW, Enhanced Enrichment Wash) sa musia predhriať na rovnakú teplotu, ako je udržiavacia teplota pri hybridizácii platná pre daný typ vzorky a panel sond. Viac informácií o práci s NHB2 a EEW nájdete v časti [Poznámky týkajúce sa postupov na strane 16](#).
- Hybridizačný pufer na obohatenie 2 (EHB2, Enrichment Hyb Buffer 2) a hybridizačný pufer + IDT NXT blokátory (NHB2, Hyb Buffer 2 + IDT NXT Blockers) môžu spôsobiť tvorbu kryštálov a zakalenie. Ak spozorujete kryštály a zakalenie, vortexujte alebo pipetujte nahor a nadol, až kým roztok nebude číry. Uistite sa, že ste NHB2 pred pipetovaním predhriali.
- Pri manipulácii s čistiacimi guľôčkami (CB, Cleanup Beads) použite nasledujúce najlepšie postupy:
 - Guľôčky nikdy nezmrazujte.
 - Bezprostredne pred použitím guľôčky vortexujte, kým sa resuspendujú a získajú homogénne sfarbenie.
- Pri manipulácii s malým BLT na obohatenie (eBLTS, Enrichment BLT Small) použite nasledujúce najlepšie postupy:
 - Skúmavku s eBLTS skladujte vo zvislej polohe, aby boli guľôčky stále ponorené v pufri.
 - Dôkladne eBLTS vortexujte, až kým sa guľôčky resuspendujú. Aby sa zabránilo opätovnému usadeniu guľôčok, neodporúča sa odstreďovanie v centrifúge pred pipetovaním.
 - Ak sa guľôčky prilepia na steny alebo vrch 96-jamkovej doštičky, odstreďujte 3 sekundy pri 280 × g a potom napipetujte, aby sa obsah resuspendoval.
- Pri manipulácii s doštičkami s adaptérom indexov použite nasledujúce najlepšie postupy:
 - Nepridávajte vzorky na doštičku s adaptérom indexov.
 - Každá jamka doštičky s indexmi je určená len na jedno použitie.

Požadované, ale nedodávané vybavenie a materiály

Pred spustením protokolu sa uistite, že okrem súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx máte požadované vybavenie a materiály.

Vybavenie

Pred spustením protokolu sa uistite, že máte požadované vybavenie.

Protokol bol optimalizovaný a validovaný pri použití položiek s uvedenými parametrami. Nezaručuje sa porovnateľná výkonnosť, ak sa použijú iné než špecifikované vybavenie.

Niektoré položky sú potrebné len na špecifické pracovné postupy. Podrobnosti o týchto položkách sú uvedené v osobitných tabuľkách.

- Termálny cyklér s týmito parametrami:
 - Nahrievaný príklop
 - Rozsah regulácie teploty minimálne 10 °C až 98 °C
 - Minimálna presnosť teploty $\pm 0,25$ °C
 - Maximálny reakčný objem 100 μ l
 - Kompatibilita s 96-jamkovými PCR doštičkami s obrubou
- Inkubátor na mikrovzorky s týmito parametrami:
 - Rozsah teploty prostredia 5 °C až 99 °C
 - Kompatibilita s 96-jamkovými MIDI doštičkami
- Kompatibilita vložiek inkubátora na mikrovzorky s 96-jamkovými MIDI doštičkami
- Vysokorýchlostný miešač na mikrodoštičky s rozsahom rýchlosti miešania 200 – 3 000 rpm
- Kompatibilita magnetického stojana s 96-jamkovými PCR doštičkami
- Kompatibilita magnetického stojana s 96-jamkovými MIDI doštičkami
- Kompatibilita fluorometra s vašou kvantifikačnou metódou
- Analyzátor fragmentov DNA
- Pipety na presné nanášanie:
 - Jednokanálové a viackanálové pipety, 10 μ l
 - Jednokanálové a viackanálové pipety, 20 μ l
 - Jednokanálové a viackanálové pipety, 200 μ l
 - Jednokanálové pipety, 1 000 μ l
 - Pipety na presné nanášanie zabezpečujú presné nanesenie reagentu a vzorky. Jednokanálové a viackanálové pipety sa môžu použiť, ak sú pravidelne kalibrované a neodchyľujú sa viac než o 5 % od uvedeného objemu.
- Centrifúga na mikrodoštičky
- Mikrocentrifúga
- Jeden z týchto sekvenovacích systémov spoločnosti Illumina:
 - MiSeqDx, katalógové č. DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx, katalógové č. 20005715

- NovaSeq 6000Dx, katalógové č. 20068232
- [Voliteľné] Vákuový koncentrátor
- [FFPE] Real-time PCR detekčný systém

Materiály

Pred spustením protokolu sa uistite, že máte požadovaný materiál.

Niektoré položky sú potrebné len na špecifické pracovné postupy. Podrobnosti o týchto položkách sú uvedené v osobitných tabuľkách.

Protokol bol optimalizovaný a validovaný pri použití uvedených položiek. Nezaručuje sa porovnateľná výkonnosť, ak sa použijú alternatívne materiály.

- Filtrované pipetové špičky
- Kónické centrifugačné skúmavky, 15 ml alebo 50 ml
- Mikrocentrifugačné skúmavky, 1,5 ml
- Multikanálové zásobníky na reagentie bez obsahu RNáz/DNáz, na jedno použitie
- Strip 8 skúmaviek s viečkami bez obsahu RNáz/DNáz
- Sérologické pipety
- 96-jamková polypropylénová skladovacia doštička s hlbokými jamkami (MIDI doštička), 0,8 ml
- 96-jamkové tvrdé PCR doštičky s obrubou
- [FFPE] qPCR doštičky kompatibilné s prístrojom na qPCR
- Adhezívne plomby pre 96-jamkové doštičky s nasledujúcimi špecifikáciami:
 - Opticky číry polyester so zlupovacím filmom
 - Vhodný pre PCR doštičky s obrubou
 - Vysoko adhezívne, odolné voči viacnásobným zmenám teploty od -40 °C do 110 °C
 - Bez obsahu DNáz/RNáz
- Plastový spotrebný materiál kompatibilný s vybranou kvantifikačnou metódou
- Súprava na fluorometrickú kvantifikáciu dsDNA kompatibilná s vybraným kvantifikačným systémom:
 - Na kvantifikáciu amplifikovaných knižníc pred obohatením sa môže použiť širokospektrálna kvantifikačná súprava.
 - Pri kvantifikácii obohatených knižníc závisí rozsah kvantifikačnej súpravy od použitého panela sond.
- Súprava na analýzu fragmentov na kvalifikáciu knižníc s vybraným kvalifikačným systémom:
 - Na kvalifikáciu amplifikovaných knižníc pred obohatením sa môže použiť širokospektrálna súprava.
 - Pri kvalifikácii obohatených knižníc závisí rozsah kvalifikačnej súpravy od použitého panela sond.
- [Voliteľné] Súprava na extrakciu DNA z ľudských buniek a tkaniva. Môžete použiť ktorúkoľvek validovanú extrakčnú metódu.

Odber, preprava a skladovanie vzoriek



UPOZORNENIE

So všetkými vzorkami zaobchádzajte ako s potenciálne infekčným materiálom.

- Táto analýza je kompatibilná s genómovou DNA získanou z ľudských buniek a tkaniva.
- Pri komerčne dostupnej purifikovanej gDNA sa uistite, že vzorky sa prepravovali v správnych podmienkach a skladovali sa podľa pokynov výrobcu. Pri skladovaní a vykonávaní cyklov zmrazenia a rozmrazenia gDNA sa riadte najlepšimi postupmi.
- Pri vstupnej vzorke z plnej krvi sa riadte požiadavkami na odber krvi, prepravu a skladovanie, ktoré sú platné pre vybranú metódu extrakcie DNA. Môže sa použiť ktorákoľvek validovaná extrakčná metóda. Preprava plnej krvi sa musí vykonávať v súlade s národnými, federálnymi, štátnymi a miestnymi predpismi týkajúcimi sa prepravy etiologických agens.
- Na extrakciu DNA z tkaniva FFPE sa môže použiť ktorákoľvek validovaná extrakčná metóda. Riadte sa pokynmi a odporúčaniami platnými pre vybranú extrakčnú metódu, na základe ktorých sa určia nasledujúce postupy:
 - Metóda fixovania formalínom a zaliatia do parafínu pre tkanivo, aby sa zabezpečila najlepšia kvalita extrahovanej DNA.
 - Skladovanie vzoriek FFPE.
 - Požiadavky na počiatkový materiál, ako je počet a hrúbka sekcií FFPE. Väčšina purifikačných metód odporúča použiť čerstvo odobraté časti.

Varovania a preventívne opatrenia

- Reagencie súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx obsahujú potenciálne nebezpečné chemikálie. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami. Noste ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho pláštá, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagentami manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, národnými a miestnymi zákonmi a predpismi. Ďalšie informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete na kartách bezpečnostných údajov (SDS) na stránke support.illumina.com/sds.html.
- So všetkými krvnými vzorkami zaobchádzajte ako s infekčným materiálom obsahujúcim vírus ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV), vírus ľudskej hepatitídy B (HBV) a iné krvou prenášané patogény (univerzálne preventívne opatrenia).
- Použite bežné laboratórne bezpečnostné opatrenia. Pipetovanie nevykonávajte ústami. Nejedzte, nepite ani nefajčite v oblastiach určených na prácu. Pri manipulácii so vzorkami a reagentami zo súpravy používajte jednorazové rukavice a laboratórny plášť. Po manipulácii so vzorkami a reagentami zo súpravy si dôkladne umyte ruky.

- Aby ste zabránili znehodnoteniu vzorky alebo reagentie, pred začatím protokolu sa uistite, že všetky výpary chlórnanu sodného po čistení sa rozptýlili.
- Kontaminácia vzoriek inými PCR produktmi/amplikónmi môže spôsobiť nepresné a nespoľahlivé výsledky. Aby ste zabránili kontaminácii, riadte sa týmito najlepšimi postupmi:
 - Používajte správne laboratórne postupy a laboratórnu hygienu.
 - Pracovné kroky vykonávajte v priestoroch určených na pred-amplifikačné a post-amplifikačné postupy.
 - Použité reagentie skladujte pred prečistením knižníc v priestore určenom na pred-amplifikačné postupy.
 - Oddel'te pred-amplifikačné reagentie od post-amplifikačných.
 - Ubezpečte sa, že pred-amplifikačné a post-amplifikačné priestory majú špecializované vybavenie, ako sú pipety, špičky pipiet, vírivý mixér a centrifúga.
- Zabráňte krížovej kontaminácii. Pre každú ďalšiu vzorku a pri rozdeľovaní reagentií použite vždy novú pipetovú špičku. Používanie filtrovaných špičiek znižuje riziko prenesenia amplikónu a krížovej kontaminácie vzoriek medzi sebou.
 - Keď pridávate alebo prenášate vzorky alebo hlavné zmesi reagentií, vymeňte špičky medzi každou vzorkou.
 - Keď pridávate adaptéry indexov viacnásobnou pipetou, vymeňte špičky medzi každým riadkom alebo každým stĺpcom. Ak sa používa jednonásobná pipeta, vymeňte špičky medzi každou vzorkou.
 - Odstráňte nepoužité doštičky s adaptérmi indexov z pracovnej oblasti.
- Použite nasledujúce najlepšie postupy pre kroky preplachovania etanolom:
 - Vždy pripravte čerstvý 80 % etanol. Etanol môže absorbovať vodu zo vzduchu, čo môže ovplyvniť výsledky.
 - Uistite sa, že počas preplachovacích krokov sa zo dna jamôk odstráni všetok etanol. Zvyškový etanol môže ovplyvniť výsledky.
 - Riadte sa špecifikovaným časom sušenia pre kroky súvisiace s magnetickým stojanom, aby ste zabezpečili, že sa látka celkom vyparila. Zvyškový etanol môže ovplyvniť výkonnosť následných reakcií.
- Hlavné zmesi pripravujte vždy bezprostredne pred použitím a zmiešané pracovné roztoky nikdy neskladujte.
- Výkonnosť súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nie je zaručená, keď sa nedodržia postupy uvedené v príbalovom letáku.
- Nepoužívajte žiadne súčasti súpravy po uplynutí dátumu expirácie uvedeného na označení súpravy.
- Nevymieňajte súčasti súpravy za súčasti z iných súprav Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Súpravy sú identifikované na štítku súpravy.

Poznámky týkajúce sa postupov

Odporúčania týkajúce sa vstupného množstva DNA

Protokol pre súpravu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilný s vysokokvalitnou dvojláknovou genómovou DNA (gDNA) vo vstupnom množstve 50 – 1 000 ng.

Uistite sa, že vzorka gDNA neobsahuje > 1 mM EDTA ani žiadne organické znečisťujúce látky ako fenol a etanol. Tieto látky môžu interferovať s reakciou pri tagmentácii a viesť k zlyhaniu analýzy.

Vstupné množstvo gDNA \geq 50 ng

Kvantifikácia a normalizácia počiatočnej vzorky gDNA sa pri vstupnom množstve gDNA od 50 do 1 000 ng nevyžaduje.

Vstupné množstvo gDNA < 50 ng

Môže sa použiť vstupné množstvo DNA 10 – 50 ng, pričom je potrebné vykonať tieto úpravy:

- Ak sa vloží 10 – 49 ng gDNA, odporúča sa kvantifikovať počiatočnú vzorku gDNA, aby sa stanovil počet cyklov PCR potrebných po tagmentácii. Na kvantifikáciu dvojláknovej vstupnej gDNA použite fluorometrickú metódu. Nepoužívajte metódy, ktoré merajú celkovú nukleovú kyselinu, ako sú NanoDrop alebo iné UV absorpčné metódy.
- Tento protokol nenormalizuje konečné výťažky knižnice pred obohatením z 10 – 49 ng gDNA, a preto sa vyžaduje kvantifikácia a normalizácia knižníc pred aj po obohatení.
- Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx bola charakterizovaná a verifikovaná pre vstupné množstvo DNA 50 – 1 000 ng. Nemožno zaručiť rovnakú výkonnosť produktu pri vstupnom množstve gDNA < 50 ng.

Odporúčania týkajúce sa vkladania krvi

Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilná s gDNA extrahovanou z periférnej plnej krvi. Môže sa použiť ktorákoľvek validovaná extrakčná metóda. Keď sa extrahuje gDNA z plnej krvi, nevyžaduje sa úvodná kvantifikácia vlozenej DNA a súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vytvára normalizované výťažky knižnice pred obohatením.

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

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

Odporúčania týkajúce sa vstupnej vzorky tkaniva FFPE

Na určenie vhodnej vstupnej vzorky na úspešnú prípravu knižnice použite nasledujúce kritériá kvality pre DNA z tkaniva FFPE:

- Pre vzorky FFPE s hodnotou $\Delta Cq \leq 5$ je odporúčané vstupné množstvo DNA 50 – 1 000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sa neodporúča pri vzorkách FFPE slabej kvality s $\Delta Cq > 5$. Použitie vzoriek s $\Delta Cq > 5$ je možné, ale môže zvýšiť pravdepodobnosť zlyhania prípravy knižnice alebo znížiť výkon testu.

Extrakcia z tkaniva FFPE

Použite metódu izolácie nukleovej kyseliny, ktorá vytvára vysoko obnoviteľné výťažky, minimalizuje spotrebu vzorky a zachováva jej celistvosť. Môžete použiť ktorúkoľvek validovanú metódu na extrakciu DNA zo vzoriek FFPE. Keď sa extrahuje gDNA z tkaniva FFPE, vyžaduje sa úvodná kvantifikácia vstupnej DNA a súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx nevytvára výťažky normalizovanej knižnice pred obohatením.

Kvalifikácia DNA z tkaniva FFPE

Vzorka gDNA extrahovaná z FFPE tkaniva by sa mala pred použitím kvalifikovať. Aby ste dosiahli optimálnu výkonnosť, posúďte kvalitu vzorky DNA použitím validovanej metódy extrakcie na kvalifikáciu DNA extrahovanej zo vzoriek FFPE. Protokol súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je kompatibilný so vzorkami DNA z tkaniva FFPE s hodnotou $\Delta Cq \leq 5$. Súprava Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sa neodporúča pri vzorkách FFPE slabej kvality s $\Delta Cq > 5$. Použitie vzoriek s $\Delta Cq > 5$ je možné, ale môže zvýšiť pravdepodobnosť zlyhania prípravy knižnice alebo znížiť výkon testu.

[Voliteľné] Referenčné vzorky FFPE

Pri vykonávaní protokolu použite charakterizované referenčné materiály, napríklad Horizon HD799 (DNA) ako pozitívnu kontrolu. Kvalifikované materiály FFPE zo xenograftov získaných z bunkovej línie sa takisto môžu použiť ako referenčné vzorky. Na kvantifikáciu referenčného materiálu pred začatím postupu použite fluorometrickú metódu.

POZNÁMKA Spracovanie referenčnej vzorky ako pozitívnej kontroly alebo kontroly bez šablóny spotrebúva reagentie a znižuje celkový počet neznámych vzoriek, ktoré možno spracovať.

Odporúčania týkajúce sa vstupnej vzorky

Odporúčania týkajúce sa vstupnej vzorky pre súpravu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 1 Odporúčania týkajúce sa vstupnej vzorky

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

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

Špičky a techniky

Zabránenie krížovej kontaminácii

- Keď pridávate alebo prenášate vzorky, vymeňte špičky medzi *každou vzorkou*.
- Keď pridávate adaptéry indexov viackanálovou pipetou, vymeňte špičky medzi *každým riadkom* alebo *každým stĺpcom*. Ak sa používa jednokanálová pipeta, vymeňte špičky medzi každou vzorkou.

Zaplombovanie doštičky

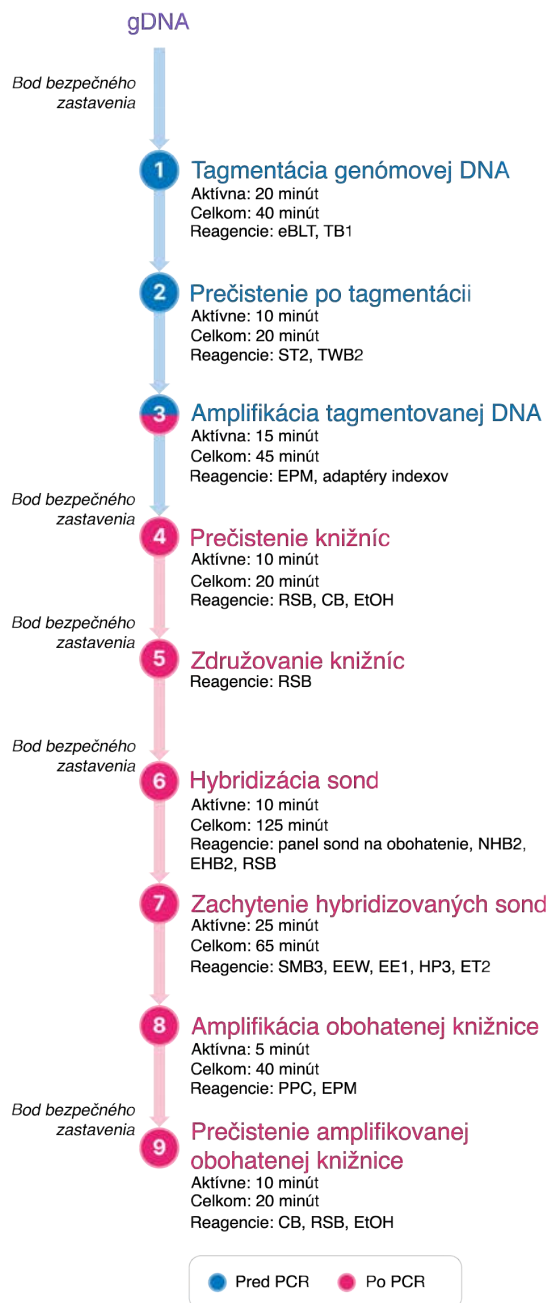
- Doštičku s 96 jamkami vždy zaplombujte novou adhezívnou plombou použitím gumového valčeka, aby bola doštička zakrytá pred vykonaním nasledujúcich krokov protokolu:
 - Pretrepávanie
 - Inkubácia. Nesprávne zaplombovanie doštičky môže viesť k vyparovaniu počas inkubácie.
 - Odstredenie v centrifúge
 - Hybridizácia
- Uistite sa, že okraje a jamky sú celkom zaplombované, aby sa znížilo riziko krížovej kontaminácie a vyparovania.
 - Ak spozorujete tekutinu alebo kondenzáciu na plombe alebo po stranách jamôk doštičky, podľa potreby ju odstredte v centrifúge pred otvorením plomby.
- Predtým ako pomaly odstránite plombu, položte doštičku na rovný povrch.

Manipulácia s malým BLT panelom na obohatenie (eBLTS, Enrichment BLT Small)

- Skúmavku so zásobou eBLTS skladujte v chladničke a vo zvislej polohe, aby boli guľôčky stále ponorené v pufri.
- Tesne pred použitím skúmavku so zásobou eBLTS dôkladne vortexujte, až kým sa guľôčky celkom resuspendujú. Aby sa zabránilo opätovnému usadeniu guľôčok, neodporúča sa odstreďovanie v centrifúge pred pipetovaním.
- Ak sa guľôčky prilepia na steny alebo vrch 96-jamkovej doštičky, odstreďujte 3 sekundy pri 280 × g a potom napipetujte, aby sa obsah resuspendoval.
- Pri preplachovaní eBLTS:
 - Použite vhodný magnetický stojan pre doštičku.
 - Nechajte doštičku na magnetickom stojane tak dlho, ako je uvedené v pokynoch.
 - Ak dôjde k aspirácii guľôčok do špičky pipety, vráťte ich na doštičku na magnetickom stojane a počkajte, kým tekutina nie je číra (2 minúty).

Pracovný postup pri použití súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Nasledujúci graf zobrazuje pracovný postup pri použití súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Medzi jednotlivými krokmi sú vyznačené body bezpečného zastavenia. Odhad časov je založený na spracovaní 12 vzoriek v 12-násobnom obohatení.



Návod na použitie

V tejto kapitole je opísaný protokol pre súpravu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

- Prečítajte si celý plánovaný pracovný postup sekvenovania od prípravy vzorky až po analýzu, aby ste zabezpečili, že parametre výrobkov a experimentov budú kompatibilné.
- Pred pokračovaním sa uistite, že súprava je kompletná a že máte všetky potrebné súčasti, vybavenie a materiál.
 - Biotinylované sondy tretích strán musia spĺňať osobitné parametre. Prečítajte si [Požiadavky na panel sond na obohatenie na strane 10](#), aby ste sa ubezpečili, že ich vaše sondy tretej strany spĺňajú.
- Dodržiavajte protokol v uvedenom poradí a použite pri tom určené objemy a parametre inkubácie.
- Ak nie je v protokole špecifikovaný bod bezpečného zastavenia, ihneď prejdite na ďalší krok.
- Keď vytvárate hlavnú zmes, nadbytočný objem je zahrnutý do uvedených objemov.
- Uistite sa, že používate vhodný magnetický stojan pre váš typ doštičky.

Príprava na združovanie

Tento krok je potrebný na zaistenie úspešného sekvenovania obohatených knižníc. Združovanie knižníc sa môže vykonať pred obohatením a sekvenovaním.

Pred obohatením – jednotlivé amplifikované knižnice s indexmi sa združia na obohatenie pomocou vybraného panelu sond. Tým sa vytvorí mnohonásobný súbor obohatených knižníc. Postup vkladania vzorky tkaniva FFPE bol testovaný a odporúča sa len pre 1-násobné reakcie obohatenia. Pri vysokokvalitnej gDNA sa testovali 12-násobné reakcie, ale možné sú aj 2-násobné až 11-násobné.

Pred sekvenovaním – 1-násobné obohatené knižnice a/alebo mnohonásobné obohatené knižnice sa združujú pred sekvenovaním. Počet obohatených knižníc, ktoré možno sekvenovať, závisí od cieľovej hĺbky čítania každej vzorky na vašom sekvenovacom systéme.

Jedinečné duálne indexovanie

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

- Duálne indexované knižnice pridávajú sekvencie Index 1 (i7) a Index 2 (i5) a vytvárajú tak unikátne označené knižnice.
- UD indexy majú rozličné, nesúvisiace indexové sekvencie pre čítanie indexov i7 a i5. Indexy majú dĺžku 10 báz.

Výber adaptérov indexov s rôznymi sekvenciami pre združené knižnice optimalizuje rovnováhu farieb na úspešné sekvenovanie a analýzu údajov. Súčasťou súborov, ktoré sú ≥ 10 -násobné, je rovnováha farieb, takže môžete použiť ktorúkoľvek kombináciu adaptérov indexov. Počas vášho sekvenovacieho chodu poskytuje modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager možnosti indexových kombinácií s vyváženými farbami a oznámi vám, ak vybrané indexové kombinácie nie sú dostatočne rôznorodé.

Informácie o sekvenciách adaptérov UD indexov spoločnosti Illumina a o rozložení doštičiek nájdete v časti [Príloha: Illumina UD Indexes Adapter Sequences \(sekvencie adaptérov indexov\)](#) na strane 61.

Podporovaná násobnosť obohatenia

Reagencie súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sú konfigurované a testované v 1-násobnom a 12-násobnom obohatení. Hoci sú možné aj iné násobnosti obohatenia, niektoré si vyžadujú dodatočnú prípravu knižnice pred obohatením a dodatočné reagencie panela sond na obohatenie.

Na dosiahnutie vhodného výťažku obohatenia pri neštandardnej násobnosti môže byť potrebná dodatočná optimalizácia. Nie sú zaručené optimálne výsledky.

- **Násobnosť obohatenia** – počet knižníc pred obohatením (1–12) združených v jednej reakcii obohatenia na hybridizáciu pomocou panelov sond na obohatenie. Napríklad, kombinácia 12 knižníc pred obohatením vytvorí 12-násobne obohatený súbor.
- **Reakcia obohatenia** – počet jedinečných príprav reakcie obohatenia bez ohľadu na počet knižníc pred obohatením združených na jednu reakciu. V jednej reakcii obohatenia možno pripraviť napríklad 1-násobne alebo 12-násobne obohatený súbor.

Na vypočítanie celkového počtu následne obohatených knižníc vynásobte násobnosť obohatenia v jednej reakcii počtom reakcií obohatenia. Napríklad, v jednej reakcii obohatenia 12-násobného obohateného súboru sa vytvorí súbor 12 následne obohatených knižníc.

Reagencie súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx podporujú pri združovaní knižníc pred obohatením nasledujúce reakcie obohatenia a násobnosť.

Reagencie súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx	Reakcie obohatenia	Násobnosť obohatenia
Súprava so 16 vzorkami	16 reakcií	1-násobné
Súprava so 96 vzorkami	8 reakcií	12-násobné

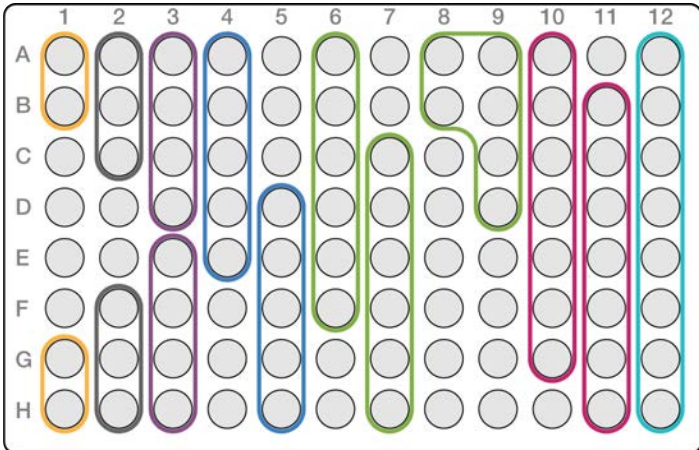
Stratégie združovania od dvojnásobných po osemnásobné

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené adaptéry indexov (jamky), ktoré sa môžu kombinovať v 2 – 8-násobnom súbore, pričom každú kombináciu ilustruje obrázok určitej farby.

Združte všetky prípady s násobnosťou ≥ 2 zhora alebo zdola stĺpca. Nezdružujte podľa riadkov.

Násobnosť knižníc v reakcii	Kombinácie	Farba na obrázku
2	Prvé dve alebo posledné dve jamky v stĺpci: <ul style="list-style-type: none"> • A a B • G a H Riadky C – F sa nepoužívajú.	Oranžová

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

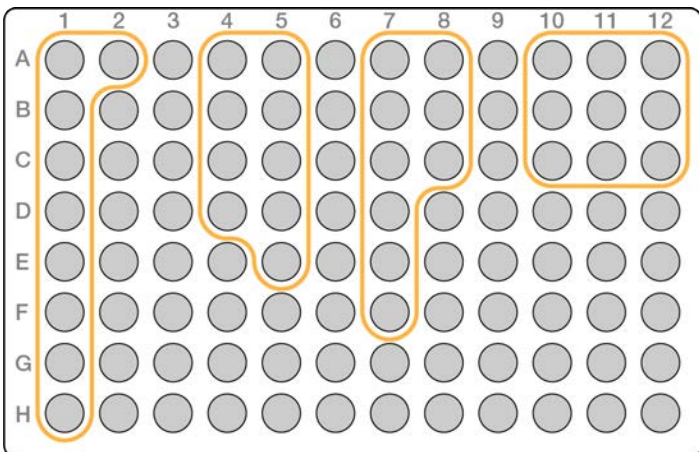


Stratégie deväťnásobného združovania

Použite adaptéry indexov z ktorýchkoľvek jamôk, ktoré optimalizujú farebnú rovnováhu v sekvenovacom chode, napríklad:

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

Nasledujúci obrázok znázorňuje všetky štyri príklady.



Tagmentácia genómovej DNA

V tomto kroku sa používa malý BLT panel na obohatenie (eBLTS) na tagmentáciu DNA, čo je proces, ktorý fragmentuje a označuje DNA adaptérovými sekvenciami.

Spotrebný materiál

- eBLTS (BLT na obohatenie, malý) (žlté viečko)
- TB1 (Tagmentačný pufer 1)
- Voda bez nukleáz
- 96-jamková PCR doštička
- Adhezívna plomba
- Mikrocentrifugačné skúmavky, 1,7 ml
- Strip s 8 skúmavkami
- Pipetové špičky
 - Viackanálové pipety, 200 µl



UPOZORNENIE

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

Informácie o reagensiach

- eBLTS sa musí uchovávať pri teplote od 2 °C do 8 °C. Nepoužívajte eBLTS, ktorý sa skladoval pri teplote nižšej ako 2 °C.
- eBLTS neodstred'ujte v centrifúge.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
eBLTS (žlté viečko)	2 °C až 8 °C	Nechajte zohriať na izbovú teplotu. Tesne pred použitím vortexujte, aby sa obsah premiešal. Pred pipetovaním neodstred'ujte v centrifúge.
TB1	-25 °C až -15 °C	Nechajte zohriať na izbovú teplotu. Vortexujte, aby sa obsah premiešal.

2. Vortexujte alebo pipetujte DNA a potom krátko odstred'ite v centrifúge.

3. Na termálnom cykléri si uložte tento TAG program:
 - Vyberte možnosť predhriatia príklopu a nastavte teplotu na 100 °C.
 - Nastavte reakčný objem na 50 µl.
 - 55 °C na 5 minút
 - Udržujte na 10 °C

Postup

1. Pridajte 2 – 30 µl DNA do každej jamky 96-jamkovej PCR doštičky, takže celkové vstupné množstvo bude 50 – 1 000 ng.
Ak je objem DNA < 30 µl, pridajte vodu bez nukleáz k vzorkám DNA, aby ste dosiahli celkový objem 30 µl.
2. Dôkladne eBLTS vortexujte, až kým sa guľôčky celkom resuspendujú.
3. Zmiešajte nasledujúce objemy v skúmavke a pripravte hlavnú zmes na tagmentáciu. Vynásobte všetky objemy počtom vzoriek, ktoré sa spracúvajú.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Nadbytočné množstvo reagensí je zahrnuté do objemu.
4. Hlavnú zmes na tagmentáciu dôkladne napipetujte, aby sa obsah premiešal.
5. Objem hlavnej zmesi na tagmentáciu rovnomerne rozdeľte do stripu s 8 skúmavkami.
6. Pomocou 200 µl viackanálovej pipety preneste 20 µl hlavnej zmesi na tagmentáciu do každej jamky PCR doštičky, ktorá obsahuje vzorku. Použite nové špičky na každý stĺpec alebo riadok so vzorkami.
7. Po rozdelení hlavnej zmesi na tagmentáciu strip s 8 skúmavkami zlikvidujte.
8. Pomocou 200 µl viackanálovej pipety nastavenej na 40 µl napipetujte každú vzorku 10-krát, aby sa obsah premiešal. Použite nové špičky na každý stĺpec so vzorkami.
Prípadne PCR doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať v trepačke 1 minútu pri 1 600 rpm.
9. Doštičku zaplombujte, umiestnite do predprogramovaného termálneho cykléra a spustite TAG program.
10. Počkajte, kým tagmentačný program dosiahne stabilnú teplotu 10 °C, a potom doštičku hneď odstráňte.
11. Nechajte 96-jamkovú PCR doštičku 2 minúty pri izbovej teplote a potom prejdite na ďalší krok.

Prečistenie po tagmentácii

V tomto kroku sa prepláchne adaptérom označená DNA na eBLTS pred PCR amplifikáciou.

Spotrebný materiál

- ST2 (Pufer na zastavenie tagmentácie 2)
- TWB2 (Preplachovací pufer na tagmentáciu 2)
- Magnetický stojan na PCR doštičku s 96 jamkami

- Adhezívna plomba
- Strip s 8 skúmavkami
- Pipetové špičky
 - Viackanálové pipety, 20 µl
 - Viackanálové pipety, 200 µl
- Pripravte si na pokračovanie postupu:
 - EPM (Vylepšená PCR zmes)
 - Doštička s adaptéromi indexov

Informácie o reagensiach

- Uistite sa, že používate vhodný magnetický stojan pre vašu doštičku. Použitie magnetického stojana určeného pre MIDI doštičku na PCR doštičku môže spôsobiť, že sa TWB2 nenaviaže na guľôčky.
- Pipetujte TWB2 pomaly, aby ste minimalizovali tvorbu peny, a zabránili aspirácii nesprávneho objemu a neúplnému zmiešaniu.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
EPM	-25 °C až -15° C	Rozmrazujte 1 hodinu na ľade. Prevráťte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstred'ujte v centrifúge.
ST2	15 °C až 30 °C	Ak spozorujete precipitáty, zohrejte vzorku na 37 °C počas 10 minút a potom vortexujte, kým sa precipitáty nerozpustia. Používajte pri izbovej teplote.
TWB2	15 °C až 30 °C	Používajte pri izbovej teplote.
Doštička s adaptéromi indexov	-25 °C až -15° C	Rozmrazujte 30 minút pri izbovej teplote.

Postup

1. Pridajte 10 µl ST2 do každej tagmentačnej reakcie. Ak používate viackanálovú pipetu, napipetujte ST2 do stripu s 8 skúmavkami, a potom preneste správne objemy na PCR doštičku. Použite nové špičky na každý stĺpec alebo riadok so vzorkami.
2. Pomocou 200 µl pipety nastavenej na 50 µl pomaly napipetujte každú jamku 10-krát, aby sa guľôčky resuspendovali.
Prípadne doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 600 rpm. Opakujte podľa potreby.

3. Zaplombujte doštičku a odstred'ujte ju 10 sekúnd v centrifúge pri 280 × g.
4. Inkubujte 5 minút pri izbovej teplote.
5. Umiestnite doštičku na magnetický stojan na PCR doštičky a čakajte, kým nebude tekutina číra (3 minúty).
6. [≤ 48 vzoriek] Prepláchnite trikrát, ako je uvedené ďalej.
 - a. Pomocou 200 µl viackanálovej pipety nastavenej na 60 µl odstráňte a zlikvidujte supernatant. Dbajte na to, aby ste pritom nepoškodili obal guľôčok.
 - b. Vyberte doštičku z magnetického stojana.
 - c. Hneď potom pomaly pridajte 100 µl TWB2 priamo na guľôčky.
 - d. Pipetujte pomaly, až kým sa guľôčky celkom resuspendujú. Prípadne doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 600 rpm.
 - e. Ak dôjde k rozstrekovaniu, odstred'ujte 10 sekúnd pri 280 x g.
 - f. Umiestnite doštičku na magnetický stojan na PCR doštičky a čakajte, kým nebude tekutina číra (3 minúty).

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

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

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

Amplifikácia tagmentovanej DNA

Týmto krokom sa amplifikuje tagmentovaná DNA použitím PCR programu s limitovanými cyklami. V PCR kroku sa pridajú adaptéry indexov 1 (i7), adaptéry indexov 2 (i5) a sekvencie potrebné na vygenerovanie sekvenčného klastra.

Spotrebný materiál

- EPM (Vylepšená PCR zmes)
- Doštička s adaptérmi indexov
- 96-jamková PCR doštička
- Voda bez nukleáz
- Adhezívna plomba
- Mikrocentrifugačné skúmavky, 1,5 ml
- Pipetové špičky
 - Viackanálové pipety, 20 µl
 - Viackanálové pipety, 200 µl

Informácie o reagensiach

- Doštičky s adaptérmi indexov
 - Jamka môže obsahovať > 10 µl adaptérov indexov.
 - Nepridávajte vzorky na doštičku s adaptérmi indexov.
 - Každá jamka doštičky s indexmi je určená len na jedno použitie.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
EPM	-25 °C až -15° C	Rozmrazujte 1 hodinu pri teplote 4 °C alebo na ľade. Prevráťte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstred'ujte v centrifúge.
Doštička s adaptérmi indexov	-25 °C až -15° C	Rozmrazujte 30 minút pri izbovej teplote.

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

- Vyberte možnosť predhriatia príklopu a nastavte teplotu na 100 °C.
- Nastavte reakčný objem na 50 µl
- 72 °C na 3 minúty
- 98 °C na 3 minúty
- X cyklov z:
 - 98 °C na 20 sekúnd
 - 60 °C na 30 sekúnd
 - 72 °C na 1 minútu
- 72 °C na 3 minúty
- Udržujte na 10 °C

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

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

Postup

1. Zmiešajte nasledujúce látky a pripravte hlavnú PCR zmes. Vynásobte všetky objemy počtom vzoriek, ktoré sa spracúvajú.
 - EPM (23 µl)
 - Voda bez nukleáz (23 µl)
 Nadbytočné množstvo reagensí je zahrnuté do objemu.
2. Napipetujte hlavnú PCR zmes 10-krát, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstredíte v centrifúge.
3. Viackanálovou pipetou s objemom 200 µl odstráňte TWB2 a zlikvidujte ho, pričom doštička musí byť umiestnená na magnetickom stojane.
Pena, ktorá ostane na stenách jamky, nemá nežiaduci vplyv na knižnicu.
4. Vyberte doštičku z magnetického stojana.
5. Ihneď pridajte 40 µl hlavnej PCR zmesi priamo na guľôčky v každej jamke.
6. Ihneď napipetujte, aby ste látku zmiešali, až kým sa guľôčky celkom resuspendujú. Prípadne doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 600 rpm.

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

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušíte, skladujte pri teplote -25 °C až -15 °C maximálne 30 dní.

Prečistenie knižníc

V tomto kroku sa používa dvojstranný proces purifikácie na guľôčkach (beads) na purifikáciu amplifikovaných knižníc.

Spotrebný materiál

- CB (Čistiace guľôčky)
- RSB (Pufer na resuspenziu)
- Čerstvo pripravený 80 % etanol (EtOH)
- 96-jamková 0,8 ml polypropylénová skladovacia doštička s hlbokými jamkami (MIDI doštička)
- 96-jamková PCR doštička
- Magnetický stojan na MIDI doštičku
- Magnetický stojan na PCR doštičku
- Mikrocentrifugačné skúmavky, 1,5 ml
- Voda bez nukleáz

Informácie o reagensiach

- Čistiace guľôčky
 - Pred každým použitím vortexujte.
 - Vortexujte často, aby boli guľôčky rozložené rovnomerne.
 - Z dôvodu viskozity roztoku vykonávajte aspiráciu a rozdeľovanie pomaly.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
CB	Izbová teplota	Vortexujte a prevráťte, aby sa obsah premiešal, až kým nie je farba tekutiny homogénna.
RSB	2 °C až 8 °C	Rozmrazujte 30 minút pri izbovej teplote. Vortexujte, aby sa obsah premiešal.

Postup

1. Nechajte 96-jamkovú PCR doštičku pretrepať 1 minútu pri 1 800 rpm a potom krátko odstred'ujte v centrifúge.
2. Umiestnite doštičku na magnetický stojan na PCR doštičky a čakajte, kým nie je tekutina číra (1 minútu).
3. Vortexujte CB 3-krát po 10 sekúnd a potom viackrát prevráťte, aby sa obsah resuspendoval.
4. Pri vysokokvalitnej gDNA postupujte podľa nasledujúcich pokynov.
 - a. Pridajte 77 µl vody bez nukleáz do každej jamky novej MIDI doštičky.
 - b. Pridajte 88 µl CB do každej jamky MIDI doštičky.
 - c. Preneste 45 µl supernatantu z každej jamky PCR doštičky do príslušnej jamky MIDI doštičky.
 - d. Zlikvidujte PCR doštičku.
 - e. Napipetujte každú jamku 10-krát, aby sa obsah premiešal. Prípadne doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 800 rpm.
 - f. Doštičku zaplombujte a inkubujte 5 minút pri izbovej teplote.
 - g. Skontrolujte, či vzorka neobsahuje vzduchové bubliny. Ak spozorujete vzduchové bubliny, vzorku odstred'ite.
 - h. Umiestnite doštičku na magnetický stojan na MIDI doštičky a čakajte, kým nie je tekutina číra (5 minút).
 - i. Počas inkubácie dôkladne vortexujte CB a potom pridajte 20 µl do každej jamky novej MIDI doštičky.
 - j. Preneste 200 µl supernatantu z každej jamky prvej MIDI doštičky do príslušnej jamky novej MIDI doštičky (obsahujúcej 20 µl CB).
 - k. Zlikvidujte prvú MIDI doštičku.
 - l. Napipetujte každú jamku novej MIDI doštičky 10-krát, aby sa obsah premiešal. Prípadne doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 800 rpm.
5. Pri extrahovanom FFPE postupujte podľa nasledujúcich inštrukcií.
 - a. Pridajte 81 µl CB do každej jamky novej MIDI doštičky.
 - b. Preneste 45 µl supernatantu z každej jamky PCR doštičky do príslušnej jamky MIDI doštičky.
 - c. Zlikvidujte PCR doštičku.

- d. Napipetujte každú jamku 10-krát, aby sa obsah premiešal. Prípadne doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 800 rpm.
6. Inkubujte 5 minút pri izbovej teplote.
7. Skontrolujte, či vzorka neobsahuje vzduchové bubliny. Ak spozorujete vzduchové bubliny, vzorku odstredíte.
8. Umiestnite doštičku na magnetický stojan na MIDI doštičky a čakajte, kým nie je tekutina číra (5 minút).
9. Odstráňte a zlikvidujte supernatant, pričom dávajte pozor, aby ste nepoškodili guľôčky.
10. Guľôčky prepláchnite podľa nasledujúceho postupu.
 - a. Ponechajte doštičku na magnetickom stojane a pridajte 200 µl čerstvého 80 % EtOH bez miešania.
 - b. Inkubujte 30 sekúnd.
 - c. Odstráňte a zlikvidujte supernatant, pričom dávajte pozor, aby ste nepoškodili guľôčky.
11. Guľôčky **druhý raz** prepláchnite.
12. Sušte 5 minút vzduchom na magnetickom stojane.
13. Počas sušenia vzduchom použite 20 µl pipetu na odstránenie a zlikvidovanie zvyškového EtOH.
14. Vyberte doštičku z magnetického stojana.
15. Pridajte 17 µl RSB ku guľôckam.
16. Doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 2 minúty pri 1 800 rpm.
17. Inkubujte 2 minúty pri izbovej teplote.
18. Skontrolujte, či vzorka neobsahuje vzduchové bubliny. Ak spozorujete vzduchové bubliny, vzorku odstredíte.
19. Umiestnite doštičku na magnetický stojan na MIDI doštičky a čakajte, kým nie je tekutina číra (2 minúty).
20. Preneste 15 µl supernatantu do novej 96-jamkovej PCR doštičky.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušíte, doštičku zapečatíte a skladujete ju pri teplote -25 °C až -15 °C maximálne 30 dní.

Združovanie knižníc pred obohatením

V tomto kroku sa spájajú knižnice DNA s unikátnymi indexmi do jedného súboru obsahujúceho až 12 knižníc.

Metódy združovania

Združovať možno na základe objemu alebo hmotnosti. Použite nasledujúcu tabuľku na určenie vhodnej metódy pre svoj vstup.

Tabuľka 2 Odporúčané metódy združovania

Vstupná vzorka	Metóda združovania
10 – 49 ng gDNA	Hmotnosť

Vstupná vzorka	Metóda združovania
50 – 1 000 ng gDNA	Objem
gDNA extrahovaná z FFPE	Hmotnosť
gDNA extrahovaná z krvi	Objem

- Jednonásobné obohatenie nevyžaduje združovanie knižníc pred obohatením. Môže však byť potrebné pridať RSB.
- Po kvantifikácii knižnice pred obohatením môžu byť všetky typy vstupných vzoriek združené podľa hmotnosti, aby sa dosiahla optimálna rovnováha indexov.
- Konečný výťažok knižníc pred obohatením v osobitných experimentálnych preparátoch sa môže líšiť. Preto sa na dosiahnutie optimálnej rovnováhy indexov odporúča združovanie podľa hmotnosti.
- Pre nasledujúce situácie použite 1-násobné obohatenie.
 - 10 – 49 ng gDNA
 - 50 – 1 000 ng gDNA extrahovanej z FFPE
 - Detekcia nízkej frekvencie minoritnej alely pre volanie somatických variantov.

Združovanie podľa hmotnosti

V nasledujúcich situáciách kvantifikujte knižnice na obohatenie na použitie hmotnosti DNA podľa knižnice, ako je opísané v časti [Združte knižnice pred obohatením pri rovnakej koncentrácii na strane 35](#).

- 10 – 49 ng vstupná vzorka gDNA
- 50 – 1 000 ng gDNA extrahovanej zo vstupnej vzorky FFPE
- Detekcia nízkej frekvencie minoritnej alely pre volanie somatických variantov
- gDNA extrahovaná z krvi na optimálnu rovnováhu indexov

Kvantifikácia knižníc pred obohatením

1. Spracujte 1 µl knižníc pred obohatením použitím preferovanej fluorescenčnej kvantifikačnej metódy, ktorá využíva interkalačné farbivo dsDNA.
 - Pre 50 – 1 000 ng vysokokvalitnej gDNA očakávajte ≥ 500 ng výťažok knižníc pred obohatením.
 - Pre 50 – 1 000 ng gDNA extrahovanej z FFPE očakávajte 500 – 6 000 ng výťažok knižníc pred obohatením v závislosti od kvality počiatočnej vzorky.

POZNÁMKA Pre kvantifikačné metódy s rôznymi odchýlkami kvalifikujte kvantifikačnú metódu pre tento pracovný postup. Výsledná koncentrácia sa môže líšiť v závislosti od použitej metódy.

Združte knižnice pred obohatením pri rovnakej koncentrácii

Použite nasledujúcu tabuľku na určenie hmotnosti DNA podľa knižnice, ktorá sa požaduje na obohatenie, podľa typu vzorky a násobnosti obohatenia. Ak sa použijú nižšie výťažky knižnice pred obohatením než sa odporúča, nezaručujú sa optimálne výťažky obohatenia a výkonnosť analýzy.

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

Vstupná vzorka	Násobnosť obohatenia	Hmotnosť DNA na knižnicu (ng)	Celková hmotnosť knižnice DNA (ng)
Vysokokvalitná gDNA	12	250 – 500	3 000 – 6 000
gDNA extrahovaná z FFPE	1	200	200

- Zaznamenajte indexy pre knižnice, ktoré plánujete združiť v tomto kroku.
- Na základe koncentrácie každej knižnice vypočítajte objem, ktorý sa musí pridať k reakcii obohatenia, aby sa dosiahla požadovaná hmotnosť DNA.
 - Vysokokvalitná gDNA: vypočítajte objem knižnice potrebný na vstupné množstvo 250 – 500 ng.
 - gDNA extrahovaná z FFPE: vypočítajte objem knižnice potrebný na vstupné množstvo 200 ng.
- Pridajte vypočítaný objem každej knižnice do tej istej jamky PCR doštičky.
- Ak používate vysokokvalitnú gDNA, vykonajte jeden z týchto postupov na základe celkového objemu združených knižníc pred obohatením:
 - Ak je objem knižnice pred obohatením = 30 µl, postupujte podľa pokynov v časti [Hybridizácia sond na strane 37](#).
 - Ak je objem knižnice pred obohatením < 30 µl, pridajte RSB, aby ste dosiahli celkový objem 30 µl.
 - Ak je objem knižnice pred obohatením > 30 µl, použite metódu založenú na guľôčkach alebo vákuový koncentrátor na koncentráciu združenej vzorky. Pridajte RSB do koncentrovanej združenej vzorky, aby ste dosiahli celkový objem 30 µl.
- Ak používate gDNA extrahovanú z FFPE, vykonajte jeden z týchto postupov na základe celkového objemu združených knižníc pred obohatením.
 - Ak je objem knižnice pred obohatením = 7,5 µl, postupujte podľa pokynov v časti [Hybridizácia sond na strane 37](#).
 - Ak je objem knižnice pred obohatením < 7,5 µl, pridajte RSB, aby ste dosiahli celkový objem 7,5 µl.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušíte, doštičku zapečatíte a skladujete ju pri teplote -25 °C až -15 °C maximálne 30 dní.

Združovanie podľa objemu

Keď je vstupné množstvo gDNA 50 – 1 000 ng, nevyžaduje sa kvantifikácia a normalizácia jednotlivých knižníc vytvorených v rámci toho istého pokusu.

Aby ste dosiahli optimálnu výkonnosť, združujte len vzorky knižníc pred obohatením, ktoré pripravil ten istý používateľ, tú istú šaržu reagensov a tú istú doštičku s adaptérmi indexov.

1. Zaznamenajte indexy pre knižnice, ktoré plánujete združiť v tomto kroku.
2. Zmiešajte nasledujúcu knižnicu pred obohatením a objemy RSB pre príslušnú násobnosť obohatenia v jednej jamke novej PCR doštičky.
Výsledný objem je 30 µl.

Násobnosť obohatenia*	Objem každej knižnice pred obohatením (µl)	RSB objem (µl)
1-násobné	14	16
2-násobné	14	2
3-násobné	10	0
4-násobné	7,5	0
5-násobné	6	0
6-násobné	5	0
7-násobné	4,2	0,6
8-násobné	3,7	0,4
9-násobné	3,3	0,3
10-násobné	3	0
11-násobné	2,7	0,3
12-násobné	2,5	0

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

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušíte, doštičku zapečatíte a skladujete ju pri teplote -25 °C až -15 °C maximálne 30 dní.

[Voliteľné] Kvalifikácia knižníc pred obohatením

Ak sa združujú podľa objemu, na kvantifikáciu knižníc pred obohatením použite fluorometrickú metódu, ktorá využíva interkalačné farbivo dsDNA. Na kvantifikáciu knižníc pred obohatením použite analyzátor fragmentov DNA s vhodnou súpravou na analýzu fragmentov.

Na kvalifikáciu knižníc použite celkom 1 µl. Knižnice pred obohatením sú dostatočne koncentrované, aby umožnili malé zriedenia na kvantifikáciu alebo analýzu fragmentov.

Hybridizácia sond

Tento krok spája cieľové oblasti DNA so sondami na zachytenie.

Reagencie súpravy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sú kompatibilné s oligonukleotidovými panelmi na obohatenie DNA vyrobenými spoločnosťou Illumina alebo tretími stranami. Informácie o požadovaných parametroch panelov tretích strán nájdete v časti [Požiadavky na panel sond na obohatenie na strane 10](#).

Spotrebný materiál

- EHB2 (Hybridizačný pufer na obohatenie 2)
- NHB2 (Hybridizačný pufer 2 + blokátory IDT NXT) (modré viečko)
- Panel sond na obohatenie
- 96-jamková PCR doštička
- Adhezívna plomba
- Pripravte si na pokračovanie postupu:
 - SMB3 (Magnetické guľôčky so streptavidínom)
 - EEW (Vylepšený preplachovací pufer na obohatenie) (oranžové viečko)

Informácie o reagensiach

- Počas skladovania NHB2 dochádza k precipitácii a separácii.
- Panel sond na obohatenie znamená vybraný panel oligonukleotidov na obohatenie od dodávateľa spoločnosti Illumina.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
EHB2	2 °C až 8 °C	Nechajte zohriať na izbovú teplotu. Vortexujte, aby sa obsah premiešal. Ak spozorujete kryštály alebo zakalenie, zopakujte vortexovanie alebo pipetujte nahor a nadol, aby sa roztok premiešal, až kým nebude číry.
Panel sond na obohatenie	-25 °C až -15 °C (Illumina)	Panely od spoločnosti Illumina, ako aj panely tretích strán treba nechať zohriať na izbovú teplotu. Vortexujte, aby sa obsah premiešal.

Položka	Skladovanie	Pokyny
NHB2 (modré viečko)	-25 °C až -15° C	<p>Rozmrazte pri izbovej teplote.</p> <p>Keď vzorka dosiahne izbovú teplotu, predhrejte ju 5 minút v inkubátore na mikrovzorky na rovnakú teplotu, akú má sonda, ktorú používate.</p> <p>Vortexujte pri maximálnej rýchlosti 3-krát, vždy po 10 sekúnd, aby sa obsah resuspendoval.</p> <p>Krátko odstred'te v centrifúge.</p> <p>Pipetujte nahor a nadol smerom od dna skúmavky.</p> <p>Ak spozorujete kryštály alebo zakalenie, zopakujte vortexovanie alebo pipetujte nahor a nadol, aby sa roztok premiešal, až kým nebude číry.</p> <p>Použite ho, kým je teplý, aby nedošlo k tvorbe precipitátov v dôsledku pretvárania.</p>
SMB3*	2 °C až 8 °C	<p>Ak sa chystáte vykonať ďalší postup hneď po 90-minútovom zastavení HYB programu, vzorku nechajte zohriať na izbovú teplotu aspoň 2 hodiny pre spustením HYB programu.</p>
EEW* (oranžová skúmavka)	-25 °C až -15° C	<p>Ak sa chystáte vykonať ďalší postup hneď po 90-minútovom zastavení HYB programu, vzorku nechajte zohriať na izbovú teplotu aspoň 2 hodiny pre spustením HYB programu.</p> <p>Keď vzorka dosiahne izbovú teplotu, predhrejte ju pred ukončením HYB programu 30 minút v inkubátore na mikrovzorky až do príslušnej teploty hybridizácie a zachytenia.</p>

*Ak postup zastavujete pred ďalším krokom, pripravte túto reagensiu až tesne pred uvedeným krokom.

- Uložte si nasledujúci HYB program v termálnom cykléri a použite správny počet cyklov, ktoré uvádza [Tabuľka 3](#).
 - Vyberte možnosť predhriatia príklopu a nastavte teplotu na 100 °C.
 - Nastavte reakčný objem.
 - [Vysokokvalitná gDNA] 100 µl
 - [gDNA extrahovaná z FFPE] 25 µl
 - 98°C na 5 minút
 - X cyklov, každý po 1 minúte, s počiatočnou teplotou 98 °C pri prvom cykle, potom znižovať teplotu o 2 °C pri každom cykle
 - Udržte 90 minút na príslušnej teplote:
 - [gDNA extrahovaná z FFPE] 58 °C

- [80 mer panely sond] 58 °C
- [Volanie somatických variantov] 58 °C
- [Všetky ostatné] 62 °C

Celkový čas cyklu je ~115 minút.

Tabuľka 3 Počet cyklov na vzorku alebo panel

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

Postup

1. **[Vysokokvalitná gDNA]** Pridajte tieto reagenty v *uvedenom poradí* do každej združenej knižnice v PCR doštičke.
Nevytvárajte hlavnú zmes. Vytvorenie hlavnej zmesi z NHB2 a EHB2 negatívne ovplyvňuje výkonnosť obohatenia.
 - NHB2 (modré viečko) (50 µl)
 - Panel sond na obohatenie (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. **[Vysokokvalitná gDNA]** Použitím pipety nastavenej na 90 µl pipetujte každú jamku 10-krát, aby sa obsah premiešal.
3. **[gDNA extrahovaná z FFPE]** Pridajte tieto reagenty v *uvedenom poradí* do každej združenej knižnice v PCR doštičke.
Nevytvárajte hlavnú zmes. Vytvorenie hlavnej zmesi z NHB2 a EHB2 negatívne ovplyvňuje výkonnosť obohatenia.
 - NHB2 (modré viečko) (12,5 µl)
 - Panel sond na obohatenie (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[gDNA extrahovaná z FFPE]** Použitím pipety nastavenej na 20 µl pipetujte každú jamku 10-krát, aby sa obsah premiešal.
5. Zaplombujte doštičku a odstreďte ju v centrifúge 10 sekúnd pri 280 × g.
6. Doštičku so vzorkami umiestnite do predprogramovaného termálneho cykléra a spustíte HYB program.
7. Keď skončí čas udržiavania teploty HYB programu, pokračujte ihneď ďalším krokom.

**UPOZORNENIE**

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

Zachytenie hybridizovaných sond

V tomto kroku sa používajú magnetické guľôčky so streptavidínom (SMB3) na zachytenie sond hybridizovaných na požadované cieľové oblasti.

Spotrebný materiál

- EEW (Vylepšený preplachovací pufer na obohatenie) (oranžové viečko)
- EE1 (Elučný pufer na obohatenie 1)
- ET2 (Elučný cieľový pufer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Magnetické guľôčky so streptavidínom)
- Mikrocentrifugačná skúmavka, 1,5 ml
- 96-jamková MIDI doštička
- 96-jamková PCR doštička
- Adhezívna plomba
- Magnetický stojan na MIDI doštičku
- Pripravte si na pokračovanie postupu:
 - Vylepšená PCR zmes (EPM, Enhanced PCR Mix)
 - Koktejl PCR primérov (PPC, PCR Primer Cocktail)

Informácie o reagensiach

- EEW
 - Ubezpečte sa, že EEW sa pred predbežným zahriatím v inkubátore na mikrovzorky aspoň 2 hodiny rozmrazoval pri izbovej teplote.
 - Ubezpečte sa, že EEW sa pred ukončením HYB programu 30 minút zohrieval v inkubátore na mikrovzorky.
 - Keď sa EEW nepoužíva, ponechajte ho v inkubátore na mikrovzorky. EEW má ostať zohriaty počas celého protokolu.
 - Po dosiahnutí izbovej teploty môže byť zakalený.
 - Môže mať žlté sfarbenie.
- SMB3
 - SMB3 musí mať pred použitím izbovú teplotu.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúci spotrebný materiál.

Položka	Skladovanie	Pokyny
SMB3	2 °C až 8 °C	Nechajte 2 hodiny odstáť, aby sa dosiahla izbová teplota. Prevráťte a potom vortexujte, až kým sa celkom resuspenduje.
EEW (oranžová skúmavka)	-25 °C až -15° C	Po inkubácii pri izbovej teplote počas 2 hodín ho 30 minút predhrejte v inkubátore na mikrovzorky na vhodnú teplotu hybridizácie a zachytenia pred ukončením HYB programu.
EE1	-25 °C až -15° C	Rozmrazte pri izbovej teplote a potom vortexujte.
HP3	-25 °C až -15° C	Rozmrazte pri izbovej teplote a potom vortexujte.
ET2	2 °C až 8 °C	Nechajte zohriať na izbovú teplotu. Vortexujte, aby sa obsah premiešal.
EPM	-25 °C až -15° C	Rozmrazujte jednu hodinu na ľade. Prevráťte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstredujte v centrifúge. Nechajte odstáť na ľade.
PPC	-25 °C až -15° C	Rozmrazujte jednu hodinu na ľade. Vortexujte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstredujte v centrifúge. Nechajte odstáť na ľade.

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

Postup

Zachytenie

1. Pridajte SMB3 do príslušnej jamky novej MIDI doštičky podľa nasledujúcich informácií.
 - [Vysokokvalitná gDNA] Pridajte 250 µl SMB3.
 - [gDNA extrahovaná z FFPE] Pridajte 62,5 µl SMB3.
2. Použitím pipety nastavenej na 100 µl pre vysokokvalitnú gDNA alebo na 25 µl pre FFPE preneste každú združenú knižnicu z 96-jamkovej PCR doštičky do príslušnej jamky novej MIDI doštičky .
3. Doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 4 minúty pri 1 200 rpm.

4. Ak dochádza k rozstrekovaniu, doštičku odstred'ujte krátko.
5. Umiestnite doštičku so združenými knižnicami na vkladací ohrievací blok MIDI v inkubátore na mikrovzorky pod skúmavku s EEW, zatvorte príklop a inkubujte 15 minút pri príslušnej teplote:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer na panel sond] 58 °C
 - [Volanie somatických variantov] 58 °C
 - [Všetky ostatné] 62 °C
6. Vyberte doštičku so združenými knižnicami a odstred'ujte ju v centrifúge 30 sekúnd pri 280 × g.
7. Ihneď ju umiestnite na magnetický stojan na MIDI doštičky a čakajte, kým nie je tekutina číra (2 minúty).
8. **[Vysokokvalitná gDNA]** Použitím pipety nastavenej na 200 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky a dbajte na to, aby ste pritom nepoškodili obal guľôčok.
9. **[gDNA extrahovaná z FFPE]** Použitím pipety nastavenej na 90 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky a dbajte na to, aby ste pritom nepoškodili obal guľôčok.
10. Odstráňte a zlikvidujte všetok zvyšný supernatant.

Preplachovanie

1. Vyberte doštičku z magnetického stojana.
2. **[Vysokokvalitná gDNA]** Rýchlo vyberte EEW z inkubátora na mikrovzorky a pridajte 200 µl do každej jamky.
3. **[gDNA extrahovaná z FFPE]** Rýchlo vyberte EEW z inkubátora na mikrovzorky a pridajte 50 µl do každej jamky.
4. Nepoužitý EEW vráťte do inkubátora na mikrovzorky a udržiujte zahriaty.
5. Zaplombujte a nechajte pretrepať 4 minúty pri 1 800 rpm.
6. Umiestnite doštičku so vzorkami na vkladací ohrievací blok MIDI v inkubátore na mikrovzorky pod skúmavku s EEW, zatvorte príklop a potom inkubujte 5 minút pri príslušnej teplote:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer panely sond] 58 °C
 - [Volanie somatických variantov] 58 °C
 - [Všetky ostatné panely] 62 °C
7. Ihneď ju umiestnite na magnetický stojan na MIDI doštičky a čakajte, kým nie je tekutina číra (2 minúty).
8. Použitím pipety nastavenej na 200 µl v prípade vysokokvalitnej gDNA alebo 50 µl v prípade FFPE, odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.
9. Zopakujte kroky 1 – 8 dvakrát, pričom celkovo vykonajte tri prepláchnutia.

Preplachovanie pri prenášaní

1. Vyberte doštičku z magnetického stojana.
2. [Vysokokvalitná gDNA] Rýchlo vyberte EEW z inkubátora na mikrovzorky a pridajte 200 µl do každej jamky.
3. [gDNA extrahovaná z tkaniva FFPE] Rýchlo vyberte EEW z inkubátora na mikrovzorky a pridajte 50 µl do každej jamky.
4. Zaplombujte a nechajte pretrepať 4 minúty pri 1 800 rpm. Ak dôjde k rozstrekovaniu, znížte rýchlosť na 1 600 rpm.
5. Preneste roztok resuspendovaných guľôčok do novej MIDI doštičky.
Určité množstvo vzorky môže ostať v jamkách.



UPOZORNENIE

Prenos reagentie minimalizuje prenesenie zvyškových reagentí, ktoré môžu inhibovať PCR od 5' k 3' koncu.

6. Umiestnite doštičku so vzorkami na vkladací ohrievací blok MIDI v inkubátore na mikrovzorky, zatvorte príklop a potom inkubujte počas 5 minút pri príslušnej teplote:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80 mer panely sond] 58 °C
 - [Volanie somatických variantov] 58 °C
 - [Všetky ostatné] 62 °C
7. Ihneď ju umiestnite na magnetický stojan na MIDI doštičky a čakajte, kým nie je tekutina číra (2 minúty).
8. Použitím pipety nastavenej na 200 µl v prípade vysokokvalitnej gDNA alebo 50 µl v prípade FFPE , odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.
9. Odstredujte doštičku v centrifúge 30 sekúnd pri 280 × g.
10. Umiestnite ju na magnetický stojan na MIDI doštičky na 10 sekúnd.
11. Pomocou 20 µl pipety odstráňte a zlikvidujte zvyškovú tekutinu z každej jamky.
12. Ihneď pokračujte krokom [Elúcia na strane 43](#), aby sa predišlo nadmernému vysušeniu guľôčok a strate výťažku knižnice.

Elúcia

1. Zmiešaním týchto objemov pripravte elučnú hlavnú zmes. Vynásobte každý objem počtom združených knižníc, ktoré sa spracúvajú.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Nadbytočné množstvo reagentie je zahrnuté do objemu.
2. Vortexujte a potom krátko odstredte v centrifúge.

3. Vyberte MIDI doštičku z magnetického stojana.
4. Pridajte 23 µl elučnej hlavnej zmesi do každej jamky.
5. Doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 2 minúty pri 1 800 rpm.
6. Inkubujte doštičku 2 minúty pri izbovej teplote.
7. Odstred'ujte v centrifúge 30 sekúnd pri 280 × g.
8. Ihneď ju umiestnite na magnetický stojan na MIDI doštičky a čakajte, kým nie je tekutina číra (2 minúty).
9. Preneste 21 µl supernatantu z MIDI doštičky do príslušnej jamky novej 96-jamkovej PCR doštičky.
10. Zlikvidujte MIDI doštičku.
11. Pridajte 4 µl ET2 do každej jamky obsahujúcej 21 µl supernatantu.
12. Nastavte pipetu na 20 µl a pomaly pipetujte každú jamku 10-krát, aby sa obsah premiešal.
13. Zaplombujte doštičku a odstred'ujte ju 10 sekúnd v centrifúge pri 280 × g.
14. Inkubujte doštičku 1 minútu pri izbovej teplote.

Amplifikácia obohatenej knižnice

V tomto kroku sa používa PCR na amplifikáciu obohatenej knižnice.

Spotrebný materiál

- EPM (Vylepšená PCR zmes)
- PPC (Kokteil PCR primérov)
- Adhezívna plomba

Príprava

1. Pripravte si nasledujúci spotrebný materiál:

Položka	Skladovanie	Pokyny
EPM	-25 °C až -15° C	Rozmrazujte jednu hodinu pri teplote 4 °C alebo na ľade. Prevráťte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstred'ujte v centrifúge. Nechajte odstáť na ľade.
PPC	-25 °C až -15° C	Rozmrazujte jednu hodinu pri teplote 4 °C alebo na ľade. Vortexujte, aby sa obsah premiešal, a potom krátko odstred'ujte v centrifúge. Nechajte odstáť na ľade.

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

- Vyberte možnosť predhriatia príklopu a nastavte teplotu na 100 °C.
- Nastavte reakčný objem na 50 µl.
- 98° C na 45 sekúnd
- (X) cyklov z:
 - 98 C na 30 sekúnd
 - 60 °C na 30 sekúnd
 - 72 °C na 30 sekúnd
- 72 °C na 5 minút
- Udržujte na 10 °C

Celkový čas cyklu je ~35 minút.

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

¹ Pre malé panely tretích strán sa môže následnou optimalizáciou upraviť až do 15 cyklov. Ak používate FFPE, počet cyklov sa môže upraviť až do 17.

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

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

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

Postup

1. Pridajte 5 µl PPC do každej jamky.
2. Pridajte 20 µl EPM do každej jamky.
3. Doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 200 rpm.
4. Odstred'ujte doštičku v centrifúge 10 sekúnd pri 280 × g.
5. Umiestnite ju do predprogramovaného termálneho cykléra a spustite AMP program.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušíte, skladujte pri teplote 2 °C až 8 °C maximálne dva dni. Prípadne ponechajte v termálnom cykléri maximálne 24 hodín.

Prečistenie amplifikovanej obohatenej knižnice

V tomto kroku sa používajú čistiace guľôčky na purifikáciu obohatenej knižnice a odstránenie nežiaducich produktov.

Spotrebný materiál

- CB (Čistiace guľôčky)
- RSB (Pufer na resuspenziu)
- Čerstvo pripravený 80 % etanol (EtOH)
- Adhezívne plomby
- 96-jamková MIDI doštička
- 96-jamková PCR doštička
- Magnetický stojan na MIDI doštičku

Informácie o reagensiach

- Čistiace guľôčky
 - Pred každým použitím vortexujte.
 - Vortexujte často, aby boli guľôčky rozložené rovnomerne.
 - Z dôvodu viskozity roztoku vykonávajte aspiráciu a rozdeľovanie pomaly.

Príprava

1. Pripravte si nasledujúci spotrebný materiál.

Položka	Skladovanie	Pokyny
CB	Izbová teplota	Vortexujte a prevráťte, aby sa obsah premiešal, až kým nie je farba tekutiny homogénna.
RSB	2 °C až 8 °C	Nechajte zohriať na izbovú teplotu. Vortexujte, aby sa obsah premiešal.

2. Pripravte si čerstvý 80 % EtOH z čistého etanolu.

Postup

1. Odstred'ujte PCR doštičku v centrifúge 10 sekúnd pri 280 × g.
2. Vortexujte CB 3-krát po 10 sekúnd a potom prevráťte.
3. Pridajte 40,5 µl CB do každej jamky novej **MIDI** doštičky.
4. Preneste 45 µl z každej jamky PCR doštičky do príslušnej jamky MIDI doštičky.
5. Doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 800 rpm.

6. Inkubujte MIDI doštičku 5 minút pri izbovej teplote.
7. Odstredujte v centrifúge 10 sekúnd pri 280 × g.
8. Umiestnite ju na magnetický stojan na MIDI doštičky a čakajte, kým nie je tekutina číra (5 minút).
9. Použitím pipety nastavenej na 95 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.
10. Dvakrát prepláchnite podľa nasledujúceho postupu.
 - a. Ponechajte doštičku na magnetickom stojane a pridajte 200 µl čerstvého 80 % EtOH bez miešania.
 - b. Inkubujte 30 sekúnd.
 - c. Odstráňte a zlikvidujte supernatant, pričom dávajte pozor, aby ste nepoškodili guľôčky.
11. Sušte 5 minút vzduchom na magnetickom stojane.
12. Počas sušenia vzduchom použite 20 µl pipetu na odstránenie a zlikvidovanie zvyškového EtOH z každej jamky.
13. Odstráňte doštičku z magnetického stojana a pridajte 32 µl RSB do každej jamky.
14. Doštičku zaplombujte a nechajte pretrepať 1 minútu pri 1 800 rpm.
15. Inkubujte doštičku 5 minút pri izbovej teplote.
16. Odstredujte v centrifúge 10 sekúnd pri 280 × g.
17. Umiestnite ju na magnetický stojan na MIDI doštičky a čakajte, kým nie je tekutina číra (2 minút).
18. Preneste 30 µl supernatantu z 96-jamkovej MIDI doštičky do príslušnej jamky novej PCR doštičky.
19. Zlikvidujte MIDI doštičku.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Ak postup prerušíte, doštičku zapečatíte a skladujete ju pri teplote -25 °C až -15 °C maximálne 7 dní.

Kontrola obohatených knižníc

Na kvantifikáciu vlozenej dvojláknovej gDNA použite fluorescenčnú metódu, ktorá využíva interkalačné farbivá. Nepoužívajte metódy, ktoré merajú celkovú nukleovú kyselinu, ako sú NanoDrop alebo iné UV absorpčné metódy.

1. Spustíte analýzu 1 µl obohatených knižníc použitím svojej kvantifikačnej metódy.

POZNÁMKA Celková molarita sond proporčne ovplyvňuje výťažok knižnice po obohatení.

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

Zriedenie knižníc na počiatočnú koncentráciu

V tomto kroku sa knižnice zriedia na počiatočnú koncentráciu pre váš sekvenovací systém. Je to prvý krok série riedenia. Po zriedení na počiatočnú koncentráciu sú knižnice pripravené na denaturáciu a zriedené na konečnú koncentráciu nanášania.

Bez ohľadu na použitý panel sond na obohatenie Illumina odporúča pri sekvenovaní nastaviť chod na čítanie z oboch koncov so 151 cyklami na jedno čítanie (2 × 151) a 10 cyklami na jedno čítanie indexov. Ak chcete doceliť menej prekrývajúcich sa čítaní alebo menej nespracovaného pokrytia, môžete sekvenovanie znížiť na 2 × 126 alebo 2 × 101.

- Vypočítajte hodnotu molarity knižnice alebo združených knižníc pomocou tohto vzorca.
 - Pre knižnice kvalifikované na analyzátoch DNA fragmentov použite priemernú veľkosť získanú pre knižnicu.
 - Pre iné kvalifikačné metódy kvalifikácie použite 350 bp ako priemernú veľkosť knižnice.

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

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

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

- Použitím hodnoty molarity vypočítajte objemy RSB a knižnice potrebné na zriedenie knižníc na počiatočnú koncentráciu pre váš systém.

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

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM je úvodná koncentrácia pre konečnú koncentráciu nanášania 350 pM. Ak je to potrebné, upravte konečnú koncentráciu nanášania pomocou nasledujúcej tabuľky.

Konečná koncentrácia nanášania (pM)	Koncentrácia združenej knižnice (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2

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

3. Zried'te knižnice použitím RSB:

- **Knižnice kvantifikované ako súbor mnohonásobných knižníc** – zried'te súbor na počiatočnú koncentráciu pre váš systém.
- **Knižnice kvantifikované individuálne** – zried'te každú knižnicu na počiatočnú koncentráciu pre váš systém. Pridajte 10 µl z každej zriedenej knižnice do skúmavky a vytvorte tak súbor mnohonásobných knižníc.

4. Postupujte podľa pokynov na denaturáciu a zriedenie pre váš systém, aby ste vzorku zriedili na konečnú koncentráciu nanášania.

- Informácie o systéme NextSeq 550Dx nájdete v časti [Príprava sekvenovania v prístroji NextSeq 550Dx na strane 49](#).
- Informácie o systéme MiSeqDx nájdete v časti [Príprava sekvenovania v prístroji MiSeqDx na strane 51](#).
- Informácie o systéme NovaSeq 6000Dx nájdete v časti [Príprava sekvenovania v prístroji NovaSeq 6000Dx na strane 52](#).

Počiatočnou hodnotou a všeobecným usmernením sú konečné koncentrácie nanášania. Optimalizujte koncentrácie pre svoj pracovný postup a kvantifikačnú metódu po sebe nasledujúcimi sekvenovacími chodmi alebo titráciou v prietokovom článku.

Príprava sekvenovania v prístroji NextSeq 550Dx

Denaturáciu a zriedenie knižníc v sekvenovacom systéme NextSeq 550Dx vykonajte podľa nasledujúcich pokynov.

Spotrebný materiál

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

Príprava

Prípravte *čerstvý* roztok 0,2N NaOH na denaturáciu knižníc na sekvenovanie. Pripravuje sa objem navyše, aby sa zabránilo tomu, že drobné chyby pri pipetovaní ovplyvnia konečnú koncentráciu NaOH.

**UPOZORNENIE**

Čerstvo rozriedený 0,2N NaOH je pre proces denaturácie zásadný. Nesprávna denaturácia môže znížiť výťažok.

- Zmiešajte uvedené objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke a zriedte 1N NaOH na 0,2N NaOH:
- Prípravte si nasledujúci spotrebný materiál.

Položka	Skladovanie	Pokyny
HT1	-25 °C až -15° C	Rozmrazte pri izbovej teplote. Skladujte pri teplote 2° C až 8 °C, až kým nie ste pripravení na zriedenie denaturovaných knižníc.

- Zmiešajte uvedené objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke a pripravte čerstvo zriedený NaOH:
 - Laboratórna voda (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)
 Výsledok je 1 ml 0,2 N NaOH.
- Skúmavku niekoľkokrát prevráťte, aby sa obsah premiešal.
- Zmiešajte uvedené objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke a pripravte 200 mM Tris-HCl s pH 7,0.
 - Laboratórna voda (800 µl)
 - 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)
 Výsledok je 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

POZNÁMKA Na skúmavke ponechajte viečko. Čerstvo zriedený roztok použite v priebehu **12 hodín**.

Denaturácia knižníc

- Zmiešajte uvedené objemy knižnice a čerstvo zriedený 0,2 N NaOH v mikrocentrifugačnej skúmavke.
 - 10 µl knižnica
 - 10 µl 0,2 N NaOH
- Krátko vortexujte a potom odstred'ujte 1 minútu v centrifúge pri 280 × g.
- Inkubujte 5 minút pri izbovej teplote.
- Pridajte 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

Zriedenie denaturovaných knižníc na 20 pM

- Pridajte 970 µl vychladeného HT1 do skúmavky s denaturovanými knižnicami. Výsledok je denaturovaná knižnica s koncentráciou 20 pM.
- Krátko vortexujte a potom odstred'ujte 1 minútu v centrifúge pri 280 × g.
- Umiestnite knižnice s koncentráciou 20 pM na ľad, kým nebudete pripravení na záverečné zriedenie.

Zriedenie knižníc na koncentráciu nanášania

1. Pridajte uvedené objemy a zriedte denaturovaný 20 pM roztok knižnice na 1,2 pM.
 - Denaturovaný roztok knižnice (78 µl)
 - Vychladený HT1 (1 222 µl)
 Celkový objem je 1,3 ml s koncentráciou 1,2 pM.
2. Prevráťte, aby sa obsah premiešal, a potom odstredte pri pulznom chode centrifúgy.
3. Pokračujte sekvenovaním. Pokyny nájdete v časti *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Referenčná príručka k prístroju NextSeq 550Dx, dokument č. 1000000009513)*.

Príprava sekvenovania v prístroji MiSeqDx

Denaturáciu a zriedenie knižníc v sekvenovacom systéme MiSeqDx vykonajte podľa nasledujúcich pokynov.

Spotrebný materiál

- HT1 (Hybridizačný pufer)
- 1N NaOH

Príprava

Prípravte **čerstvý** roztok 0,2N NaOH na denaturáciu knižníc na sekvenovanie. Pripravuje sa objem navyše, aby sa zabránilo tomu, že drobné chyby pri pipetovaní ovplyvnia konečnú koncentráciu NaOH.



UPOZORNENIE

Čerstvo rozriedený 0,2N NaOH je pre proces denaturácie zásadný. Nesprávna denaturácia môže znížiť výťažok.

1. Zmiešajte uvedené objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke a zriedte 1N NaOH na 0,2N NaOH:
1. Pripravte si nasledujúci spotrebný materiál.

Položka	Skladovanie	Pokyny
HT1	-25 °C až -15° C	Rozmrazte pri izbovej teplote. Skladujte pri teplote 2° C až 8 °C, až kým nie ste pripravení na zriedenie denaturovaných knižníc.

2. Zmiešajte uvedené objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke a pripravte čerstvo zriedený NaOH:
 - Laboratórna voda (800 µl)
 - 1N NaOH (200 µl)
 Výsledok je 1 ml 0,2 N NaOH.

POZNÁMKA Na skúmavke ponechajte viečko. Čerstvo zriedený roztok použite v priebehu **12 hodín**.

Denaturácia 4 nM knižnice

- Zmiešajte uvedené objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke.
 - 4 nM knižnica (5 µl)
 - 0,2N NaOH (5 µl)
- Krátko vortexujte a potom odstredíte 1 minútu v centrifúge pri 280 × g.
- Inkubujte 5 minút pri izbovej teplote.
- Pridajte 990 µl vychladeného HT1 do skúmavky s denaturovanou knižnicou.
Výsledok je 1 ml 20 pM denaturovanej knižnice.

Zriedenie denaturovanej 20 pM knižnice

- Zriedte do požadovanej koncentrácie použitím nasledujúcich objemov.

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

- Prevráťte, aby sa obsah premiešal, a potom odstredte pri pulznom chode centrifúgy.
- Pokračujte sekvenovaním. Pokyny nájdete v referenčnej príručke *MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4* (dokument č. 1000000157953).

Príprava sekvenovania v prístroji NovaSeq 6000Dx

Denaturáciu a zriedenie knižníc v sekvenovacom systéme NovaSeq 6000Dx vykonajte podľa nasledujúcich pokynov.

Spotrebný materiál

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

Príprava

Prípravte *čerstvý* roztok 0,2N NaOH na denaturáciu knižníc na sekvenovanie. Pripravuje sa objem navyše, aby sa zabránilo tomu, že drobné chyby pri pipetovaní ovplyvnia konečnú koncentráciu NaOH.

**UPOZORNENIE**

Čerstvo rozriedený 0,2N NaOH je pre proces denaturácie zásadný. Nesprávna denaturácia môže znížiť výťažok.

1. Zmiešajte uvedené objemy v mikrocentrifugačnej skúmavke a zriedte 1N NaOH na 0,2N NaOH:

Tabuľka 4 Režim S2

Reagencia	Objem na jeden prietokový článok (μ l)	Objem na dva prietokové články (μ l)
Laboratórna voda	40	80
Pripravený 1N NaOH	10	20

Výsledkom týchto objemov je 50 μ l 0,2N NaOH na jeden prietokový článok alebo 100 μ l 0,2N NaOH na dva prietokové články.

Tabuľka 5 Režim S4

Reagencia	Objem na jeden prietokový článok (μ l)	Objem na dva prietokové články (μ l)
Laboratórna voda	80	160
Pripravený 1N NaOH	20	40

Výsledkom týchto objemov je 100 μ l 0,2N NaOH na jeden prietokový článok alebo 200 μ l 0,2N NaOH na dva prietokové články.

2. Viackrát prevráťte, aby sa obsah premiešal alebo dôkladne vortexujete.

POZNÁMKA Na skúmavke ponechajte viečko. Čerstvo zriedený roztok použite v priebehu **12 hodín**.

Vytvorenie normalizovaného súboru knižníc

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

Na normalizáciu knižníc na vhodnú koncentráciu použite nasledujúce pokyny a potom ich združte. Knižnice sekvenované na rovnakom prietokovom článku sa musia spájať do jedného normalizovaného súboru.

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

Normalizácia knižníc na združovanie

1. Určite požadovanú koncentráciu združenej knižnice na základe požadovanej konečnej koncentrácie nanášania.
 - Pre konečnú koncentráciu nanášania 350 pM sa vyžaduje koncentrácia združenej knižnice 1,75 nM.
 - Na určenie koncentrácie združenej knižnice pre inú konečnú koncentráciu nanášania si prečítajte časť [Zriedenie knižníc na počiatočnú koncentráciu na strane 47](#).
2. Normalizujte knižnice na požadovanú koncentráciu združenej knižnice použitím 10 mM Tris-HCl s pH 8,5. Ak potrebujete pomoc s riedením knižníc na primeranú koncentráciu, použite [Kalkulačku združovania](#) na webových stránkach spoločnosti Illumina.

Odporúčané koncentrácie nanášania

Optimálna koncentrácia DNA pre nanášanie závisí od typu knižnice a veľkosti vlozenej vzorky. Pri knižniciach s veľkosťou > 450 bp môžu byť potrebné vyššie koncentrácie nanášania.

Združovanie normalizovaných knižníc a pridanie voliteľnej kontroly pomocou PhiX

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

Režim	Konečný objem (µl)
S2	150
S4	310

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

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

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

Denaturácia súboru knižníc a voliteľná kontrola PhiX

1. Pridajte 0,2 N NaOH do skúmavky nedenaturovaného súboru knižníc a vykonajte voliteľnú PhiX podľa nasledujúceho postupu.

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

- Zatvorte viečkom a krátko vortexujte.
- Odstred'ujte v centrifúge 1 minútu pri 280 × g.
- Inkubujte 8 minút pri izbovej teplote, aby sa obsah denaturoval.
- Pridajte 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 na neutralizáciu, ako je uvedené ďalej.

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

- Zatvorte viečkom a krátko vortexujte.
- Odstred'ujte v centrifúge 1 minútu pri 280 × g.
- Preneste celý objem denaturovanej knižnice alebo denaturovanú knižnicu a PhiX do skúmavky na knižnicu NovaSeq 6000Dx.
- Pokračuje sekvenovaním. Pokyny nájdete v dokumentácii k produktu *NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation* (dokument č. 200010105).

Riešenie problémov

Na riešenie problémov počas pracovného postupu použijete nasledujúcu tabuľku. Ak sekvenovací chod alebo príprava knižnice pre vzorku dvakrát zlyhá, môže byť potrebné ďalšie riešenie problému. Obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.

Spozorovaný problém	Možná príčina	Odporúčaný krok
Sekvenovací chod nespĺňa špecifikácie kontroly kvality chodu	Chyba používateľa alebo laboratórneho vybavenia počas vykonávania analýzy	<p>Kvalifikujte obohatené knižnice, aby ste zabezpečili primeraný výťažok knižnice a distribúciu veľkosti fragmentov. Zopakujte prípravu knižnice od niektorého z týchto krokov podľa toho, kedy nastala predpokladaná chyba použitia alebo vybavenia. Ak to nie je známe alebo sa vyskytli aj iné chyby, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina, ktoré vám pomôže s riešením problému daného chodu.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zopakujte sekvenovanie knižníc. Prečítajte si dokumenty Príprava sekvenovania v prístroji NextSeq 550Dx na strane 49, Príprava sekvenovania v prístroji MiSeqDx na strane 51 alebo Príprava sekvenovania v prístroji NovaSeq 6000Dx na strane 52. • Zopakujte obohatenie knižníc. Prečítajte si časť Hybridizácia sond na strane 37. • Začnite s prípravou knižnice od úvodných krokov pracovného postupu. Prečítajte si Návod na použitie na strane 21.
	Problém s prístrojom	Obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.
Chyba pri vytváraní FASTQ alebo všeobecná chyba sekvenovacieho systému (napr. problém siete, chyby pri vkladaní/vyberaní reagensov atď.)	Problém so softvérom alebo s prístrojom	<p>Prečítajte si <i>Local Run Manager Software Guide (Sprivodca softvérom aplikácie Správca lokálnych chodov, dokument č. 100000002702)</i>, ak potrebujete pomoc s generovaním FASTQ, alebo si prečítajte <i>NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Referenčná príručka k prístroju NextSeq 550Dx, dokument č. 1000000009513)</i>, <i>MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (Referenčná príručka k prístroju MiSeqDx pre MOS v4, dokument č. 1000000157953)</i> alebo <i>NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation (Produktová dokumentácia k prístroju NovaSeq 6000Dx, dokument č. 200010105)</i>.</p> <p>Ak potrebujete ďalšiu pomoc, obráťte sa na technickú podporu spoločnosti Illumina.</p>

Spozorovaný problém	Možná príčina	Odporúčaný krok
Knižnica DNA nevytvára dostatočný výťažok na vloženie na sekvenovanie	Neboli splnené požiadavky na vstupnú vzorku	Zabezpečte vhodnú vstupnú vzorku a zopakujte prípravu knižnice. Prečítajte si Odporúčania týkajúce sa vstupnej vzorky na strane 17 .
	Chyba použitia alebo vybavenia v pracovnom postupe analýzy	Zopakujte prípravu knižnice od niektorého z týchto krokov podľa toho, kedy nastala predpokladaná chyba použitia alebo vybavenia. Ak to nie je známe alebo sa vyskytli aj iné chyby, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina, ktoré vám pomôže s riešením problému daného chodu. <ul style="list-style-type: none"> Zopakujte sekvenovanie knižníc. Prečítajte si dokumenty Príprava sekvenovania v prístroji NextSeq 550Dx na strane 49, Príprava sekvenovania v prístroji MiSeqDx na strane 51 alebo Príprava sekvenovania v prístroji NovaSeq 6000Dx na strane 52. Zopakujte obohatenie knižníc. Prečítajte si časť Hybridizácia sond na strane 37. Začnite s prípravou knižnice od úvodných krokov pracovného postupu. Prečítajte si Návod na použitie na strane 21.
	Neboli splnené požiadavky na panel sond na obohatenie	Zabezpečte vhodný panel sond na obohatenie a zopakujte prípravu knižnice. Prečítajte si Požiadavky na panel sond na obohatenie na strane 10 .

Výkonnostné charakteristiky

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

Výkonnosť s kompletnými exómovými panelmi

Výkonnosť exómového panelu bola testovaná použitím najnižšej (50 ng) a najvyššej (1 000 ng) odporúčanej vstupnej hodnoty Coriell Cell Line gDNA NA12878 so známymi pravdivostnými hodnotami pre detekciu zárodočného variantu (Coriell platinum genome). Ako reprezentatívne panely sa použili exómový panel 1 (45 Mb) a exómový panel 2 (36,8 Mb). Použitím analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx assay s exómovým panelom 1 (45 Mb) sa testovalo 24 technických replikátov v dvoch 12-násobných reakciách obohatenia. Použitím analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx assay s exómovým panelom 2 (36,8 Mb) sa

testovalo 12 technických replikátov v jednej 12-násobnej reakcii obohatenia. Obohatené knižnice sa sekvenovali v sekvenovacom systéme prístroja NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

Nasledujúca tabuľka uvádza priemerné hodnoty sekundárneho sekvenovania a metriku výkonnosti stanovenia variantu pre technické replikáty testované s každým panelom.

Tabuľka 6 Výkonnosť analýzy s dvoma kompletnými exómovými panelmi

Panel	Obohatenie so stlmeným jedinečným čítaním	Rovnomernosť pokrytia	Medián dĺžky fragmentu	Odozva SNV ¹	Presnosť SNV ²	Odozva indelu ¹	Presnosť indelu ²
Exómový panel 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Exómový panel 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹Odozva = pozitívne/(skutočne pozitívne + falošne negatívne)

²Presnosť = skutočne pozitívne/(skutočne pozitívne + falošne pozitívne)

Detekčný limit

Na testovanie detekčného limitu sa použil referenčný štandard DNA Horizon HD799. HD799 sa skladá z mierne znehodnotenej DNA ošetrenej formalínom so známymi SNV vo frekvenciách alel v rozsahu 1 – 24,5 %. Použilo sa najnižšie odporúčané vstupné množstvo DNA (50 ng) a hodnotila sa rýchlosť detekcie SNV s frekvenciou variantnej alely (VAF) $\geq 5,0$ %. Použitím analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s pracovným postupom FFPE obohatenej o komplexný rakovinový panel (1,94 Mb) v 16 (jednonásobných) obohateniach sa testovalo 16 technických replikátov, ktoré sa potom sekvenovali v prístroji NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Všetky vzorky splnili požiadavky na výkonnosť vzorky podľa panela, ako je uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 7 Výkonnosť vzorky pre detekčný limit

Panel	Detekčná miera variantu SNV $\geq 5,0$ % VAF	Priemer Rovnomernosť pokrytia
Komplexný rakovinový panel na obohatenie (1,94 Mb, 523 génov)	100 %	99 %

Interferujúce látky

Vplyv potenciálne interferujúcich látok v Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sa posudzoval zhodnotením výkonnosti analýzy v prítomnosti interferujúcich látok.

Interferencia v plnej krvi

Acetaminofén (exogénna zlúčenina, liek), kreatinín a triglyceridy (endogénne metabolity) sa testovali ich vpravením do vzoriek celej ľudskej krvi pred extrakciou DNA. Na posúdenie interferencie vyplývajúcej z odberu krvi (malý objem) sa do vzoriek plnej krvi vpravila aj EDTA. Okrem toho sa na posúdenie interferencie v dôsledku prípravy vzorky vpravil do DNA extrahovanej z plnej krvi aj etanol na molekulárnej úrovni.

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené testovacie koncentrácie podľa interferenčnej látky.

Tabuľka 8 Potenciálne interferujúce látky a koncentrácie testované v plnej krvi

Testovacia látka	Testovacia koncentrácia
Acetaminofén	15,6 mg/dl* Trojnásobok očakávanej najvyššej koncentrácie po terapeutickej dávke lieku.
Kreatinín	15 mg/dl* Najvyššia pozorovaná koncentrácia v populácii.
Triglyceridy	1,5 g/dl* Najvyššia pozorovaná koncentrácia v populácii.
EDTA	6 mg/ml Trojnásobok očakávanej koncentrácie v krvi odobratej do EDTA skúmaviek.
Etanol na molekulárnej úrovni	15 % v/v V eluáte po extrakcii DNA.

*Podľa CLSI EP37-ED1:2018

Podľa interferujúcej látky sa použitím analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx obohatenej o exómový panel 1 (45 Mb) metódou jednoduchého (12-násobného) obohatenia testovalo 12 technických replikátov, ktoré sa potom sekvenovali v prístroji NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Pri testovaných látkach splnilo všetkých 12 vzoriek požiadavky na výkonnosť vzorky a nepozorovala sa žiadna interferencia s výkonnosťou analýzy.

Interferencia v tkanive FFPE (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, fixované formalínom a zaliate do parafínu)

Testovali sa dve kolorektálne vzorky FFPE za prítomnosti aj absencie hemoglobínu v koncentrácii 0,1 mg na 10 µm sekcie FFPE s cieľom reprezentovať najhorší možný scenár 50 % kontaminácie tkanivovej vzorky FFPE krvou s vysokou koncentráciou hemoglobínu. Vzorky sa testovali pomocou analýzy Illumina DNA Prep with

Enrichment Dx použitím komplexného rakovinového panela na obohatenie 1 (1,94 Mb) ako reprezentatívneho panela pri jednonásobnej metóde obohatenia. Obohatené knižnice sa potom sekvenovali v prístroji NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx. Všetky vzorky splnili požiadavky na výkonnosť a dokázalo sa, že hemoglobín neinterferuje s výkonnosťou analýzy.

Na posúdenie interferencie vyplývajúcej z prípravy vzorky sa do DNA extrahovanej zo vzorky tkaniva FFPE z karcinómu močového mechúra vpravili dve exogénne zlúčeniny. Testované exogénne látky sú extrakčné roztoky, ktoré sa bežne používajú počas procesu extrakcie DNA a sú uvedené aj s testovanými množstvami v nasledujúcej tabuľke.

Testovacie roztoky sú komerčne dostupné v tzv. column-based súpravách na izoláciu DNA.

Tabuľka 9 Potenciálne interferujúce exogénne látky a koncentrácie testované vo FFPE

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

Na každú interferujúcu látku sa použitím analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx obohatenej o komplexný rakovinový panel (1,94 Mb) jednonásobnou metódou obohatenia testovalo osem technických replikátov, ktoré sa potom sekvenovali v prístroji NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx.

Pri oboch testovaných látkach splnilo všetkých osem vzoriek požiadavky na výkonnosť vzorky a nepozorovala sa žiadna interferencia vo výkone analýzy.

Krížová kontaminácia

Pomocou analýzy Illumina DNA Prep with Enrichment Dx sa na šachovnicovom usporiadaní doštičky testovali Coriell Cell Line gDNA NA12878 (ženské, 10 vzoriek), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (mužské, 12 vzoriek) a kontroly bez šablóny (NTC, no template controls; 2 vzorky). Pri všetkých vzorkách sa použilo odporúčané vstupné množstvo gDNA (1 000 ng) ako najprísnejšia podmienka hodnotenia krížovej kontaminácie. Testovanie vykonali dvakrát dvaja rôzni operátori. Pri 12-násobných reakciách obohatenia sa použil exómový panel 1 (45 Mb). Obohatené knižnice sa sekvenovali v prístroji NextSeq 550Dx s modulom DNA GenerateFASTQ Dx. Hodnotenie sa vykonalo posúdením pokrytia mužského chromozómu Y v ženských vzorkách porovnaním s podkladovými úrovňami plnej doštičky so ženskými vzorkami, ako aj reprezentáciou indexov NTC vzoriek.

Tabuľka 10 Výsledky krížovej kontaminácie

Ženské vzorky s pokrytím mužského chromozómu Y v $< 3 \times$ východiskovom šume	Reprezentácia indexov v NTC
100 %	$< 0,0005 \%$

Príloha: Illumina UD Indexes Adapter Sequences (sekvencie adaptérov indexov)

V doštičke sú umiestnené tieto adaptéry jedinečných duálnych (UD) indexov, aby podporili odporúčanú stratégiu párovania. Adaptéry indexov majú dĺžku 10 báz namiesto typických osem báz.

Adaptéry indexov 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Adaptéry indexov 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Táto sekvencia sa používa na čítanie 1 a čítanie 2 trimovania adaptérov.

CTGTCTCTTATACACATCT

Adaptéry indexov na doštičke A/v súprave 1

Názov indexu	i7 bázy v adaptéri	i5 bázy v adaptéri
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA

Názov indexu	i7 bázy v adaptéri	i5 bázy v adaptéri
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	TGCGTGTAC	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
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAACTGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA

Názov indexu	i7 bázy v adaptéri	i5 bázy v adaptéri
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	ACAGTTCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC

Názov indexu	i7 bázy v adaptéri	i5 bázy v adaptéri
UDP0078	CGCACTAATG	TGACTACATA
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGGT	CTCATAGCGA
UDP0083	GTAAGGCATA	AGACACATTA
UDP0084	GTCCACTTGT	GCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	CATGAGTACT
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	CATGTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Adaptéry indexov na doštičke B/v súprave 2

Názov indexu	i7 bázy v adaptéri	i5 bázy v adaptéri
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG

Názov indexu	i7 bázy v adaptéri	i5 bázy v adaptéri
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTTCGT
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	GGCCTGTCCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCATT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA

Názov indexu	i7 bázy v adaptéri	i5 bázy v adaptéri
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT

Názov indexu	i7 bázy v adaptéri	i5 bázy v adaptéri
UDP0165	CGAAGGTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGAT
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	GAGATGTGCA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTA

História revízií

Dokument	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 200019584 v02	September 2022	Pridal sa obsah na pomoc so sekvenovaním na prístroji NovaSeq 6000Dx.
Dokument č. 200019584 v01	Máj 2022	Pridali sa názvy sekvenovacích systémov a katalógové čísla. Odstránili sa informácie o jedinečnom duálnom indexovaní pre knižnice s jedným indexom.
Dokument č. 200019584 v00	Máj 2022	Úvodné vydanie.

Patenty a ochranné známky

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

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

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

SPOLOČNOSŤ ILLUMINA NEPREBERÁ ŽIADNU ZODPOVEDNOSŤ VYPLÝVAJÚCU Z NEBEZPEČNÉHO POUŽITIA TU UVÁDZANÝCH PRODUKTOV (VRÁTANE SÚČASTÍ ALEBO SOFTVÉRU).

© 2022 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

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

Kontaktné informácie



Illumina

5200 Illumina Way

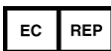
San Diego, California 92122 USA

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (okrem Severnej Ameriky)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Holandsko

Austrálsky zadávateľ

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Austrália

Označenie produktu

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