

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK
ENDAST FÖR EXPORT

Avsedd användning

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit är en uppsättning reagens och förbrukningsmaterial som används för att bereda provbibliotek från genomiskt DNA som extraherats från mänskliga celler och vävnad. Probpaneler som användaren tillhandahåller behövs för biblioteksberedning som riktar in sig på specifika genomiska områden av intresse. De genererade provbiblioteken är avsedda för användning på sekvenseringssystem från Illumina.

Grundläggande principer

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är avsedd för beredning av DNA-sekvenseringsbibliotek anrikade för målregioner från genomiskt DNA som extraherats från mänskliga celler och vävnad.

Biotinylerade oligonukleotidpaneler som tillhandahålls av användaren krävs för målanrikning. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är kompatibel med flera olika panelstorlekar, inklusive små paneler (< 20 000 prober) och stora paneler (> 200 000 prober). De genererade anrikade biblioteken är avsedda för sekvensering på sekvenseringssystem från Illumina.

Proceduren för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit består av följande steg:

- **Tagment Genomic DNA** (Tagmenterat genomiskt DNA) – Använder Enrichment BLT Small (eBLTS) för att tagmentera DNA-provet. Under tagmentering fragmenteras gDNA och taggas med adaptrar i ett enda steg. En minsta provmängd av DNA på 50 ng krävs för att mätta eBLTS i tagmenteringsreaktionen. När den är mättad fragmenterar eBLTS ett visst antal DNA-molekyler för att generera normaliserade bibliotek med en konsekvent fördelning av fragmentstorlekar.
- **Post Tagmentation Cleanup** (Rengöring efter tagmentering) – Renar det adaptermärkta DNA:t på eBLTS för att användas i amplifiering.
- **Amplify Tagmented DNA** (Amplifiera tagmenterat DNA) – Amplifierar det tagmenterade DNA:t med ett PCR-program med begränsad cykel. Unika dubbla (UD) index tillsätts i ändarna av DNA-fragmenten vilket möjliggör dubbel unik streckkodning av DNA-biblioteken och klustergenerering under sekvensering.
- **Clean Up Libraries** (Rena bibliotek) – Använder en magnetkuleringsprocedur för att rena och storleksselektera de amplifierade DNA-biblioteken.
- **Pool Libraries** (Poola bibliotek) – Kombinerar DNA-bibliotek med unika index i en pool med upp till tolv bibliotek. Du kan poola bibliotek efter volym eller massa.
- **Hybridize Probes** (Hybridisering av prober) – Består av en hybridiseringsreaktion under vilken de dubbelsträngade DNA-biblioteken denatureras och en panel av biotinylerade DNA-prober hybridiseras till målinriktade genomiska regioner.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är kompatibel med flera paneler. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit inkluderar inte en anrikningspanel. Probpåsar tillhandahålls av användaren och måste uppfylla de erforderliga specifikationerna. Reagens i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är kompatibla med paneler med anrikade DNA-oligonukleotider från både Illumina och tredjeparter som uppfyller de erforderliga specifikationerna. Information om de obligatoriska specifikationerna för paneler från en tredje part finns i [Krav på anrikningsprobpåsar på sidan 10](#).
- **Capture Hybridized Probes** (Samla in hybridiserade prober) – Använder Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) för att fånga de biotinylerade prober som är hybridiserade till målintresseområdet.
- **Amplify Enriched Libraries** (Amplifiera anrikade bibliotek) – Använder PCR för att amplifiera anrikade bibliotek.
- **Clean Up Amplified Enriched Libraries** (Rena amplifierade anrikade bibliotek) – Använder en magnetkulereningsprocedur för att rena de anrikade biblioteken som är redo för sekvensering.
- **Sequencing** (Sekvensering) – Sekvensering av de anrikade biblioteken utförs på sekvenseringssystemen MiSeqDx, NextSeq 550Dx eller NovaSeq 6000Dx. För MiSeqDx och NextSeq 550Dx används den integrerade DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module för konfiguration av sekvenseringskörningen, körningsövervakning och primär analys (FASTQ-generering från basbestämningar). För NovaSeq 6000Dx används DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application för konfiguration av körningen och sekundär analys med flera tillgängliga arbetsflöden.

Begränsningar

- För *in vitro*-diagnostiskt bruk.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är kompatibel med genomiskt DNA som extraherats från mänskliga celler och vävnad.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är kompatibel med prover med dubbelsträngat gDNA på 50–1 000 ng. Prestanda garanteras inte för prover utanför de här tröskelvärdena.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit inkluderar inte reagens för DNA-extraktion. De analytiska testresultaten, inklusive interferenstester, som tillhandahålls i [Prestandaegenskaper på sidan 57](#) har erhållits med helblod och FFPE som representativa provtyper med representativa DNA-extraktionssatser. Alla diagnostiska tester som utvecklats för att användas med reagens i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kräver fullständig validering för alla prestandaaspekter med det valda DNA-extraktionspaketet.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit rekommenderas inte för FFPE-prover av dålig kvalitet med $\Delta Cq > 5$. Användning av prover med $\Delta Cq > 5$ kan öka risken för att biblioteksberedningen misslyckas och minska analysprestanda.
- Reagens i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit har konfigurerats och testats för prover, anrikningsreaktioner och plexitet som anges i följande tabell.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Prover	Anrikningsreaktioner	Anrikningsplexitet
Sats med 16 prover	Låg kvalitet (FFPE)	16 reaktioner	1-plex
Sats med 96 prover	Hög kvalitet (t.ex. helblod)	8 reaktioner	12-plex

- FFPE-provbearbetning har testats och rekommenderas uteslutande för 1-plex-anrikningsreaktioner med användning av satsen med 16 prover.
- För satsen med 96 prover är icke-standardiserade plexiteter (2-plex till 11-plex) möjliga, men har följande begränsningar:
 - Bearbetning av prover i 2-plex- till 11-plex-anrikningsreaktioner minskar satsens genomströmning.
 - Optimala resultat kan inte garanteras. Det kan krävas ytterligare optimering för att erhålla lämplig anrikningsavkastning för icke-standardiserade plexiteter.
 - För poolningsstrategier med låg plexitet (2-plex till 8-plex) krävs val av indexadaptrar med olika sekvenser för att optimera färgbalansen för framgångsrik sekvensering och dataanalys. DNA GenerateFASTQ Dx-modulen på MiSeqDx och NextSeq 550Dx har alternativ för färgbalanserade indexkombinationer under konfiguration av en körning. Mer information om poolingstrategier finns i [Poolningsmetoder på sidan 33](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit kan endast leverera anrikade bibliotek som är sekvenserade på MiSeqDx, NextSeq 550Dx och NovaSeq 6000Dx. Användning av andra sekvenseringssystem kräver full validering för alla prestandaaspekter.
- Anrikningspaneler ingår inte som en del av den här produkten. De analytiska testresultaten som tillhandahålls i [Prestandaegenskaper på sidan 57](#) har erhållits med representativa anrikningspaneler och tillhandahålls endast i informationssyfte. De analytiska prestandaegenskaperna exemplifierar analysens allmänna kapacitet och fastställer inte kapaciteten eller lämpligheten för specifika analyskrav. Alla diagnostiska tester som utvecklats för att användas med dessa reagens kräver fullständig validering för alla prestandaaspekter.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är kompatibel med anrikningspaneler från både Illumina och tredje parter. Om anrikningspaneler från tredje part som inte uppfyller panelkraven används kan dock inte prestanda garanteras. Information om panelkrav finns i [Krav på anrikningsprobpaneler på sidan 10](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit har en hybridiseringstid på två timmar. Att använda en längre hybridiseringstid kan påverka prestandamåtten.
- DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager-modulerna för MiSeqDx och NextSeq 550Dx skapar endast FASTQ-filer. Om du använder modulerna måste du utföra sekundär analysvalidering.
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application är tillgänglig på NovaSeq 6000Dx. Applikationen stöder flera sekundära analysarbetsflöden, inklusive FASTQ-generering, FASTQ- och VCF-

generering för detektion av könsellsvarianter och FASTQ- och VCF-generering för detektion av somatiska varianter. Om du använder applikationen för VCF-generering behöver du inte utföra sekundär analysvalidering.

- Information om begränsningar för DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application när den används med NovaSeq 6000Dx finns i *NovaSeq 6000Dx Instrument Package Insert (Bipacksedel för instrumentet NovaSeq 6000Dx) (dokumentnr 200025276)*.

Produktkomponenter

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit består av följande komponenter:

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

Reagens som tillhandahålls

Att slutföra Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kräver Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A eller Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Du kan utföra följande antal biblioteksberedningar och anrikningsreaktioner med en sats med 16 eller 96 prover.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Prover	Anrikningsreaktioner	Anrikningsplexitet
Sats med 16 prover	Låg kvalitet (FFPE)	16 reaktioner	1-plex
Sats med 96 prover	Hög kvalitet (t.ex. helblod)	8 reaktioner	12-plex

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx med UD-indexuppsättning A/B

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, förvara vid 15 °C till 30 °C

Följande reagens levereras vid rumstemperatur. Förvara omedelbart reagensen i den angivna temperaturen för att säkerställa korrekt prestanda.

Reagensnamn	Antal rör		Färg på locket	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser
	16 prover (nr 20050020)	96 prover (nr 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Röd	350 µl	Rengöringsmedelslösning i vatten.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Grön	41 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller rengöringsmedel och salt.
Cleanup Beads (CB)	1	Ej tillämpligt*	Röd	10 ml	Paramagnetiska kulor, i fast fas, i buffrad vattenbaserad lösning.

* Cleanup Beads för 96 prover är inkluderade i Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (nr 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 Samples), förvara vid 15 °C till 30 °C

För satser med 96 prover är Cleanup Beads inkluderade i Illumina Prep Dx Cleanup Beads (katalognr 20050030). Följande reagens levereras vid rumstemperatur. Förvara omedelbart reagensen i den angivna temperaturen för att säkerställa korrekt prestanda. För satser med 16 prover är Cleanup Beads inkluderade i Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (katalognr 20050020).

Reagensnamn	Antal	Färg på locket	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser
Cleanup Beads (CB)	4	Röd	10 ml	Paramagnetiska kulor, i fast fas, i buffrad vattenbaserad lösning.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 2, förvara vid 2 °C till 8 °C

Följande reagens levereras kylda. Förvara omedelbart reagensen i den angivna temperaturen för att säkerställa korrekt prestanda. Förvara rör med eBLTS upprätt så att magnetkulorna alltid är nedsänkta i bufferten.

Reagensnamn	Antal rör		Färg på locket	Fyllnadsvolym		Aktiva ingredienser
	16 prover (nr 20050021)	96 prover (nr 20050026)		16 prover	96 prover	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Gul	200 µl	290 µl	Streptavidin Magnetic Beads kopplade till transposomer i buffrad vattenbaserad lösning innehållande glycerol, EDTA, ditiotreitol, salt och rengöringsmedel.
Resuspensionsbuffert (RSB)	1	4	Transparent	1,8 ml	1,8 ml	Buffrad vattenbaserad lösning.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, förvara vid –25 °C till –15 °C

Följande reagens skickas frysta. Förvara omedelbart reagensen i den angivna temperaturen för att säkerställa korrekt prestanda.

Reagensnamn	Antal rör		Färg på locket	Fyllnadsvolym		Aktiva ingredienser
	16 prover (nr 20050022)	96 prover (nr 20050027)		16 prover	96 prover	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Transparent	290 µl	290 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller magnesiumsalt och dimetylformamid.

Reagensnamn	Antal rör		Färg på locket	Fyllnadsvolym		Aktiva ingredienser
	16 prover (nr 20050022)	96 prover (nr 20050027)		16 prover	96 prover	
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Transparent	200 µl	610 µl	DNA-polymeras och dNTP:er i buffrad vattenbaserad lösning.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 samples), förvara vid 2 °C till 8 °C

För satser med 16 prover ingår följande reagens i Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr 20050023). För satser med 96 prover ingår reagensen i Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr 20050028).

Följande reagens levereras kylda. Förvara omedelbart reagensen i den angivna temperaturen för att säkerställa korrekt prestanda.

Reagensnamn	Antal rör	Färg på locket	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Transparent	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads (Magnetiska streptavidinkulor) i en buffrad vattenbaserad lösning som innehåller formamid, rengöringsmedel och salt.
Resuspensionsbuffert (RSB)	1	Transparent	1,8 ml	Buffrad vattenbaserad lösning.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Transparent	200 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller rengöringsmedel och salt.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Transparent	200 µl	Buffrad vattenbaserad lösning.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 samples), förvara vid 2 °C till 8 °C

För satser med 96 prover ingår följande reagens i Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr 20050028). För satser med 16 prover ingår reagensen i IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (katalognr 20050023).

Följande reagens levereras kylda. Förvara omedelbart reagensen i den angivna temperaturen för att säkerställa korrekt prestanda.

Reagensnamn	Antal rör	Färg på locket	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Transparent	1,2 ml	Streptavidin Magnetic Beads (Magnetiska streptavidinkulor) i en buffrad vattenbaserad lösning som innehåller formamid, rengöringsmedel och salt.
Resuspensionsbuffert (RSB)	4	Transparent	1,8 ml	Buffrad vattenbaserad lösning.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Transparent	200 µl	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller rengöringsmedel och salt.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Transparent	200 µl	Buffrad vattenbaserad lösning.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, förvara vid 25 °C till 15 °C

Följande reagens skickas frysta. Förvara omedelbart reagensen i den angivna temperaturen för att säkerställa korrekt prestanda.

Reagensnamn	Antal rör		Färg på locket	Fyllnadsvolym	Aktiva ingredienser
	16 prover (nr 20050024)	96 prover (nr 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Transparent	580 µl	Rengöringsmedelslösning i vatten.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Bärnstensfärgat	4,1 ml	Buffrad vattenbaserad lösning som innehåller salt och rengöringsmedel.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Transparent	320 µl	PCR-primerblandning (oligonukleotider).
2N NaOH (HP3)	1	1	Transparent	200 µl	2 N natriumhydroxidlösning (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Blå	480 µl	Buffrad vattenbaserad lösning med Cot-1 DNA, trängselmedel och formamid.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Transparent	200 µl	DNA-polymeras och dNTP:er i buffrad vattenbaserad lösning.

Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, förvara vid -25 °C till -15 °C

Följande reagens skickas frysta. Förvara omedelbart reagensen i den angivna temperaturen för att säkerställa korrekt prestanda. Information om indexadaptersekvenser finns i [Bilaga: Adaptersekvenser för UD-index från Illumina på sidan 60](#).

Komponent	Antal
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 Indexes), nr 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 Indexes), nr 20050039	1

Reagens som inte tillhandahålls

Nödvändiga reagens som inte tillhandahålls

- DNA-extraktion och reningsreagens
- Reagens för DNA-kvantifiering
- Etanol (200 proof för molekylärbiologi)
- Nukleasfritt vatten
- 1 M Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,5–8,5
- 1 N NaOH-lösning, molekylärbiologisk kvalitet
- Vid användning av sekvenseringssystemet NextSeq 550Dx:
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (katalognr 20028871)
- Vid användning av sekvenseringssystemet MiSeqDx:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (katalognr 20037124)
- Vid användning av sekvenseringssystemet NovaSeq 6000Dx:
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (katalognr 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (katalognr 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalognr 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalognr 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalognr 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (katalognr 20062291)

Krav på anrikningsprobpaneler

Reagens i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är kompatibla med paneler med anrikade DNA-oligonukleotider från både Illumina och tredjeparter. Om du använder biotinylerade DNA-prober från tredje part (fasta eller anpassade paneler) ska du säkerställa att de uppfyller de nödvändiga specifikationerna.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit har optimerats och validerats med följande specifikationer för paneler från tredje part. Jämförbar prestanda kan inte garanteras vid användning av tredjepartspaneler som inte uppfyller specifikationerna.

- Problängd på 80 bp eller 120 bp
- Mellan 500 och 675 000 prober
- Enkel- eller dubbelsträngat DNA
- Total probmängd på ≥ 3 pmol för anrikning vid plexiteter från 1-plex till 12-plex

Förvaring och hantering

- Rumstemperatur definieras som 15 °C till 30 °C.
- Reagensen är stabila när de förvaras enligt anvisningarna och fram till det angivna utgångsdatumet på satsens etiketter. Information om förvaringstemperaturer finns i [Reagens som tillhandahålls på sidan 4](#).
- Frusna reagens är stabila i högst fyra cykler av frysning/tining som utförs före angivet utgångsdatum.
- Proceduren för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit har följande säkra stoppunkter:
 - Efter [Amplifiera tagmenterat DNA på sidan 28](#) är de amplifierade biblioteken stabila i upp till 30 dagar när de förvaras vid –25 °C till –15 °C.
 - Efter [Rena bibliotek på sidan 31](#) är de amplifierade renade biblioteken stabila i upp till 30 dagar när de förvaras vid –25 °C till –15 °C.
 - Efter [Poola föranrikade bibliotek på sidan 33](#) är de poolade biblioteken stabila i upp till 30 dagar när de förvaras vid –25 °C till –15 °C.
 - Efter [Amplifiera anrikat bibliotek på sidan 43](#) kan den anrikade, amplifierade biblioteksplattan ligga kvar på termocyklern i upp till 24 timmar. Alternativt kan plattan förvaras vid 2 °C till 8 °C i upp till 48 timmar.
 - De slutliga renade anrikade biblioteken är stabila i upp till sju dagar när de förvaras vid –25 °C till –15 °C.
- Kontakta Illuminas kundtjänst om förpackningarna till eller innehållet i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är skadade eller öppnade.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) kan bilda synliga fällningar eller kristaller. Om fällningar observeras ska du värma den till 37 °C i tio minuter och sedan vortexblanda tills fällningarna löses upp.
- Hybridization Oligos (HYB) och Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) måste förvärmas till samma temperatur som hybridiseringshålltemperaturen som gäller per provtyp och probpanel. Mer information om hantering av NHB2 och EEW finns i [Metodanmärkingar på sidan 16](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) och HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) kan utveckla kristaller och grumlighet. Om kristaller och grumlighet observeras ska lösningen vortexblandas eller blandas genom pipettering tills den har klarnat. Förvärm NHB2 innan pipettering.
- Använd följande bästa praxis vid hantering av Cleanup Beads (CB):
 - Frys aldrig magnetkulorna.
 - Omedelbart före användning ska magnetkulorna vortexblandas tills de är resuspenderade och färgen är homogen.
- Använd följande bästa praxis när du hanterar Enrichment BLT Small (eBLTS):
 - Förvara eBLTS-röret upprätt så att magnetkulorna alltid är nedsänkta i bufferten.
 - Vortexblanda eBLTS noggrant tills magnetkulorna är resuspenderade. För att undvika omplacering av magnetkulorna rekommenderas inte centrifugering före pipettering.
 - Om magnetkulorna fastnar på sidan eller toppen av en platta med 96 brunnar ska du centrifugera vid 280 × g i tre sekunder och sedan pipettera för att resuspendera.

- Använd följande bästa praxis när du hanterar indexadapterplattor:
 - Lägg inte till prover på indexadapterplattan.
 - Brunnarna på indexplattan får endast användas en gång.

Nödvändig utrustning och material – tillhandahålls inte

Utöver Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit behöver du även nödvändig utrustning och material innan du startar protokollet.

Utrustning

Kontrollera att du har den utrustning som behövs innan du startar protokollet.

Protokollet har optimerats och validerats med hjälp av objekt med de angivna specifikationerna. Jämförbar prestanda kan inte garanteras vid användning av utrustning med andra specifikationer.

Vissa artiklar krävs endast för specifika arbetsflöden. De artiklarna anges i separata tabeller.

- Termocykler med följande specifikationer:
 - Uppvärm lock
 - Lägsta temperaturkontrollområde på 10 °C till 98 °C
 - Minsta temperaturnoggrannhet på $\pm 0,25$ °C
 - Maximal reaktionsvolym på 100 μ l
 - Kompatibel med PCR-plattor med hög kant och 96 brunnar
- Mikroprovsinkubator med följande specifikationer:
 - Temperaturintervall för rumstemperatur +5,0 °C till 99,0 °C
 - Kompatibel med MIDI-plattor med 96 brunnar
- Mikroprovsinkubatorinsatser som är kompatibla med MIDI-plattor med 96 brunnar
- En höghastighetsskakapparat för mikroplattor med ett hastighetsintervall vid blandning på 200–3 000 rpm
- Ett magnetiskt stativ som är kompatibelt med PCR-plattor med 96 brunnar
- Ett magnetiskt stativ som är kompatibelt med MIDI-plattor med 96 brunnar
- En fluorescensläsare som är kompatibel med din kvantifieringsmetod
- DNA-fragmentanalysator
- Precisionspipetter:
 - Enkanalspipetter eller flerkanalspipetter, 10 μ l
 - Enkanalspipetter eller flerkanalspipetter, 20 μ l
 - Enkanalspipetter eller flerkanalspipetter, 200 μ l

- Enkanalspipetter, 1 000 µl
- Precisionspipetter säkerställer korrekt reagens- och provöverföring. En- eller flerkanaliga pipetter kan användas om de kalibreras regelbundet och har en exakthet på inom 5 % av angiven volym.
- Centrifug för mikroplattor
- Mikrocentrifug
- Ett av följande sekvenseringssystem från Illumina:
 - MiSeqDx Instrument, katalognr DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx Instrument, katalognr 20005715
 - NovaSeq 6000Dx Instrument, katalognr 20068232
- [Valfritt] Vakuumpkoncentrator
- [FFPE] Realtids-PCR-detektionssystem

Material

Kontrollera att du har det material som behövs innan du startar protokollet.

Vissa artiklar krävs endast för specifika arbetsflöden. De artiklarna anges i separata tabeller.

Protokollet har optimerats och validerats med hjälp av de listade objekten. Jämförbar prestanda kan inte garanteras vid användning av andra material.

- Filttrade pipettspetsar
- Koniska centrifugrör, 15 ml eller 50 ml
- Mikrocentrifugrör, 1,5 ml
- RNas-/DNas-fria flerkanalreagensbehållare, för engångsbruk
- RNas-/DNas-fria 8-rörremсор och lock
- Serologiska pipetter
- Deepwell-förvaringsplatta i polypropylen med 96 brunnar, 0,8 ml (MIDI-platta)
- Hårda PCR-plattor med hög kant och 96 brunnar
- [FFPE] qPCR-plattor som är kompatibla med qPCR-instrument
- Självhäftande förseglingar för plattor med 96 brunnar med följande specifikationer:
 - Avdragbar, transparent polyester
 - Passar PCR-plattor med krage
 - Starkt häftämne som motstår flera temperaturförändringar inom intervallet -40 °C till 110 °C
 - DNas-/RNas-fria
- Förbrukningsvaror i plast som är kompatibla med valfri kvantifieringsmetod

- En fluorometrisk dsDNA-kvantifieringssats som är kompatibel med valfritt kvantifieringssystem:
 - En kvantifieringssats med bred räckvidd kan användas för att kvantifiera föranrikade amplifierade bibliotek.
 - Vid kvantifiering av anrikade bibliotek beror kvantifieringssatsens räckvidd på probpanelen som används.
- En fragmentanalyssats för bibliotekskvalificering med valfritt kvalifikationssystem:
 - Satsen med bred räckvidd kan användas för att kvalificera föranrikade amplifierade bibliotek.
 - Vid kvalificering av anrikade bibliotek beror kvalificeringssatsens räckvidd på probpanelen som används.
- **[Valfritt]** Sats för DNA-extraktion från mänskliga celler och vävnad. Du kan använda alla validerade extraktionsmetoder.

Insamling, transport och förvaring av prover



FÖRSIKTIGHET!

Hantera alla prover som potentiellt smittsamma ämnen.

- Den här analysen är kompatibel med genomiskt DNA som extraherats från mänskliga celler och vävnad.
- För kommersiellt tillgängligt renat gDNA ska du säkerställa att proverna har transporterats under korrekta förhållanden och förvarats enligt tillverkarens instruktioner. Följ bästa praxis för förvaring och cykler av frysning/tinning av gDNA.
- För helblod ska du följa kraven för insamling, transport och förvaring av blod som gäller för den valda DNA-extraktionsmetoden. Alla validerade extraktionsmetoder kan användas. Transport av helblod måste följa nationella, federala, delstatliga och lokala föreskrifter för transport av etiologiska agens.
- För extraktion av DNA från FFPE-vävnad kan vilken validerad extraktionsmetod som helst användas. Följ anvisningarna och rekommendationerna som gäller för den valda extraktionsmetoden för att fastställa följande praxis:
 - Formalinfixerings- och paraffinbäddningsmetod för vävnader för att säkerställa bästa kvalitet på extraherat DNA.
 - Förvaring av FFPE-prover.
 - Kraven på utgångsmaterial, som antal och tjocklek på FFPE-sektionerna. De flesta reningsmetoder rekommenderar att du använder nyligen skurna sektioner.

Varningar och försiktighetsåtgärder

- Reagens i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit innehåller potentiellt farliga kemikalier. Personskador kan uppstå vid inandning, intagande, hudkontakt och ögonkontakt. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och en laboratorierock som lämpar sig för den här graden av exponering. Hantera använda reagens som kemiskt avfall och kassera dem i enlighet med nationella och lokala bestämmelser. Ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet finns i säkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html.
- Hantera alla blodprover som om de vore känt smittsamma med humant immunbristvirus (HIV), humant hepatit B-virus (HBV) och annan blodburen smitta (allmänna försiktighetsåtgärder).
- Arbeta enligt vedertagna laboratorierutiner. Använd inte pipetten med munnen. Ät inte, drick inte och rök inte på angivna arbetsområden. Använd engångshandskar och laboratorierockar vid hantering av prover och reagenssatser. Tvätta händerna noga efter hantering av prover och reagenssatser.
- Förhindra att prover eller reagens bryts ned genom att säkerställa att ångor från den natriumhypoklorit som används vid städning skingras fullständigt innan protokollet påbörjas.
- Kontaminering av proverna med andra PCR-produkter/amplikoner kan orsaka felaktiga och opålitliga resultat. Använd följande bästa praxis för att undvika kontaminering:
 - Använd god laboratoriesed och laboratoriehygien.
 - Utför arbetsflödesstegen i tillämpliga pre-amplifierings- och post-amplifieringsområden.
 - Förvara använda reagens innan du renar bibliotek i ett pre-amplifieringsområde.
 - Separera pre-amplifieringsreagens från post-amplifieringsreagens.
 - Säkerställ att områdena som används före och efter amplifiering ha sin egen utrustning, som pipetter, pipettspetsar, vortexblandare och centrifug.
- Undvik korskontaminering. Använd nya pipettspetsar mellan prover och mellan dispensering av reagens. Genom att använda filterspetsar minskar risken för överföring mellan amplikoner och korskontaminering från prov till prov.
 - Byt spets mellan varje prov när du tillsätter eller överför prover eller reagensmasterblandningar.
 - Byt spets mellan varje rad eller kolumn när du tillsätter indexadapterar med en flerkanalpipett. Om du använder en enkanalspipett ska du byta spets mellan varje prov.
 - Avlägsna oanvända indexadapterplattor från arbetsområdet.
- Använd följande bästa praxis för tvättsteg med etanol:
 - Förbered alltid färsk 80 % etanol. Etanol kan absorbera vatten från luften, vilket kan påverka resultaten.
 - Säkerställ att all etanol avlägsnas från botten av brunnarna under tvättsteg. Etanolrester kan påverka resultaten.
 - Följ den angivna torktiden för stegen med det magnetiska stativet för att säkerställa fullständig avdunstning. Etanolrester kan påverka resultatet i efterföljande reaktioner.
- Förbered alltid masterblandningar före användning och förvara aldrig de kombinerade arbetslösningarna.

- Prestanda för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit garanteras inte när procedurerna inte följs enligt beskrivningen i bipacksedeln.
- Använd inte några satskomponenter efter det utgångsdatum som anges på satsens etikett.
- Byt inte ut satskomponenter från olika Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-satser. Satser identifieras på satsens etikett.

Metodanmärkingar

Rekommendationer DNA-prover

Protokollet för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är kompatibelt med högkvalitativt, dubbelsträngat genomiskt DNA (gDNA) på 50–1 000 ng.

Säkerställ att det initiala gDNA-provet inte innehåller > 1 mM EDTA och är fritt från organiska föroreningar, som fenol och etanol. Den typen av substanser kan störa tagmenteringsreaktionen och resultera i analysfel.

gDNA-prov \geq 50 ng

För gDNA-prov mellan 50–1 000 ng krävs det inte kvantifiering och normalisering av det initiala gDNA-provet.

gDNA-prov < 50 ng

DNA-prov på 10–50 ng kan användas med följande justeringar:

- Om du använder ett 10–49 ng gDNA-prov rekommenderas det att kvantifiera det initiala gDNA-provet för att bestämma antalet PCR-cykler som krävs efter tagmentering. Använd en fluorometribaserad metod för att kvantifiera dubbelsträngade gDNA-prov. Undvik metoder som mäter total nukleinsyra, som NanoDrop eller andra UV-absorbansmetoder.
- Det här protokollet normaliserar inte slutliga föranrikade biblioteksavkastningar från 10–49 ng gDNA och därför krävs kvantifiering och normalisering av bibliotek före och efter anrikning.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit har karakteriserats och verifierats för DNA-prover på 50–1 000 ng. Motsvarande produktprestanda kan inte garanteras för gDNA-prover < 50 ng.

Rekommendationer för blod

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är kompatibel med gDNA extraherat från perifert helblod. Alla validerade extraktionsmetoder kan användas. När gDNA extraheras från helblod krävs ingen initial kvantifiering av DNA och Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit producerar normaliserade föranrikade biblioteksavkastningar.

Följande faktorer kan negativt påverka mängden DNA som erhålls från helblodsprover och därmed normaliseringen av bibliotek:

- Blodprovets ålder

- Förvaringsförhållanden
- Underliggande medicinska tillstånd som påverkar antalet vita blodkroppar

Rekommendationer för FFPE-vävnadsprover

Använd följande FFPE DNA-kvalitetskriterier för att bestämma lämpliga prover för framgångsrik biblioteksberedning:

- För FFPE-prover med ett ΔCq -värde på ≤ 5 är det rekommenderade DNA-provet 50–1 000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx rekommenderas inte för FFPE-prover av dålig kvalitet med $\Delta Cq > 5$. Det är möjligt att använda prover med $\Delta Cq > 5$, men det kan öka risken för att biblioteksberedningen misslyckas eller minska analysprestanda.

FFPE-extraktion

Använd en metod för isolering av nukleinsyra som ger hög återhämtningsavkastning, minimerar provförbrukningen och bevarar provets integritet. Du kan använda alla validerade metoder för DNA-extraktion från FFPE-prover. För gDNA extraherat från FFPE-vävnad krävs initial kvantifiering av DNA-prover och Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit producerar inte normaliserade föranrikade biblioteksavkastningar.

Kvalificering av DNA från FFPE

Det gDNA som extraheras från FFPE-vävnad ska kvalificeras före användning. För optimala prestanda ska DNA-provets kvalitet utvärderas med en validerad extraktionsmetod för kvalificering av DNA extraherat från FFPE-prover. Protokoll för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är kompatibelt med FFPE DNA-prover med ett ΔCq -värde på ≤ 5 . Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit rekommenderas inte för FFPE-prover av dålig kvalitet med $\Delta Cq > 5$. Det är möjligt att använda prover med $\Delta Cq > 5$, men det kan öka risken för att biblioteksberedningen misslyckas eller minska analysprestanda.

[Valfritt] FFPE-referensprov

Använd karakteriserade referensmaterial som Horizon HD799 (DNA) som en positiv kontroll när du utför protokollet. Kvalificerade FFPE-material från cellinjehärledda xenotransplantat kan också användas som referensprov. Använd en fluorometribaserad metod för att kvantifiera referensmaterial före användning.

OBS! Om ett positivt kontrollreferensprov eller en negativ kontroll körs förbrukas reagens och det totala antalet okända prover som kan bearbetas minskar.

Rekommendationer för prover

Provmängdsrekommendationerna för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sammanfattas i följande tabell.

Tabell 1 Rekommendationer för prover

Typ av prov	Provmängd	Krävs kvantifiering av DNA	Obligatorisk kvalitet för DNA	Normaliserad föranrikad biblioteksavkastning
gDNA	10–49 ng	Ja	260/280 förhållande av 1,8–2,0	Nej
gDNA	50–1 000 ng	Nej	260/280 förhållande av 1,8–2,0	Ja
gDNA från blod	50–1 000 ng	Nej	260/280 förhållande av 1,8–2,0	Ja
gDNA från FFPE	50–1 000 ng	Ja	ΔCq -värde på ≤ 5	Nej

De rekommenderade PCR-cyklerna för eBLTS PCR-programmet justeras baserat på provkoncentration och kvalitet. Mer information finns i [Amplifiera tagmenterat DNA på sidan 28](#).

Tips och tekniker

Undvika korskontaminering

- Byt spets mellan *varje prov* när du tillsätter eller överför prover.
- Byt spets mellan *varje rad* eller *kolumn* när du tillsätter indexadaptrar med en flerkanalspipett. Om du använder en enkanalspipett ska du byta spets mellan varje prov.

Försegla plattan

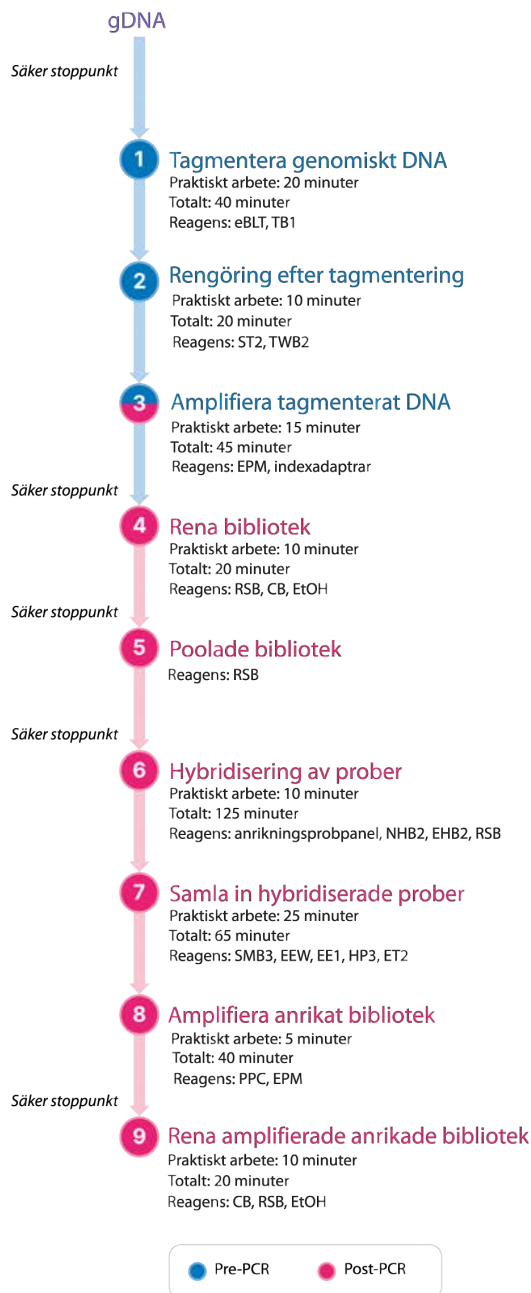
- Försegla alltid plattan med 96 brunnar med en ny självhäftande försegling med hjälp av en gummirulle så att plattan är täckt innan följande steg i protokollet:
 - Skakningssteg
 - Inkubationssteg Om plattan inte förseglas ordentligt kan det leda till avdunstning under inkubationen.
 - Centrifugeringssteg
 - Hybridiseringssteg
- Kontrollera att kanterna och brunnarna är fullständigt förseglade för att reducera risken för korskontaminering och avdunstning.
 - Om vätska eller kondens observeras på förseglingen eller plattbrunnarnas sidoväggar ska du centrifugera efter behov innan förseglingen bryts.
- Placera plattan på en plan yta innan du långsamt tar bort förseglingen.

Hantera Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Förvara rör med eBLTS upprätt i kylskåpet så att magnetkulorna alltid är nedsänkta i bufferten.
- Vortexblanda röret med eBLTS noggrant tills magnetkulorna är resuspenderade omedelbart före användning. För att undvika omplacering av magnetkulorna rekommenderas inte centrifugering före pipettering.
- Om magnetkulorna fastnar på sidan eller toppen av en platta med 96 brunnar ska du centrifugera vid $280 \times g$ i tre sekunder och sedan pipettera för att resuspendera.
- Vid tvätt av eBLTS:
 - Använd ett magnetiskt stativ som är lämpligt för plattan.
 - Låt plattan stå på det magnetiska stativet tills anvisningarna hänvisar till att avlägsna den.
 - Om magnetkulorna aspireras in i pipettspetsarna ska du dispensera magnetkulorna tillbaka till plattan på det magnetiska stativet och vänta tills vätskan är klar (cirka två minuter).

Arbetsflöde för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Följande diagram illustrerar Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-arbetsflödet. Säkra stoppunkter mellan stegen är markerade. Tidsuppskattningar baseras på bearbetning av tolv prover vid 12-plex-anrikning.



Bruksanvisning

Det här kapitlet beskriver protokollet för Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Granska det planerade kompletta arbetsflödet för sekvensering, från prov till analys, för att säkerställa kompatibilitet mellan produkter och experimentets parametrar.
- Bekräfta satsens innehåll och se till att du har nödvändiga komponenter, utrustning och material innan du fortsätter.
 - Biotinylerade prober från en tredje part måste uppfylla specifika krav. Läs [Krav på anrikningsprobpaneler på sidan 10](#) för att säkerställa att dina tredjepartsprober uppfyller kraven.
- Följ protokollet i angiven ordning och använd angivna volymer och inkubationsparametrar.
- Om en säker stoppunkt inte har specificerats i protokollet fortsätter du direkt till nästa steg.
- När du skapar en masterblandning ingår ett överskott i de angivna volymerna.
- Se till att använda ett magnetiskt stativ som är lämpligt för den typ av platta som du använder.

Förberedelser för poolning

Det här steget krävs för att säkerställa framgångsrik sekvensering av anrikade bibliotek. Poolning av bibliotek kan utföras före anrikning och före sekvensering.

Prior to enrichment (Före anrikning) – Individuella indexerade amplifierade bibliotek poolas för anrikning med den valda probpanelen. Det skapar en multiplexerad pool av anrikade bibliotek. FFPE-provbearbetning har testats och rekommenderas uteslutande för 1-plex-anrikningsreaktioner. För högkvalitativt gDNA har 12-plex testats, men 2-plex till 11-plex är möjliga.

Prior to sequencing (Före sekvensering) – 1-plex-anrikade bibliotek och/eller multiplexanrikade bibliotek poolas tillsammans före sekvensering. Antalet anrikade bibliotek som kan sekvenseras beror på målavläsningsdjupet för varje prov i sekvenseringssystemet.

Unik dubbel indexering

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit använder unika dubbla index.

- Dubbelindexerade bibliotek lägger till index 1 (i7)- och index 2 (i5)-sekvenser för att generera unikt taggade bibliotek.
- UD-index har distinkta, orelaterade indexsekvenser för i7- och i5-indexavläsningar. Index är tio baser långa.

Att välja indexadapterar med olika sekvenser för poolade bibliotek optimerar färgbalansen för framgångsrik sekvensering och dataanalys. Plexitetspooler som är ≥ 10 -plex är i sig färgbalanserade, vilket betyder att du kan använda vilken kombination av indexadapter som helst. Under din sekvenseringskörning tillhandahåller DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module alternativ för färgbalanserade indexkombinationer och meddelar dig om det inte finns tillräcklig mångfald i de valda indexkombinationerna.

Information om UD-indexadaptersekvenser från Illumina och plattlayouter finns i [Bilaga: Adaptersekvenser för UD-index från Illumina på sidan 60](#).

Anrikningsplexiteter som stöds

Reagens i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är konfigurerade och testade vid anrikningsplexiteter på 1-plex och 12-plex. Även om andra anrikningsplexiteter är möjliga kräver vissa plexiteter ytterligare föranrikningsbiblioteksberedning och anrikningsprobpanelreagens.

Det kan krävas ytterligare optimering för att erhålla lämplig anrikningsavkastning för icke-standardiserad anrikningsplexitet. Optimala resultat kan inte garanteras.

- **Enrichment plexity** (Anrikningsplexitet) – Antalet föranrikade bibliotek (1–12) som poolas i en anrikningsreaktion för hybridisering med anrikningsprobpanelerna. Till exempel, att kombinera tolv föranrikade bibliotek tillsammans skapar en 12-plex-anrikningspool.
- **Enrichment reaction** (Anrikningsreaktion) – Antalet unika anrikningsreaktionsberedningar, oavsett antalet föranrikade bibliotek som poolats per reaktion. Till exempel kan en enda anrikningsreaktion bereda en 1-plex- eller 12-plex-anrikningspool.

Beräkna det totala antalet post-anrikade bibliotek genom att multiplicera anrikningsplexiteten per reaktion med antalet anrikningsreaktioner. Till exempel producerar en enda anrikningsreaktion av en 12-plex-anrikningspool en pool av tolv post-anrikade bibliotek.

Vid poolning av föranrikade bibliotek stödjer Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit-reagens följande anrikningsreaktioner och plexitet.

Reagens i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Anrikningsreaktioner	Anrikningsplexitet
Sats med 16 prover	16 reaktioner	1-plex
Sats med 96 prover	8 reaktioner	12-plex

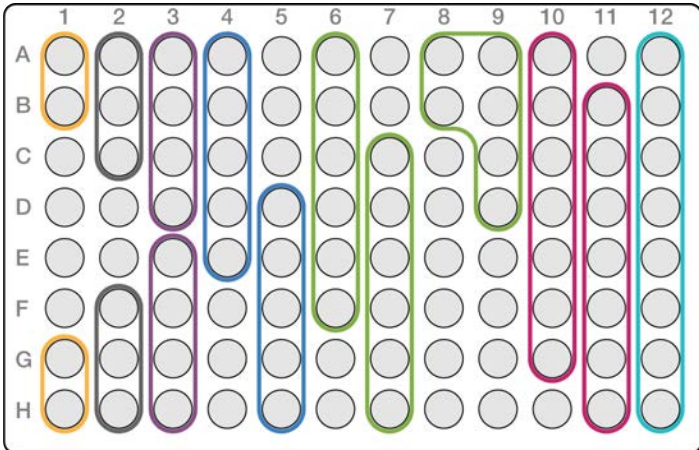
Poolningsstrategier för 2-plex till 8-plex

Följande tabell visar indexadaptrar (brunnar) som kan kombineras i en 2–8-plex-pool och den färgkodade bilden visar varje kombination.

Poola vilken plexitet som helst ≥ 2 från toppen eller botten av en kolumn. Poola inte över en rad.

Plexitet	Kombinationer	Färg i bilden
2	De två första eller två sista brunnarna i en kolumn: <ul style="list-style-type: none"> • A och B • G och H Raderna C–F används inte.	Orange

Plexitet	Kombinationer	Färg i bilden
3	De tre första eller sista tre brunnarna i en kolumn: <ul style="list-style-type: none"> • A–C • F–H Raderna D och E används inte.	Grå
4	De första fyra eller sista fyra brunnarna i en kolumn: <ul style="list-style-type: none"> • A–D • E–H 	Lila
5	De första fem eller sista fem brunnarna i en kolumn: <ul style="list-style-type: none"> • A–E • D–H 	Blå
6	[Alternativ 1] De första sex eller sista sex brunnarna i en kolumn: <ul style="list-style-type: none"> • A–F • C–H [Alternativ 2] De två första brunnarna (A och B) eller de två sista brunnarna (G och H) i en kolumn och vilka fyra brunnar som helst i en angränsande kolumn.	Grön
7	De första sju eller sista sju brunnarna i en kolumn: <ul style="list-style-type: none"> • A–G • B–H 	Rosa
8	Hela kolumnen.	Blågrön

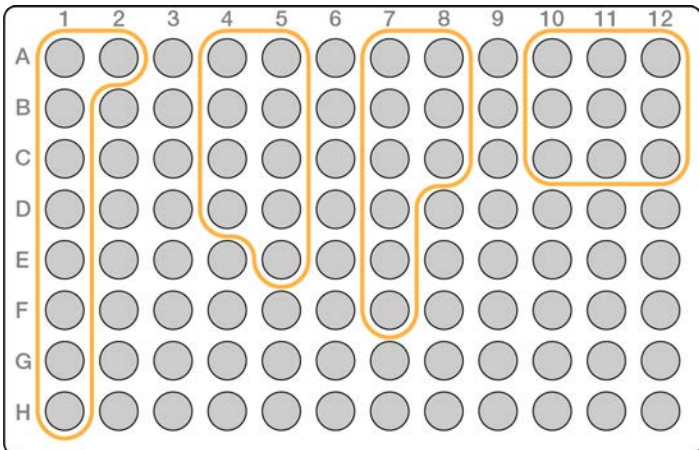


Poolningsstrategier för 9-plex

Använd indexadapterar från alla brunnar som optimerar färgbalansen i en sekvenseringskörning, till exempel:

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

Följande bild visar alla fyra exempel.



Tagmentera genomiskt DNA

Det här steget använder Enrichment BLT Small (eBLTS) för att tagmentera DNA, vilket är en process som fragmenterar och taggar DNA:t med adaptersekvenser.

Förbrukningsmaterial

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (gult lock)

- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Nukleasfritt vatten
- PCR-platta med 96 brunnar
- Självhäftande försegling
- Mikrocentrifugrör, 1,7 ml
- Remsa med åtta rör
- Pipettspetsar
 - Pipetter med flera kanaler, 200 µl



FÖRSIKTIGHET!

Den här uppsättningen med reagens innehåller potentiellt farliga kemikalier. Personskador kan uppstå vid inandning, intagande, hudkontakt och ögonkontakt. Använd skyddsutrustning, inklusive ögonskydd, handskar och en laboratorierock som lämpar sig för den här graden av exponering. Hantera använda reagens som kemiskt avfall och kassera dem i enlighet med nationella och lokala bestämmelser. Ytterligare information om miljö, hälsa och säkerhet finns i säkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html.

Om reagens

- eBLTS måste förvaras vid temperaturer på 2 °C till 8 °C. Använd inte eBLTS som har förvarats under 2 °C.
- Centrifugera inte eBLTS.

Beredning

1. Förbered följande förbrukningsmaterial:

Artikel	Förvaring	Anvisningar
eBLTS (gult lock)	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur. Blanda genom att vortexblanda omedelbart före användning. Centrifugera inte före pipettering.
TB1	–25°C till –15°C	Förvara i rumstemperatur. Vortexblanda.

2. Vortexblanda eller pipettera DNA och centrifugera sedan kort.
3. Spara följande TAG-program på termocyklern:
 - Välj alternativet med förvärt lock och ställ in till 100 °C
 - Ställ in reaktionsvolymen till 50 µl
 - 55 °C i fem minuter
 - Håll vid 10 °C

Förfarande

1. Tillsätt 2–30 µl DNA till varje brunn i en PCR-platta med 96 brunnar så att den totala provmängden är 50–1 000 ng.
Om DNA-volymer är < 30 µl ska nukleasfritt vatten tillsättas till DNA-proverna för att få den totala volymen till 30 µl.
2. Vortexblanda eBLTS noggrant tills magnetkulorna är helt resuspenderade.
3. Kombinera följande volymer i ett rör för att förbereda tagmenteringsmasterblandningen. Multiplicera varje volym med antalet prover som bearbetas.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Reagensöverskott ingår i volymen.
4. Pipettera tagmenteringsmasterblandningen ordentligt för att blanda.
5. Dela tagmenteringsmasterblandningsvolymen lika i en 8-rörsremsa.
6. Använd en 200 µl flerkanalpipett för att överföra 20 µl tagmenteringsmasterblandning till varje brunn på PCR-plattan som innehåller ett prov. Använd nya spetsar för varje provkolumn eller rad.
7. Kassera 8-rörsremsan efter att tagmenteringsmasterblandningen har dispenserats.
8. Använd en 200 µl flerkanalpipett inställd på 40 µl för att blanda genom att pipettera tio gånger. Använd nya spetsar för varje provkolumn.
Alternativt, försegla PCR-plattan och använd en plattskakare vid 1 600 rpm i en minut.
9. Försegla plattan och placera den på den förprogrammerade termocyklern och kör TAG-programmet.
10. Vänta tills TAG-programmet har uppnått hålltemperaturen på 10 °C och ta sedan bort plattan omedelbart.
11. Låt PCR-plattan med 96 brunnar stå i rumstemperatur i två minuter och fortsätt sedan till nästa steg.

Rengöring efter tagmentering

Det här steget tvättar det adaptermärkta DNA:t på eBLTS före PCR-amplifiering.

Förbrukningsmaterial

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- Magnetiskt stativ för PCR-plattor med 96 brunnar
- Självhäftande försegling
- Remsa med åtta rör
- Pipettspetsar
 - Pipetter med flera kanaler, 20 µl
 - Pipetter med flera kanaler, 200 µl

- Förbered för senare:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Indexadapterplatta

Om reagens

- Se till att använda ett magnetiskt stativ som är lämpligt för plattan. Att använda ett magnetiskt stativ för MIDI-plattor för en PCR-platta kan förhindra TWB2 från att fästa vid magnetkulorna.
- Pipettera TWB2 långsamt för att minimera skumbildning för att undvika felaktig volymaspiration och ofullständig blandning.

Beredning

1. Förbered följande förbrukningsmaterial:

Artikel	Förvaring	Anvisningar
EPM	-25 °C till -15 °C	Tina på is i en timme. Vänd för att blanda och centrifugera sedan kort.
ST2	15°C till 30°C	Om fällningar observeras ska du värma den till 37 °C i tio minuter och sedan vortexblanda tills fällningarna är upplösta. Använd i rumstemperatur.
TWB2	15°C till 30°C	Använd i rumstemperatur.
Indexadapterplatta	-25 °C till -15 °C	Tina vid rumstemperatur under 30 minuter.

Förfarande

1. Tillsätt 10 µl ST2 till varje tagmenteringsreaktion. Om du använder en flerkanalspipett ska du pipettera ST2 till en 8-rörsremsa och sedan överföra lämpliga volymer till PCR-plattan. Använd nya spetsar för varje provkolumn eller rad.
2. Använd en 200 µl pipett inställd på 50 µl för att långsamt pipettera varje brunn tio gånger för att resuspendera magnetkulorna.
Alternativt, försegla plattan och skaka vid 1 600 rpm i en minut. Upprepa vid behov.
3. Förslut plattan och centrifugera sedan vid 280 × g i tio sekunder.
4. Inkubera i rumstemperatur i fem minuter.
5. Placera på PCR-plattans magnetiska stativ och vänta tills vätskan är klar (tre minuter).
6. [≤ 48 prover] Tvätta tre gånger enligt följande.
 - a. Använd en 200 µl flerkanalspipett inställd på 60 µl för att avlägsna och kassera supernatanten utan att rubba pelleten.
 - b. Avlägsna från det magnetiska stativet.
 - c. Tillsätt långsamt 100 µl TWB2 direkt på magnetkulorna omedelbart efter det.

- d. Pipettera långsamt tills magnetkulorna är helt resuspenderade. Alternativt, försegla plattan och skaka vid 1 600 rpm i en minut.
 - e. Centrifugera vid $280 \times g$ i 10 sekunder om det förekommer stänk.
 - f. Placera på PCR-plattans magnetiska stativ och vänta tills vätskan är klar (tre minuter).
Lämna plattan på det magnetiska stativet och TWB2 i brunnarna för att förhindra övertorkning när du utför den tredje tvätten. Ta bort och kassera supernatanten efter att du har förberett PCR-masterblandningen.
 - g. Använd en 200 µl flerkanalspipett inställd på 100 µl för att avlägsna och kassera supernatanten.
 - h. Upprepa steg c–f två gånger för totalt tre tvättar.
7. [> 48 prover] Tvätta tre gånger enligt följande.
- a. Utför steg b och c i steg om en till två kolumner tills alla kolumner har bearbetats för att förhindra övertorkning.
 - b. Använd en 200 µl flerkanalspipett inställd på 60 µl för att avlägsna och kassera supernatanten.
 - c. Avlägsna från det magnetiska stativet.
 - d. Dispensera långsamt 100 µl TWB2 direkt på magnetkulorna omedelbart efter det.
 - e. Pipettera långsamt tills magnetkulorna är helt resuspenderade. Alternativt, försegla plattan och skaka vid 1 600 rpm i en minut.
 - f. Centrifugera vid $280 \times g$ i 10 sekunder om det förekommer stänk.
 - g. Placera på PCR-plattans magnetiska stativ och vänta tills vätskan är klar (tre minuter).
Lämna plattan på det magnetiska stativet och TWB2 i brunnarna för att förhindra övertorkning när du utför den tredje tvätten. Ta bort och kassera supernatanten efter att du har förberett PCR-masterblandningen.
 - h. Använd en 200 µl flerkanalspipett inställd på 100 µl för att avlägsna och kassera supernatanten.
 - i. Ta bort från det magnetiska stativet och tillsätt långsamt 100 µl TWB2 direkt på magnetkulorna.
 - j. Upprepa steg h och i, i steg om en eller två kolumner, tills alla kolumner har bearbetats.
 - k. Upprepa steg e–h två gånger för totalt tre tvättar.
8. Lämna plattan på det magnetiska stativet till steg 4 i *Förfarande i Amplifiera tagmenterat DNA*. TWB2 är kvar i brunnarna för att förhindra övertorkning av magnetkulorna.

Amplifiera tagmenterat DNA

Det här steget amplifierar det tagmenterade DNA:t med ett PCR-program med begränsad cykel. PCR-steget lägger till index 1 (i7)-adaptrar, index 2 (i5)-adaptrar och sekvenser som krävs för sekvensering av klustergenerering.

Förbrukningsmaterial

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Indexadapterplatta

- PCR-platta med 96 brunnar
- Nukleasfritt vatten
- Självhäftande försegling
- Mikrocentrifugrör, 1,5 ml
- Pipettspetsar
 - Pipetter med flera kanaler, 20 µl
 - Pipetter med flera kanaler, 200 µl

Om reagens

- Indexadapterplattor
 - En brunn kan innehålla > 10 µl indexadapterar.
 - Lägg inte till prover på indexadapterplattan.
 - Brunnarna på indexplattan får endast användas en gång.

Beredning

1. Förbered följande förbrukningsmaterial:

Artikel	Förvaring	Anvisningar
EPM	-25 °C till -15 °C	Tina vid 4 °C eller på is i en timme. Vänd för att blanda och centrifugera sedan kort.
Indexadapterplatta	-25 °C till -15 °C	Tina vid rumstemperatur under 30 minuter.

2. Spara följande eBLTS PCR-program på en termocykler med lämpligt antal PCR-cykler som anges i tabellen nedan.
 - Välj alternativet med förvärt lock och ställ in till 100 °C
 - Ställ in reaktionsvolymen till 50 µl
 - 72 °C i tre minuter
 - 98 °C i tre minuter
 - X cykler av:
 - 98 °C i 20 sekunder
 - 60 °C i 30 sekunder
 - 72 °C i en minut
 - 72 °C i tre minuter
 - Håll vid 10 °C

Den totala körningstiden är ~38 minuter för nio cykler och ~46 minuter för tolv cykler.

Typ av prov	Antal PCR-cykler (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1 000 ng gDNA	9
50–1 000 ng gDNA extraherat från FFPE	12
gDNA extraherat från blod	9

Förfarande

- Kombinera följande för att förbereda PCR-masterblandningen. Multiplicera varje volym med antalet prover som bearbetas.
 - EPM (23 µl)
 - Nukleasfritt vatten (23 µl)Reagensöverskott ingår i volymen.
- Pipettera PCR-masterblandningen tio gånger för att blanda och centrifugera sedan kort.
- Med plattan på det magnetiska stativet, använd en 200 µl flerkanalpipett för att ta bort och kassera TWB2. Skum som blir kvar på brunnsväggarna påverkar inte biblioteket negativt.
- Avlägsna från det magnetiska stativet.
- Tillsätt omedelbart 40 µl PCR-masterblandning direkt på magnetkulorna i varje brunn.
- Pipettera omedelbart för att blanda tills magnetkulorna är helt resuspenderade. Alternativt, försegla plattan och skaka vid 1 600 rpm i en minut.
- Förslut provplattan och centrifugera vid 280 × g i tio sekunder.
- Centrifugera indexadapterplattan vid 1 000 × g i en minut.
- Förbered indexadapterplattan.
 - [< 96 prover] Stick hål på folieförseglingen på indexadapterplattan med en ny pipettspets för varje brunn – endast för det antal prover som bearbetas.
 - [96 prover] Passa in en ny PCR-platta med halv krage ovanför indexadapterplattan och tryck nedåt för att punktera folieförseglingen. Kassera PCR-plattan som användes för att punktera folieförseglingen.
- Använd en ny pipettspets för att tillsätta 10 µl förparade indexadaptertror till varje brunn.
- Använd en pipett inställd på 40 µl för att blanda genom att pipettera tio gånger. Alternativt, försegla plattan och skaka vid 1 600 rpm i en minut.
- Förslut plattan och centrifugera sedan vid 280 × g i tio sekunder.
- Placera på termocyklern och kör eBLTS PCR-programmet.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter kan du förvara den vid –25 °C till –15 °C i upp till 30 dagar.

Rena bibliotek

Det här steget använder dubbelsidig magnetkulereningsprocedur för att rena de amplifierade biblioteken.

Förbrukningsmaterial

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Ny 80-procentig etanol (EtOH)
- 0,8 ml Deepwell-förvaringsplattor i polypropylen med 96 brunnar (MIDI-platta)
- PCR-platta med 96 brunnar
- Magnetiskt stativ för MIDI-platta
- Magnetiskt stativ för PCR-platta
- Mikrocentrifugrör, 1,5 ml
- Nukleasfritt vatten

Om reagens

- Cleanup Beads
 - Vortexblanda före varje användning.
 - Vortexblanda ofta för att säkerställa att magnetkulorna är jämnt fördelade.
 - Aspirera och dispensera långsamt på grund av lösningens viskositet.

Beredning

1. Förbered följande förbrukningsmaterial:

Artikel	Förvaring	Anvisningar
CB	Rumstemperatur	Vortexblanda och vänd upp och ned för att blanda tills färgen på vätskan är homogen.
RSB	2 °C till 8 °C	Tina i rumstemperatur under 30 minuter. Vortexblanda.

Förfarande

1. Skaka PCR-plattan med 96 brunnar vid 1 800 rpm i en minut och centrifugera sedan kort.
2. Placera på PCR-plattans magnetiska stativ och vänta tills vätskan är klar (en minut).
3. Vortexblanda CB tre gånger i tio sekunder och blanda sedan genom att vända på flaskan flera gånger.
4. Gör följande för högkvalitativt gDNA.
 - a. Tillsätt 77 µl nukleasfritt vatten till varje brunn på en ny MIDI-platta.

- b. Tillsätt 88 µl CB till varje brunn på MIDI-plattan.
 - c. Överför 45 µl supernatant från varje brunn på PCR-plattan till motsvarande brunn på MIDI-plattan.
 - d. Kassera PCR-plattan.
 - e. Pipettera varje brunn tio gånger för att blanda. Alternativt, försegla plattan och skaka vid 1 800 rpm i en minut.
 - f. Försegla plattan och inkubera i rumstemperatur i fem minuter.
 - g. Kontrollera om det finns luftbubblor. Om det finns luftbubblor kan de centrifugeras bort.
 - h. Placera på MIDI-plattans magnetiska stativ och vänta tills vätskan är klar (fem minuter).
 - i. Vortexblanda CB noggrant under inkubationen och tillsätt sedan 20 µl till varje brunn på en ny MIDI-platta.
 - j. Överför 200 µl supernatant från varje brunn på den första MIDI-plattan till motsvarande brunn på den nya MIDI-plattan (innehåller 20 µl CB).
 - k. Kassera den första MIDI-plattan.
 - l. Pipettera varje brunn på den nya MIDI-plattan tio gånger för att blanda. Alternativt, försegla plattan och skaka vid 1 800 rpm i en minut.
5. Gör följande för extraherat FFPE.
- a. Tillsätt 81 µl CB till varje brunn på en ny MIDI-platta.
 - b. Överför 45 µl supernatant från varje brunn på PCR-plattan till motsvarande brunn på MIDI-plattan.
 - c. Kassera PCR-plattan.
 - d. Pipettera varje brunn tio gånger för att blanda. Alternativt, försegla plattan och skaka vid 1 800 rpm i en minut.
6. Inkubera i rumstemperatur i fem minuter.
7. Kontrollera om det finns luftbubblor. Om det finns luftbubblor kan de centrifugeras bort.
8. Placera på MIDI-plattans magnetiska stativ och vänta tills vätskan är klar (fem minuter).
9. Avlägsna och kassera all supernatant utan att rubba magnetkulorna.
10. Tvätta magnetkulorna enligt följande.
- a. Tillsätt 200 µl ny 80-procentig EtOH utan att blanda med plattan på det magnetiska stativet.
 - b. Inkubera i 30 sekunder.
 - c. Avlägsna och kassera all supernatant utan att rubba magnetkulorna.
11. Tvätta magnetkulorna en **andra** gång.
12. Lufttorka på det magnetiska stativet i fem minuter.
13. Använd en 20 µl pipett för att avlägsna och kassera kvarvarande EtOH under lufttorkningen.
14. Avlägsna från det magnetiska stativet.
15. Tillsätt 17 µl RSB till magnetkulorna.
16. Försegla plattan och skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
17. Inkubera i rumstemperatur i två minuter.

18. Kontrollera om det finns luftbubblor. Om det finns luftbubblor kan de centrifugeras bort.
19. Placera på MIDI-plattans magnetiska stativ och vänta tills vätskan är klar (två minuter).
20. Tillsätt 15 µl supernatant till en ny PCR-platta med 96 brunnar.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter kan du förvara plattan vid -25°C till -15°C i upp till 30 dagar om du förseglar den.

Poola föranrikade bibliotek

Det här steget kombinerar DNA-bibliotek med unika index i en pool med upp till tolv bibliotek.

Poolningsmetoder

Du kan poola efter volym eller massa. Använd följande tabell för att hitta en lämplig metod för din provmängd.

Tabell 2 Rekommenderade poolningsmetoder

Prover	Poolningsmetod
10–49 ng gDNA	Massa
50–1 000 ng gDNA	Volym
gDNA extraherat från FFPE	Massa
gDNA extraherat från blod	Volym

- 1-plex-anrikning kräver inte att föranrikade bibliotek poolas. Det kan däremot vara nödvändigt att tillsätta RSB.
- Efter föranrikad bibliotekskvantifiering kan alla provtyper poolas enligt massa för att uppnå optimal indexbalans.
- Den slutliga avkastningen från föranrikade bibliotek genererade i separata experimentella preparat kan variera. Därför rekommenderas poolning efter massa för att uppnå optimal indexbalans.
- Använd 1-plex-anrikning för följande situationer.
 - 10–49 ng gDNA
 - 50–1 000 ng gDNA extraherat från FFPE
 - Låg mindre allelfrekvensdetektion för somatisk variantbestämning

Poola efter massa

För följande situationer ska du kvantifiera biblioteken för att använda en DNA-massa per bibliotek för anrikning enligt specifikationerna i [Poola föranrikade bibliotek vid likvärdig koncentration på sidan 34](#).

- 10–49 ng gDNA-prov
- 50–1 000 ng gDNA extraherat från FFPE-prov

- Låg mindre allelfrekvensdetektion för somatisk variantbestämning
- gDNA extraherat från blod för optimal indexbalans

Kvantifiera föranrikade bibliotek

1. Kör 1 µl av de föranrikade biblioteken med din föredragna fluorescensbaserade kvantifieringsmetod som använder dsDNA-interkalerande färg.
 - Förvänta dig en föranrikad biblioteksavkastning på ≥ 500 ng för 50–1 000 ng högkvalitativt gDNA.
 - Förvänta dig en föranrikad biblioteksavkastning på 500–6 000 ng, beroende på kvaliteten på det initiala provet, för 50–1 000 ng gDNA extraherat från FFPE.

OBS! För kvantifieringsmetoder med olika biaser ska du kvalificera kvantifieringsmetoden för det här arbetsflödet. Koncentrationsresultaten kan skilja sig åt beroende på vilken metod som används.

Poola föranrikade bibliotek vid likvärdig koncentration

Använd följande tabell för att bestämma DNA-massan per bibliotek som krävs för anrikning enligt provtyp och anrikningsplexitet. Optimal anrikningsavkastning och analysprestanda garanteras inte vid användning av lägre föranrikade biblioteksavkastningar än vad som rekommenderas.

Den totala DNA-massan i anrikningsreaktionen bör inte överstiga 6 000 ng.

Prover	Anrikningsplexitet	DNA-massa per bibliotek (ng)	Total DNA-biblioteksmassa (ng)
Högkvalitativt gDNA	12	250–500	3 000–6 000
gDNA extraherat från FFPE	1	200	200

1. Anteckna index för de bibliotek som du planerar att poola i det här steget.
2. Beräkna volymen som måste tillsättas anrikningsreaktionen för att uppnå den erforderliga DNA-massan baserat på koncentrationen av varje bibliotek.
 - Högkvalitativt gDNA: Beräkna biblioteksvolymen som behövs för en provmängd på 250–500 ng.
 - gDNA extraherat från FFPE: Beräkna biblioteksvolymen som behövs för en provmängd på 200 ng.
3. Lägg till den beräknade volymen för varje bibliotek i samma brunn på PCR-plattan.
4. Om du använder högkvalitativt gDNA ska du utföra ett av följande baserat på den totala volymen av poolade föranrikade bibliotek:
 - Om den föranrikade biblioteksvolymen är 30 µl ska du fortsätta till [Hybridisering av prover på sidan 36](#).
 - Om den föranrikade biblioteksvolymen är < 30 µl ska du tillsätta RSB för att uppnå en total volym på 30 µl.

- Om den föranrikade biblioteksvolymen är > 30 µl ska du använda en magnetkulebaserad metod eller en vakuumkoncentrator för att koncentrera det poolade provet. Tillsätt RSB till det koncentrerade poolade provet för att uppnå en total volym på 30 µl.
5. Om du använder gDNA extraherat från FFPE ska du utföra ett av följande baserat på den totala volymen av poolade föranrikade bibliotek:
- Om den föranrikade biblioteksvolymen är 7,5 µl ska du fortsätta till [Hybridisering av prober på sidan 36](#).
 - Om den föranrikade biblioteksvolymen är < 7,5 µl ska du tillsätta RSB för att uppnå en total volym på 7,5 µl.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter kan du förvara plattan vid -25 °C till -15 °C i upp till 30 dagar om du förseglar den.

Poola efter volym

När provmängden är 50–1 000 ng gDNA krävs inte kvantifiering och normalisering av enskilda bibliotek som genererats i samma experiment.

För att uppnå optimala prestanda ska du endast poola föranrikade biblioteksprover som framställts av samma användare samt tillhör samma reagensparti och indexadapterplatta.

1. Anteckna index för de bibliotek som du planerar att poola i det här steget.
2. Kombinera följande föranrikade biblioteks- och RSB-volymer för din anrikningsplexitet i samma brunn på en ny PCR-platta.

Den resulterande volymen är 30 µl.

Anrikningsplexitet *	Varje föranrikad biblioteksvolym (µl)	RSB-volym (µl)
1-plex	14	16
2-plex	14	2
3-plex	10	0
4-plex	7,5	0
5-plex	6	0
6-plex	5	0
7-plex	4,2	0,6
8-plex	3,7	0,4
9-plex	3,3	0,3
10-plex	3	0
11-plex	2,7	0,3
12-plex	2,5	0

*Information om icke-standardiserade plexiteter (2-plex till 11-plex) finns i [Begränsningar på sidan 2](#).

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter kan du förvara plattan vid -25 °C till -15 °C i upp till 30 dagar om du förseglar den.

[Valfritt] Kvalificera föranrikade bibliotek

Om du poolar efter volym ska du använda en fluorometribaserad metod som använder dsDNA-interkalerande färg. Använd en DNA-fragmentanalysator med lämplig fragmentanalyssats för att kvalificera de föranrikade biblioteken.

Använd totalt 1 μl för bibliotekskvalificering. Föranrikade bibliotek är tillräckligt koncentrerade för att möjliggöra små utspädningar för kvantifiering eller fragmentanalys.

Hybridisering av prober

Det här steget binder målregioner i DNA:t med infångningsprober.

Reagens i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är kompatibla med paneler med anrikade DNA-oligonukleotider från både Illumina och tredjeparter. Information om de obligatoriska specifikationerna för paneler från en tredje part finns i [Krav på anrikningsprobpaneler på sidan 10](#).

Förbrukningsmaterial

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (blått lock)
- Anrikningsprobpanel
- PCR-platta med 96 brunnar
- Självhäftande försegling
- Förbered för senare:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (bärnstensfärgat lock)

Om reagens

- NHB2 fälls ut och separeras under förvaring.
- Anrikningsprobpanelen hänvisar till den valda anrikningsoligonukleotidpanelen från en Illumina-leverantör.

Beredning

1. Förbered följande förbrukningsmaterial:

Artikel	Förvaring	Anvisningar
EHB2	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur. Vortexblanda. Om kristaller och grumlighet observeras ska vortexblandningen upprepas eller lösningen blandas genom pipettering tills den har klarnat.
Anrikningsproppanel	-25 °C till -15 °C (Illumina)	Både paneler från Illumina och tredje parter ska uppnå rumstemperatur. Vortexblanda.
NHB2 (blått lock)	-25 °C till -15 °C	Tina i rumstemperatur. När rumstemperatur har uppnåtts ska den förvärmas på en mikroprovskubator i fem minuter till samma temperatur som proben du använder. Vortexblanda med maximal hastighet tre gånger i tio sekunder vardera för att resuspendera. Centrifugera kort. Pipettera upp och ner från botten av röret. Om kristaller och grumlighet observeras ska vortexblandningen upprepas eller lösningen blandas genom pipettering tills den har klarnat. Använd medan den är varm för att undvika att fällningar formas igen.
SMB3*	2 °C till 8 °C	Om du fortsätter till nästa procedur omedelbart efter 90 minuters uppehåll i HYB-programmet ska du låta artikeln uppnå rumstemperatur minst två timmar innan du startar HYB-programmet.
EEW* (bärnstensfärgat rör)	-25 °C till -15 °C	Om du fortsätter till nästa procedur omedelbart efter 90 minuters uppehåll i HYB-programmet ska du låta artikeln uppnå rumstemperatur minst två timmar innan du startar HYB-programmet. När rumstemperatur har uppnåtts ska du förvärma den på en mikroprovskubator till lämplig hybridiserings- och insamlingstemperatur i 30 minuter innan HYB-programmet avslutas.

*Om du stoppar förfarandet före nästa procedur, ska du skjuta upp beredningen av reagenset tills du når den proceduren.

2. Spara följande HYB-program på termocyklern med lämpligt antal cykler som listas i [Tabell 3](#).
- Välj alternativet med förvämt lock och ställ in till 100 °C
 - Ställ in reaktionsvolymen
 - [Högkvalitativt gDNA] 100 µl
 - [gDNA extraherat från FFPE] 25 µl
 - 98°C i fem minuter
 - X cykler på en minut vardera, med start vid 98 °C för den första cykeln och sedan en minskning på 2 °C per cykel
 - Bibehåll vid tillämplig temperatur i 90 minuter:
 - [gDNA extraherat från FFPE] 58 °C
 - [80-mer probpaneler] 58 °C
 - [Somatisk variantbestämning] 58 °C
 - [Alla andra] 62 °C

Den totala körningstiden är ~115 minuter.

Tabell 3 Cykelantal per prov eller panel

Prov- och paneltyp	Antal cykler (X)
gDNA extraherat från FFPE (oavsett paneltyp)	20
80-mer probpaneler (oavsett provtyp)	20
Somatisk variantbestämning	20
Alla andra prover och paneler	18

Förfarande

1. [Högkvalitativt gDNA] Tillsätt följande reagens *i den ordning som anges* till varje poolat bibliotek i PCR-plattan.
Skapa inte en masterblandning. Att skapa en masterblandning av NHB2 och EHB2 påverkar anrikningsprestandan negativt.
 - NHB2 (blått lock) (50 µl)
 - Anrikningsprobpanel (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. [Högkvalitativt gDNA] Använd en pipett inställd på 90 µl och pipettera varje brunn tio gånger för att blanda.

3. [gDNA extraherat från FFPE] Tillsätt följande reagens *i den ordning som anges* till varje poolat bibliotek i PCR-plattan.
Skapa inte en masterblandning. Att skapa en masterblandning av NHB2 och EHB2 påverkar anrikningsprestandan negativt.
 - NHB2 (blått lock) (12,5 µl)
 - Anrikningsprobpanel (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. [gDNA extraherat från FFPE] Använd en pipett inställd på 20 µl för att pipettera varje brunn tio gånger för att blanda.
5. Förslut plattan och centrifugera vid 280 × g i tio sekunder.
6. Placera provplattan på den förprogrammerade termocyklern och kör HYB-programmet.
7. Fortsätt omedelbart till nästa procedur när HYB-programmets temperaturhållningstid slutar.

**FÖRSIKTIGHET!**

Utfällning sker om temperaturen för hybridiseringsreaktionen faller under rumstemperatur.

Samla in hybridiserade prober

I det här steget används Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) för att fånga prober som är hybridiserade till målintresseområdet.

Förbrukningsmaterial

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (bärnstensfärgat lock)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- Mikrocentrifugrör, 1,5 ml
- MIDI-platta med 96 brunnar
- PCR-platta med 96 brunnar
- Självhäftande försegling
- Magnetiskt stativ för MIDI-platta
- Förbered för senare:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Om reagens

- EEW
 - Säkerställ att EEW har tinats i rumstemperatur i minst två timmar innan förvärmning på en mikroprovinkubator.
 - Säkerställ att EEW har värmts upp i en mikroprovinkubator i 30 minuter innan HYB-programmet avslutas.
 - Lämna EEW i mikroprovinkubatorn när den inte används. EEW bör förbli uppvärmd under hela protokollet.
 - Kan vara grumlig efter att ha nått rumstemperatur.
 - Kan se gul ut.
- SMB3
 - SMB3 måste ha uppnått rumstemperatur före användning.

Beredning

1. Förbered följande förbrukningsmaterial.

Artikel	Förvaring	Anvisningar
SMB3	2 °C till 8 °C	Låt stå i två timmar för att uppnå rumstemperatur. Blanda genom att vända på flaskan och vortexblanda sedan tills den är helt resuspenderad.
EEW (bärnstensfärgat rör)	-25 °C till -15 °C	Efter två timmars inkubation i rumstemperatur ska du förvärma den i 30 minuter på en mikroprovinkubator till lämplig hybridiserings- och insamlingstemperatur innan HYB-programmet avslutas.
EE1	-25 °C till -15 °C	Tina i rumstemperatur och vortexblanda sedan.
HP3	-25 °C till -15 °C	Tina i rumstemperatur och vortexblanda sedan.
ET2	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur. Vortexblanda.
EPM	-25 °C till -15 °C	Tina på is i en timme. Vänd för att blanda och centrifugera sedan kort. Förvara på is.
PPC	-25 °C till -15 °C	Tina på is i en timme. Vortexblanda och centrifugera sedan kort. Förvara på is.

2. Förvärm en mikroprovinkubator med en MIDI-insats för värmeblock för att inkubera provplattan till en av följande temperaturer. En valfri andra mikroprovinkubator kan användas för att förvärma EEW. Ställ EEW ovanpå MIDI-insatsen för värmeblock.
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-mer per probpanel] 58 °C
 - [Somatisk variantbestämning] 58 °C
 - [Alla andra] 62 °C

Förfarande

Insamling

1. Tillsätt SMB3 till motsvarande brunn på en ny MIDI-platta enligt följande.
 - [Högkvalitativt gDNA] Tillsätt 250 µl SMB3.
 - [gDNA extraherat från FFPE] Tillsätt 62,5 µl SMB3.
2. Använd en pipett inställd på 100 µl för högkvalitativt gDNA eller 25 µl för FFPE för att överföra varje poolat bibliotek från PCR-plattan med 96 brunnar till motsvarande brunn på den nya MIDI-plattan.
3. Försegla plattan och skaka vid 1 200 rpm i fyra minuter.
4. Centrifugera kort om det förekommer stänk.
5. Placera den poolade biblioteksplattan på MIDI-insatsen för värmeblock på mikroprovsinkubatorn, under EEW-röret, stäng locket och inkubera sedan i 15 minuter vid tillämplig temperatur:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-mer probpanel] 58 °C
 - [Somatisk variantbestämning] 58 °C
 - [Alla andra] 62 °C
6. Ta bort plattan med poolade bibliotek och centrifugera vid 280 × g i 30 sekunder.
7. Placera den omedelbart på MIDI-plattans magnetiska stativ och vänta tills vätskan är klar (två minuter).
8. [Högkvalitativt gDNA] Använd en pipett inställd på 200 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.
9. [gDNA extraherat från FFPE] Använd en pipett inställd på 90 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn utan att rubba pelleten.
10. Avlägsna och kassera all resterande supernatant.

Tvättning

1. Avlägsna från det magnetiska stativet.
2. [Högkvalitativt gDNA] Ta snabbt bort EEW från mikroprovsinkubatorn och tillsätt 200 µl till varje brunn.
3. [gDNA extraherat från FFPE] Ta snabbt bort EEW från mikroprovsinkubatorn och tillsätt 50 µl till varje brunn.
4. Returnera oanvänd EEW till mikroprovsinkubatorn och håll den uppvärmd.
5. Försegla och skaka vid 1 800 rpm i fyra minuter.
6. Placera provplattan på MIDI-insatsen för värmeblock i mikroprovsinkubatorn, under EEW-röret, stäng locket och inkubera sedan i fem minuter vid tillämplig temperatur:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-mer probpaneler] 58 °C

- [Somatisk variantbestämning] 58 °C
 - [Alla andra paneler] 62 °C
7. Placera den omedelbart på MIDI-plattans magnetiska stativ och vänta tills vätskan är klar (två minuter).
 8. Använd en pipett med volymen inställd på 200 µl för högkvalitativt gDNA eller 50 µl för FFPE för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn.
 9. Upprepa steg 1–8 två gånger för totalt tre tvättar.

Överföringstvätt

1. Avlägsna från det magnetiska stativet.
2. [Högkvalitativt gDNA] Ta snabbt bort EEW från mikroprovsinkubatorn och tillsätt 200 µl till varje brunn.
3. [gDNA extraherat från FFPE] Ta snabbt bort EEW från mikroprovsinkubatorn och tillsätt 50 µl till varje brunn.
4. Försegla och skaka vid 1 800 rpm i fyra minuter. Minska hastigheten till 1 600 rpm om stänk uppstår.
5. Överför resuspenderad magnetkulelösning till en ny MIDI-platta.
En viss mängd prov kan finnas kvar i brunnarna.



FÖRSIKTIGHET!

Överföring av reagens minimerar överföring av kvarvarande reagens som kan hämma nedströms PCR.

6. Placera provplattan på MIDI-insatsen för värmeblock på mikroprovsinkubatorn, stäng locket och inkubera sedan i fem minuter vid tillämplig temperatur:
 - [FFPE] 58 °C
 - [80-mer probpaneler] 58 °C
 - [Somatisk variantbestämning] 58 °C
 - [Alla andra] 62 °C
7. Placera den omedelbart på MIDI-plattans magnetiska stativ och vänta tills vätskan är klar (två minuter).
8. Använd en pipett med volymen inställd på 200 µl för högkvalitativt gDNA eller 50 µl för FFPE för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn.
9. Centrifugera plattan vid 280 × g i 30 sekunder.
10. Placera MIDI-plattan på ett magnetiskt stativ i tio sekunder.
11. Använd en 20 µl pipett för att avlägsna och kassera kvarvarande vätska från varje brunn.
12. Fortsätt omedelbart till [Eluering på sidan 43](#) för att förhindra överdriven uttorkning av magnetkuler och förlust av biblioteksavkastning.

Eluering

1. Kombinera följande volymer för att förbereda en elueringsmasterblandning. Multiplicera varje volym med antalet poolade bibliotek som bearbetas.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Ytterligare reagensöverskott ingår i volymen.
2. Vortexblanda och centrifugera sedan kort.
3. Avlägsna MIDI-plattan från det magnetiska stativet.
4. Tillsätt 23 µl elueringsmasterblandning till varje brunn.
5. Försegla plattan och skaka vid 1 800 rpm i två minuter.
6. Inkubera plattan i rumstemperatur i två minuter.
7. Centrifugera vid 280 × g i 30 sekunder.
8. Placera ett magnetiskt stativ för en MIDI-platta och vänta tills vätskan är klar (två minuter).
9. Överför 21 µl supernatant från MIDI-plattan till motsvarande brunn på en ny PCR-platta med 96 brunnar.
10. Kassera MIDI-plattan.
11. Tillsätt 4 µl ET2 till varje brunn som innehåller 21 µl supernatant.
12. Ställ in pipetten på 20 µl och pipettera långsamt varje brunn tio gånger för att blanda.
13. Förslut plattan och centrifugera sedan vid 280 × g i tio sekunder.
14. Inkubera plattan i rumstemperatur i en minut.

Amplifiera anrikat bibliotek

Det här steget använder PCR för att amplifiera det anrikade biblioteket.

Förbrukningsmaterial

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Självhäftande försegling

Beredning

1. Förbered följande förbrukningsmaterial:

Artikel	Förvaring	Anvisningar
EPM	-25 °C till -15 °C	Tina vid 4 °C eller på is i en timme. Vänd för att blanda och centrifugera sedan kort. Förvara på is.
PPC	-25 °C till -15 °C	Tina vid 4 °C på is i en timme. Vortexblanda och centrifugera sedan kort. Förvara på is.

2. Spara följande AMP-program på termocyklern med lämpligt antal PCR-cykler som anges i tabellen nedan.

- Välj alternativet med förvärrt lock och ställ in till 100 °C
- Ställ in reaktionsvolymen till 50 µl
- 98 °C i 45 sekunder
- (X) cykler av:
 - 98 °C i 30 sekunder
 - 60 °C i 30 sekunder
 - 72°C i 30 sekunder
- 72 °C i fem minuter
- Håll vid 10 °C

Den totala körningstiden är ~35 minuter.

Prov- och paneltyp	(X) cykler
FPPE	14
Illumina Exome Panel (CEX) för högkvalitativt gDNA	10
Illumina Exome Panel (CEX) för FFPE	12
Alla andra prover och paneler	12 ¹²³⁴

¹ Kan justeras upp till 15 cykler för små paneler från tredje part genom efterföljande optimering. Om du använder FFPE kan antalet cykler justeras upp till 17.

² Kan justeras upp till 17 cykler för paneler från tredje part som endast har 500 prover. Om du använder FFPE kan antalet cykler justeras upp till 19.

³ Kan justeras upp till 14 cykler för FFPE-prover.

⁴ Att öka antalet PCR-cykler kan resultera i en högre duplikathastighet och mindre fragmentstorlekar för FFPE-prover.

Förfarande

1. Tillsätt 5 µl PPC till varje brunn.
2. Tillsätt 20 µl EPM i varje brunn.
3. Försegla plattan och skaka vid 1 200 rpm i en minut.

- Centrifugera plattan vid 280 × g i tio sekunder.
- Placera den på den förprogrammerade termocyklern och kör AMP-programmet.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter kan du förvara den vid 2 °C till 8 °C i upp till två dagar. Alternativt kan du låta den vara kvar på termocyklern i upp till 24 timmar.

Rena amplifierade anrikade bibliotek

Det här steget använder Cleanup Beads för att rena det anrikade biblioteket och ta bort oönskade produkter.

Förbrukningsmaterial

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Ny 80-procentig etanol (EtOH)
- Självhäftande förseglingar
- MIDI-platta med 96 brunnar
- PCR-platta med 96 brunnar
- Magnetiskt stativ för MIDI-platta

Om reagens

- Cleanup Beads
 - Vortexblanda före varje användning.
 - Vortexblanda ofta för att säkerställa att magnetkulorna är jämnt fördelade.
 - Aspirera och dispensera långsamt på grund av lösningens viskositet.

Beredning

- Förbered följande förbrukningsmaterial.

Artikel	Förvaring	Anvisningar
CB	Rumstemperatur	Vortexblanda och vänd upp och ned för att blanda tills färgen på vätskan är homogen.
RSB	2 °C till 8 °C	Förvara i rumstemperatur. Vortexblanda.

- Bered ny 80-procentig EtOH från absolut etanol.

Förfarande

- Centrifugera PCR-plattan vid 280 × g i tio sekunder.

2. Vortexblanda CB tre gånger i tio sekunder och blanda sedan genom att vända på flaskan.
3. Tillsätt 40,5 µl CB till varje brunn på en ny **MIDI**-platta.
4. Överför 45 µl från varje brunn på PCR-plattan till motsvarande MIDI-platta.
5. Försegla plattan och skaka vid 1 800 rpm i en minut.
6. Inkubera MIDI-plattan i rumstemperatur i fem minuter.
7. Centrifugera vid 280 × g i 10 sekunder.
8. Placera ett magnetiskt stativ för en MIDI-platta och vänta tills vätskan är klar (fem minuter).
9. Använd en pipett inställd på 95 µl för att avlägsna och kassera all supernatant från varje brunn.
10. Tvätta två gånger enligt följande.
 - a. Tillsätt 200 µl ny 80-procentig EtOH utan att blanda med plattan på det magnetiska stativet.
 - b. Inkubera i 30 sekunder.
 - c. Avlägsna och kassera all supernatant utan att rubba magnetkulorna.
11. Lufttorka på det magnetiska stativet i fem minuter.
12. Använd en 20 µl pipett för att avlägsna och kassera kvarvarande EtOH från varje brunn under lufttorkningen.
13. Ta bort plattan från det magnetiska stativet och tillsätt 32 µl RSB i varje brunn.
14. Försegla plattan och skaka vid 1 800 rpm i en minut.
15. Inkubera plattan i rumstemperatur i fem minuter.
16. Centrifugera vid 280 × g i 10 sekunder.
17. Placera ett magnetiskt stativ för en MIDI-platta och vänta tills vätskan är klar (två minuter).
18. Överför 30 µl supernatant från MIDI-plattan med 96 brunnar till motsvarande brunn på en ny PCR-platta.
19. Kassera MIDI-plattan.

SÄKER STOPPUNKT

Om du avbryter kan du förvara plattan vid -25°C till -15°C i upp till sju dagar om du förseglar den.

Kontrollera anrikade bibliotek

För att kvantifiera dubbelsträngat gDNA ska du använda en fluorescensbaserad metod som använder interkalerande färgämne. Undvik metoder som mäter total nukleinsyra, som NanoDrop eller andra UV-absorbansmetoder.

1. Kör 1 µl av de anrikade biblioteken med din kvantifieringsmetod.

OBS! Total probmolaritet påverkar proportionellt avkastningen av biblioteket efter anrikning.

Räkna med en genomsnittlig fragmentstorlek på 125–235 bp och distribution av DNA-fragment med ett storleksintervall från ~200 bp till ~1 000 bp.

Späda ut bibliotek till startkoncentrationen

Det här steget späder ut biblioteken till startkoncentrationen för ditt sekvenseringssystem och är det första steget i en seriell utspädning. Efter utspädning till startkoncentrationen är biblioteken redo att denatureras och spädas ut till den slutliga inläsningskoncentrationen.

Oavsett vilken anrikningsproppanel du använder för sekvensering rekommenderar Illumina att du konfigurerar en paired-end-körning med 151 cykler per avläsning (2 × 151) och tio cykler per indexavläsning. Om du vill ha färre överlappande avläsningar eller mindre rå täckning kan du sekvensera ner till 2 × 126 eller 2 × 101.

- Beräkna molaritetsvärdet för biblioteket eller poolade bibliotek med hjälp av följande formel.
 - För bibliotek som är kvalificerade för en DNA-fragmentanalysator ska du använda den genomsnittliga storleken som erhålls för biblioteket.
 - Använd 350 bp som genomsnittlig biblioteksstorlek för alla andra kvalificeringsmetoder.

$$\frac{ng/\mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{genomsnittlig biblioteksstorlek (bp)}} = \text{Molaritet (nM)}$$

Till exempel, om din bibliotekskoncentration är 20 ng/μl och medelstorleken är 350 bp är det resulterande molaritetsvärdet 86,58 nM.

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

- Använd molaritetsvärdet för att beräkna volymerna av RSB och bibliotek som behövs för att späda ut bibliotek till startkoncentrationen för ditt system.

Sekvenseringssystem	Minsta obligatoriska biblioteksvolym (μl)	Startkoncentration (nM)	Slutgiltig inläsningskoncentration (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) eller 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM är startkoncentrationen för en slutlig inläsningskoncentration på 350 pM. Justera den slutliga inläsningskoncentrationen vid behov med hjälp av följande tabell.

Slutgiltig inläsningskoncentration (pM)	Poolad bibliotekskoncentration (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1

Slutgiltig inläsningskoncentration (pM)	Poolad bibliotekskoncentration (nM)
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Späda ut bibliotek med RSB:

- **Bibliotek kvantifierade som en multiplexerad bibliotekspool** – Späd ut poolen till startkoncentrationen för ditt system.
- **Bibliotek kvantifierade individuellt** – Späd ut varje bibliotek till startkoncentrationen för ditt system. Tillsätt 10 µl av varje utspädd bibliotek till ett rör för att skapa en multiplexerad bibliotekspool.

4. Följ instruktionerna för denaturering och utspädning för ditt system för att späda ut till den slutliga inläsningskoncentrationen.

- Information om systemet NextSeq 550Dx finns i [Förberedelser för sekvensering med NextSeq 550Dx på sidan 48](#).
- Information om systemet MiSeqDx finns i [Förberedelser för sekvensering med MiSeqDx på sidan 50](#).
- Information om systemet NovaSeq 6000Dx finns i [Förberedelser för sekvensering med NovaSeq 6000Dx på sidan 51](#).

De slutliga inläsningskoncentrationerna är en utgångspunkt och en allmän riktlinje. Optimera koncentrationer för ditt arbetsflöde och kvantifieringsmetod under efterföljande sekvenseringskörningar eller genom flödescelltitrering.

Förberedelser för sekvensering med NextSeq 550Dx

Använd följande anvisningar för att denaturera och späda ut bibliotek för sekvensering på sekvenseringssystemet NextSeq 550Dx.

Förbrukningsmaterial

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

Beredning

Förbered en ny utspädning av 0,2 N NaOH för att denaturera bibliotek för sekvensering. Extra volym förbereds för att förhindra att små pipetteringsfel påverkar den slutliga NaOH-koncentrationen.



FÖRSIKTIGHET!

Nyutspädd 0,2 N NaOH är avgörande för denatureringsprocessen. Felaktig denaturering kan minska avkastningen.

1. Överför följande volymer till ett mikrocentrifugrör för att späda ut 1N NaOH till 0,2 NaOH:

1. Förbered följande förbrukningsmaterial.

Artikel	Förvaring	Anvisningar
HT1	-25 °C till -15 °C	Tina i rumstemperatur. Förvara vid 2 °C till 8 °C tills du är redo att späda ut de denaturerade biblioteken.

2. Överför följande volymer till ett mikrocentrifugrör för att förbereda en ny utspädning av NaOH:

- Vatten av laboratoriekvalitet (800 µl)
- 1N NaOH (200 µl)

Resultatet är 1 ml 0,2 N NaOH.

3. Vänd röret flera gånger för att blanda.

4. Överför följande volymer till ett mikrocentrifugrör för att förbereda 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

- Vatten av laboratoriekvalitet (800 µl)
- 1 M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)

Resultatet är 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

OBS! Håll röret tillslutet. Använd den färska utspädningen inom **12 timmar**.

Denaturera bibliotek

1. Överför följande volymer av bibliotek och en ny utspädning av 0,2 N NaOH till ett mikrocentrifugrör.

- 10 µl bibliotek
- 10 µl 0,2 N NaOH

2. Vortexblanda kort och centrifugera vid 280 x g i en minut.

3. Inkubera i rumstemperatur i fem minuter.

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

Späda ut denaturerade bibliotek till 20 pM

1. Tillsätt 970 µl förkyld HT1 till röret som innehåller denaturerade bibliotek.
Resultatet är ett 20 pM denaturerat bibliotek.
2. Vortexblanda kort och centrifugera vid 280 x g i en minut.
3. Placera 20 pM biblioteken på is tills du är redo att färdigställa utspädningen.

Späda ut bibliotek till inläsningskoncentration

1. Tillsätt följande volymer för att späda den denaturerade 20 pM bibliotekslösningen till 1,2 pM.
 - Denaturerad bibliotekslösning (78 µl)
 - Förkyld HT1 (1 222 µl)Den totala volymen är 1,3 ml vid 1,2 pM.
2. Vänd för att blanda och pulscentrifugera sedan.
3. Fortsätt till sekvensering. Anvisningar finns i *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Referenshandbok för NextSeq 550Dx-instrumentet) (dokumentnr 1000000009513)*.

Förberedelser för sekvensering med MiSeqDx

Använd följande anvisningar för att denaturera och späda ut bibliotek för sekvensering på sekvenseringssystemet MiSeqDx.

Förbrukningsmaterial

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1 N NaOH

Beredning

Förbered en *ny* utspädning av 0,2 N NaOH för att denaturera bibliotek för sekvensering. Extra volym förbereds för att förhindra att små pipetteringsfel påverkar den slutliga NaOH-koncentrationen.



FÖRSIKTIGHET!

Nyutspädd 0,2 N NaOH är avgörande för denatureringsprocessen. Felaktig denaturering kan minska avkastningen.

1. Överför följande volymer till ett mikrocentrifugrör för att späda ut 1N NaOH till 0,2 NaOH:
1. Förbered följande förbrukningsmaterial.

Artikel	Förvaring	Anvisningar
HT1	-25 °C till -15 °C	Tina i rumstemperatur. Förvara vid 2 °C till 8 °C tills du är redo att späda ut de denaturerade biblioteken.

2. Överför följande volymer till ett mikrocentrifugrör för att förbereda en ny utspädning av NaOH:

- Vatten av laboratoriekvalitet (800 µl)
- 1 N NaOH (200 µl)

Resultatet är 1 ml 0,2 N NaOH.

OBS! Håll röret tillslutet. Använd den färska utspädningen inom **12 timmar**.

Denaturera ett bibliotek på 4 nM

1. Överför följande volymer till ett mikrocentrifugrör.

- 4 nM bibliotek (5 µl)
- 0,2 N NaOH (5 µl)

2. Vortexblanda kort och centrifugera vid 280 x g i en minut.

3. Inkubera i rumstemperatur i fem minuter.

4. Tillsätt 990 µl förkyld HT1 till röret som innehåller denaturerat bibliotek.

Resultatet är 1 ml 20 pM denaturerat bibliotek.

Späd ut denaturerat bibliotek på 20 pM

1. Späd ut till önskad koncentration med följande volymer.

Koncentration	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM bibliotek	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Förkyld HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Vänd för att blanda och pulscentrifugera sedan.

3. Fortsätt till sekvensering. Anvisningar finns i *MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4* (Referenshandbok för MiSeqDx-instrumentet med MOS v4) (dokumentnr 1000000157953).

Förberedelser för sekvensering med NovaSeq 6000Dx

Använd följande anvisningar för att denaturera och späda ut bibliotek för sekvensering på sekvenseringssystemet NovaSeq 6000Dx.

Förbrukningsmaterial

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (Resuspension Buffer)
- 1 N NaOH
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5

- 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
- NovaSeq 6000Dx-biblioteksror

Beredning

Förbered en *ny* utspädning av 0,2 N NaOH för att denaturera bibliotek för sekvensering. Extra volym förbereds för att förhindra att små pipetteringsfel påverkar den slutliga NaOH-koncentrationen.



FÖRSIKTIGHET!

Nyutspädd 0,2 N NaOH är avgörande för denatureringsprocessen. Felaktig denaturering kan minska avkastningen.

1. Överför följande volymer till ett mikrocentrifugrör för att späda ut 1N NaOH till 0,2 NaOH:

Tabell 4 S2-läge

Reagens	Volym för en flödescell (µl)	Volym för två flödesceller (µl)
Vatten av laboratoriekvalitet	40	80
1 N NaOH	10	20

De här volymerna resulterar i 50 µl 0,2 N NaOH för en flödescell eller 100 µl 0,2 N NaOH för två flödesceller.

Tabell 5 S4-läge

Reagens	Volym för en flödescell (µl)	Volym för två flödesceller (µl)
Vatten av laboratoriekvalitet	80	160
1 N NaOH	20	40

De här volymerna resulterar i 100 µl 0,2 N NaOH för en flödescell eller 200 µl 0,2 N NaOH för två flödesceller.

2. Vänd röret flera gånger för att blanda eller vortexblanda ordentligt.

OBS! Håll röret tillslutet. Använd den färska utspädningen inom **12 timmar**.

Skapa en normaliserad bibliotekspool

Inläsningskoncentrationen kan variera beroende på metoderna som används för biblioteksberedning, kvantifiering och normalisering.

Använd följande anvisningar för att normalisera biblioteken till lämplig koncentration och poola sedan. Bibliotek som sekvenserades på samma flödescell måste kombineras till en enda normaliserad pool.

OBS! Det maximala antalet prover som kan köras per ränna med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit är 192. Gränsen beror på det totala antalet UD-index i uppsättning A och B.

Normalisera bibliotek för poolning

- Bestäm den erforderliga sammanslagna bibliotekskoncentrationen baserat på den önskade slutliga inläsningskoncentrationen.
 - För en slutlig inläsningskoncentration på 350 pM är den erforderliga sammanslagna bibliotekskoncentrationen 1,75 nM.
 - Information om hur du bestämmer den sammanslagna bibliotekskoncentrationen för en annan slutlig inläsningskoncentration finns i [Späda ut bibliotek till startkoncentrationen på sidan 47](#).
- Normalisera biblioteken till den önskade poolade bibliotekskoncentrationen med 10 mM Tris-HCl (pH 8,5). Du kan använda [Pooling Calculator \(Poolningskalkylator\)](#) på Illuminas webbplats för räkna ut hur du späder ut bibliotek till en lämplig koncentration.

Rekommenderade inläsningskoncentrationer

Den optimala DNA-inläsningskoncentrationen beror på bibliotekstypen och insättningsstorleken. För bibliotek > 450 bp kan högre inläsningskoncentrationer vara nödvändiga.

Poola normaliserade bibliotek och tillsätta PhiX-kontroll (valfritt)

- Kombinera lämplig volym av varje normaliserat bibliotek i ett nytt mikrocentrifugrör för att få en av följande slutliga volymer:

Läge	Slutlig volym (µl)
S2	150
S4	310

- [Valfritt]** Tillsätt 1 % ej denaturerad PhiX enligt följande.
 - Späd ut 10 nM PhiX till 2,5 nM med 10 mM Tris-HCl (pH 8,5).
 - Tillsätt lämplig volym av ej denaturerad 2,5 nM PhiX till röret med ej denaturerad bibliotekspool.

Läge	Ej denaturerad 2,5 nM PhiX (µl)	Ej denaturerad bibliotekspool (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

När PhiX tillsätts är den rekommenderade mängden 1 % för att erhålla ett välbalanserat bibliotek. Bibliotek med låg mångfald kan kräva mer. Kontakta Illuminas tekniska support om du vill använda en PhiX-kontroll med bibliotek med låg mångfald.

Denaturera bibliotekspool och PhiX-kontroll (valfritt)

1. Tillsätt 0,2 N NaOH till röret med ej denaturerad bibliotekspool och PhiX (valfritt) enligt följande.

Flödescell	0,2 N NaOH	Ej denaturerad bibliotekspool (µl)	Resultierande volym
S2	37	150	187 µl eller 187,9 µl med PhiX
S4	77	310	387 µl eller 388,9 µl med PhiX

2. Sätt på locket och vortexblanda kort.
3. Centrifugera vid 280 × g i upp till en minut.
4. Inkubera i rumstemperatur i åtta minuter för att denaturera.
5. Tillsätt 400 mM Tris-HCl (pH 8,0) enligt följande för att neutralisera.

Läge	400 mM Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Resultierande volym
S2	38	225 µl eller 225,9 µl med PhiX
S4	78	465 µl eller 466,9 µl med PhiX

6. Sätt på locket och vortexblanda kort.
7. Centrifugera vid 280 × g i upp till en minut.
8. Överför hela volymen av denaturerat bibliotek eller denaturerat bibliotek och PhiX till NovaSeq 6000Dx-biblioteks-röret.
9. Fortsätt till sekvensering. Anvisningar finns i *NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation (Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx-instrumentet) (dokumentnr 200010105)*.

Felsökning

Använd följande tabell för att felsöka problem i arbetsflödet. Ytterligare felsökning kan krävas om en sekvenseringskörning eller biblioteksberedning för ett prov misslyckas två gånger. Kontakta Illuminas tekniska support.

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Sekvenseringskörningen blir inte godkänd i kvalitetskontrollen	Användar- eller laboratorieutrustningsfel i analysarbetsflödet	<p>Kvalificera anrikade bibliotek för att säkerställa lämplig biblioteksavkastning och fragmentstorleksfördelning. Upprepa biblioteksberedningen från ett av följande steg, beroende på var det misstänkta användnings- eller utrustningsfelet uppstod. Kontakta Illuminas tekniska support för att få hjälp med att felsöka körningen om du inte vet var felet uppstod eller om andra fel uppstod.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sekvensera om biblioteken. Mer information finns i Förberedelser för sekvensering med NextSeq 550Dx på sidan 48, Förberedelser för sekvensering med MiSeqDx på sidan 50 eller Förberedelser för sekvensering med NovaSeq 6000Dx på sidan 51. • Anrika biblioteken igen. Mer information finns i Hybridisering av prober på sidan 36. • Starta biblioteksberedningen från arbetsflödets början. Mer information finns i Bruksanvisning på sidan 21.
	Instrumentfel	Kontakta Illuminas tekniska support.

Observation	Möjlig orsak	Rekommenderad åtgärd
Fel vid FASTQ-generering eller allmänt sekvenseringsfel (t.ex. nätverksfel, fel vid in-/utmatning av reagens osv.)	Programvaru- eller instrumentfel	Information om FASTQ-generering finns i <i>Local Run Manager Software Guide (Programhandbok för Local Run Manager) (dokumentnr 100000002702)</i> eller i <i>NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Referenshandbok för NextSeq 550Dx-instrumentet) (dokumentnr 1000000009513)</i> , <i>MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (Referenshandbok för MiSeqDx-instrumentet med MOS v4) (dokumentnr 1000000157953)</i> eller <i>NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation (Produktdokumentation för NovaSeq 6000Dx-instrumentet) (dokumentnr 200010105)</i> . Kontakta Illuminas tekniska support för att få ytterligare hjälp.
DNA-biblioteket genererar inte tillräcklig avkastning för sekvensering	Provkraven uppfylldes inte	Säkerställ att lämpliga prover används och upprepa biblioteksberedningen. Mer information finns i Rekommendationer för prover på sidan 17 .
	Användnings- eller utrustningsfel i analysarbetsflödet	Upprepa biblioteksberedningen från ett av följande steg, beroende på var det misstänkta användnings- eller utrustningsfelet uppstod. Kontakta Illuminas tekniska support för att få hjälp med att felsöka körningen om du inte vet var felet uppstod eller om andra fel uppstod. <ul style="list-style-type: none"> • Sekvensera om biblioteken. Mer information finns i Förberedelser för sekvensering med NextSeq 550Dx på sidan 48, Förberedelser för sekvensering med MiSeqDx på sidan 50 eller Förberedelser för sekvensering med NovaSeq 6000Dx på sidan 51. • Anrika biblioteken igen. Mer information finns i Hybridisering av prover på sidan 36. • Starta biblioteksberedningen från arbetsflödets början. Mer information finns i Bruksanvisning på sidan 21.
	Kraven för anrikningsprobpanelen uppfylldes inte	Säkerställ att en lämplig anrikningsprobpanel används och upprepa biblioteksberedningen. Mer information finns i Krav på anrikningsprobpaneler på sidan 10 .

Prestandaegenskaper

Prestandaegenskaper för DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NovaSeq 6000Dx finns i *NovaSeq 6000Dx Instrument Package Insert (Bipacksedel för instrumentet NovaSeq 6000Dx)* (dokumentnr 200025276).

Prestanda med hela exompaneler

Exompanelens prestanda testades genom att använda den lägsta (50 ng) och den högsta (1 000 ng) rekommenderade provmängden från Coriell Cell Line gDNA NA12878, med en känd uppsättning för detektion av könsellsvarianter (Coriell platinum genome). Exompanel 1 (45 Mb) och exompanel 2 (36,8 Mb) användes som representativa paneler. 24 tekniska replikat testades med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen med användning av exompanel 1 (45 Mb) i två 12-plex-anrikningsreaktioner. 12 tekniska replikat testades med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen med användning av exompanel 2 (36,8 Mb) i en 12-plex-anrikningsreaktion. De anrikade biblioteken sekvenserades på ett NextSeq 550Dx-sekvenseringssystem med DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager-modulen.

Följande tabell visar medelvärdena för sekundär sekvensering och prestanda för variantbestämning för de tekniska replikat som testats med varje panel.

Tabell 6 Analysprestanda med två hela exompaneler

Panel	Utfyllda anrikade unika avläsningar	Täckningens enhetlighet	Medianvärde för fragmentlängd	SNV-sensitivitet ¹	SNV-precision ²	Indel-sensitivitet ¹	Indel-precision ²
Exom-panel 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Exom-panel 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

¹Sensitivitet = positiva/(sant positiva + falskt negativa)

²Precision = sant positiva/(sant positiva + falskt positiva)

Detektionsgräns

Referensstandarden Horizon HD799 DNA användes för att testa detektionsgränsen. HD799 består av måttligt komprometterat formalinbehandlat DNA med kända SNV:er i allelfrekvenser från 1–24,5 %. Den lägsta rekommenderade DNA-mängden (50 ng) användes och detektionshastigheten för SNV:er med en variantallelfrekvens (VAF) som var $\geq 5,0$ % utvärderades. 16 tekniska replikat testades med Illumina DNA Prep

with Enrichment Dx-analysen med FFPE-arbetsflödet, berikades med en pancanceranrikningspanel (1,94 Mb) i 16 (1-plex) anrikningar och sekvenserades sedan på ett NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulen.

Alla prover klarade de panelspecifika provprestandakraven som visas i följande tabell.

Tabell 7 Provprestanda för detektionsgräns

Panel	Variantdetektionsfrekvens för SNV:er med $\geq 5,0$ % VAF	Genomsnitt Täckningens enhetlighet
Pancanceranrikningspanel (1,94 Mb, 523 gener)	100 %	99 %

Interfererande substanser

Effekten av potentiellt störande ämnen bedömdes i Illumina DNA Prep with Enrichment Dx genom utvärdering av analysens resultat vid förekomst av störande ämnen.

Interferens i helblod

Acetaminofen (exogen förening, läkemedel), kreatinin och triglycerider (endogena metaboliter) testades genom att tillsätta dem i helblodsprover före DNA-extraktion. För att bedöma interferensen från blodtagningen (kort tagning) tillsattes EDTA i helblodproverna. Dessutom tillsattes etanol av molekylär kvalitet i DNA extraherat från helblod för att bedöma interferens som härrör från provberedningen.

Följande tabell visar testkoncentrationerna per interferent.

Tabell 8 Potentiellt störande ämnen och koncentrationer testade i helblod

Testämne	Testkoncentration
Paracetamol	15,6 mg/dl* Tre gånger den högsta koncentration som förväntas efter en terapeutisk läkemedelsdos.
Kreatinin	15 mg/dl* Den högsta observerade koncentrationen i populationen.
Triglycerider	1,5 g/dl* Den högsta observerade koncentrationen i populationen.
EDTA	6 mg/ml Tre gånger den förväntade koncentrationen i blod, uppsamlat i EDTA-rör.
Etanol av molekylär kvalitet	15 % v/v I eluatet efter DNA-extraktion.

*Enligt CLSI EP37-ED1:2018

Per interfererande substans testades tolv tekniska replikat med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen, anrikade med en exompanel 1 (45 Mb) i en enda (12-plex) anrikning, och sekvenserades sedan på ett NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulen.

För substanserna som testades uppfyllde alla tolv proverna provets prestandakrav och ingen störning i analysens prestanda observerades.

Interferens i FFPE-vävnad

Två kolorektala FFPE-prover testades med och utan hemoglobin vid 0,1 mg per 10 µm FFPE-sektion för att representera ett värsta scenario med 50 % FFPE-vävnadsprovskontaminering med blod med hög hemoglobinnivå. Proverna testades med analysen Illumina DNA Prep with Enrichment Dx och pancanceranrikningspanel 1 (1,94 Mb), som användes som en representativ panel i 1-plex-anrikningar. De anrikade biblioteken sekvenserades sedan på ett NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulen. Alla prover uppfyllde prestandakraven för prover och resultaten visade att hemoglobin inte stör analysens prestanda.

För att bedöma interferens som härrör från provberedningen tillsattes två exogena föreningar till DNA extraherat från ett FFPE-vävnadsprov av blåscancer. De exogena substanser som har testats är extraktionslösningar som vanligtvis används under DNA-extraktionsprocessen och anges med testade mängder i följande tabell.

Testsubstanslösningarna är kommersiellt tillgängliga i kolumnbaserade DNA-isoleringskit.

Tabell 9 Potentiellt störande exogena ämnen och koncentrationer testade i FFPE

Testämne	Testkoncentration (µl/30 µl eluat)
Avparaffiniseringslösning	113 x 10 ⁻⁶
Wash Buffer AW2	0,417

Per interfererande substans testades åtta tekniska replikat med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen. Testen anrikades med en pancanceranrikningspanel (1,94 Mb) i 1-plex-anrikningar och sekvenserades sedan på ett NextSeq 550Dx-instrument med DNA GenerateFASTQ Dx-modulen.

För båda substanserna som testades uppfyllde alla åtta proverna prestandakraven för prover och ingen störning av analysens prestanda observerades.

Korskontaminering

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (kvinnligt, tio prover), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (manligt, tolv prover) och negativa kontroller (NTC, två prover) testades med Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen i en plattlayout med rutmönster. Alla prover använde den högsta rekommenderade (1 000 ng) gDNA-provmängden som det strängaste villkoret för att utvärdera korskontaminering av prover. Testning utfördes två gånger av två separata operatörer. Exompanel 1 (45 Mb) användes i 12-plex-anrikningsreaktioner. De anrikade biblioteken

sekvenserades på ett NextSeq 550Dx med DNA GenerateFASTQ Dx. Utvärdering utfördes genom att bedöma täckningen av den manliga specifika Y-kromosomen i de kvinnliga proverna genom att jämföra med bakgrunds nivåer för en hel platta med kvinnliga prover samt indexrepresentation av NTC-proverna.

Tabell 10 Korskontamineringsresultat

Kvinnliga prover med manlig Y-kromosomtäckning i < 3x baslinjebur	Indexrepresentation i NTC
100 %	< 0,0005 %

Bilaga: Adaptersekvenser för UD-index från Illumina

De unika dubbla (UD) indexadapterna är arrangerade i plattan på ett sätt som upprätthåller den rekommenderade parningsstrategin. Indexadapterna är tio baser långa, istället för de typiska åtta baserna.

Index 1 (i7)-adapter

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Index 2 (i5)-adapter

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Följande sekvens används för adaptertrimning av Read 1 (Avläsning 1) och Read 2 (Avläsning 2).

CTGTCTCTTATACACATCT

Platta A/upsättning 1, indexadapter

Indexnamn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
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

Indexnamn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	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

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

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

Platta B/upsättning 2, indexadapter

Indexnamn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA

Indexnamn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	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	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGATT

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

Indexnamn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGTAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT

Indexnamn	i7-baser i adapter	i5-baser i adapter
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCOA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTA CT

Revisionshistorik

Dokument	Datum	Ändringsbeskrivning
Dokumentnr 200019584 v02	September 2022	Innehåll om sekvensering på instrumentet NovaSeq 6000Dx har lagts till.
Dokumentnr 200019584 v01	Maj 2022	Namn på sekvenseringssystem och katalognummer har lagts till. Information om unika dubbla index för enkelindexerade bibliotek har tagits bort.
Dokumentnr 200019584 v00	Maj 2022	Första versionen.

Patent och varumärken

Dokumentet och dess innehåll tillhör Illumina, Inc. och dess dotterbolag ("Illumina") och är endast avsett för användning enligt avtal i samband med kundens bruk av produkterna som beskrivs här. Allt annat bruk är förbjudet. Dokumentet och dess innehåll får ej användas eller distribueras i något annat syfte och/eller återges, delges eller reproduceras på något vis utan föregående skriftligt tillstånd från Illumina. I och med detta dokument överlåter Illumina inte någon licens som hör till dess patent, varumärke eller upphovsrätt, eller i enlighet med rättspraxis eller liknande tredjepartsrättigheter.

Instruktionerna i detta dokument ska följas till punkt och pricka av kvalificerad och lämpligt utbildad personal för att säkerställa rätt och säker produktanvändning i enlighet med beskrivning här. Hela innehållet i dokumentet ska läsas och förstås i sin helhet innan produkten (produkterna) används.

UNDERLÅTENHET ATT LÄSA OCH FÖLJA ALLA INSTRUKTIONER HÄRI I SIN HELHET KAN MEDFÖRA SKADA PÅ PRODUKTEN/PRODUKTERNA, PERSONSKADA, INKLUSIVE SKADA PÅ ANVÄNDAREN/ANVÄNDARNA ELLER ANDRA PERSONER SAMT SKADA PÅ ANNAN EGENDOM, OCH LEDER TILL ATT EVENTUELL GARANTI FÖR PRODUKTEN/PRODUKTERNA BLIR OGILTIG.

ILLUMINA KAN INTE ÅLÄGGAS NÅGOT ANSVAR SOM UPPKOMMER GENOM FELAKTIG ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA SOM BESKRIVS HÄRI (INKLUSIVE DELAR DÄRI ELLER PROGRAM).

© 2022 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

Alla varumärken tillhör Illumina, Inc. eller respektive ägare. Specifik varumärkesinformation finns på www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinformation



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800-8094566
+1 858-2024566 (utanför Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australisk sponsor

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

Märkning av produkter

En fullständig lista över symbolerna på produktens förpackning och etiketter finns i symbolförklaringen på support.illumina.com, under fliken *Documentation* (Dokumentation) för respektive produkt.