

ВИКОРИСТОВУВАТИ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ IN VITRO. ЛИШЕ ДЛЯ ЕКСПОРТУ.

## Передбачене використання

Набір Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit — це комплект реагентів і витратних матеріалів, що використовуються для підготовки бібліотек зразків із геномної ДНК, отриманої з клітин і тканин людини, з метою розроблення аналізів для діагностики *in vitro*. Для підготовки бібліотек, націлених на конкретні досліджувані геномні ділянки, потрібні панелі зондів, які надає користувач. Отримані бібліотеки зразків призначені для використання в системах секвенування Illumina. До набору Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx додається програмне забезпечення для налаштування прогону секвенування, моніторингу та аналізу.

## Принципи виконання процедури

Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit призначений для ручної підготовки бібліотек секвенування ДНК, збагачених цільовими ділянками геномної ДНК, отриманої з клітин і тканин людини.

Для збагачення цільових ділянок необхідні панелі біотинільованих олігонуклеотидів, що постачаються користувачем. Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit сумісний з панелями різних розмірів: від малих (< 20 000 зондів) до великих (> 200 000 зондів). Створені збагачені бібліотеки призначені для секвенування на системах секвенування Illumina.

Процедура використання реагентів, що входять у Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, складається із зазначених далі етапів.

- **Тагментація геномної ДНК** — використовується Enrichment BLT Small (eBLTS) для тагментації вхідних ДНК. Під час тагментації гДНК фрагментується та маркується адаптерами за один етап. Для насичення eBLTS в реакції тагментації необхідна мінімальна кількість вхідної ДНК 50 нг. У стані насичення eBLTS фрагментує певну кількість молекул ДНК для створення нормалізованих бібліотек зі стабільним розподілом фрагментів за розміром.
- **Очищення після тагментації** — очищує марковану адаптером ДНК на eBLTS для використання в ампліфікації.
- **Ампліфікація тагментованої ДНК** — ампліфікує тагментовану ДНК за допомогою програми ПЛР з обмеженою кількістю циклів. Унікальні подвійні (UD) індекси приєднуються до кінців фрагментів ДНК, що забезпечує подвійне унікальне штрихкодування бібліотек ДНК та генерацію кластерів під час секвенування.
- **Очищення бібліотек** — використовує процедуру очищення на магнітних гранулах для очищення ампліфікованих бібліотек ДНК та їх селекції за розміром.
- **Об'єднання бібліотек у пул** — об'єднує бібліотеки ДНК з унікальними індексами в один пул, що містить до 12 бібліотек. Ви можете об'єднувати бібліотеки в пул за об'ємом або за масою.

- **Гібридизація зондів** — складається з реакції гібридизації, під час якої дволанцюгові бібліотеки ДНК денатурують, а панель біотинільованих ДНК-зондів гібридизується з цільовими ділянками геному.
  - Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit сумісний із кількома панелями. Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не містить панелі збагачення. Панелі зондів постачаються користувачем і мають відповідати необхідним нормативам. Реагенти, що входять у Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, сумісні з панелями збагачення на основі ДНК-олігонуклеотидів як від Illumina, так і від сторонніх постачальників (панелі мають відповідати необхідним нормативам). Інформацію про необхідні нормативи для панелей сторонніх виробників див. у розділі [Вимоги до панелі зондів для збагачення на стор. 11](#)
- **Захоплення гібридизованих зондів** — використовує стрептовідинові магнітні гранули (Streptavidin Magnetic Beads, SMB3) для захоплення біотинільованих зондів, гібридизованих із цільовими ділянками, що становлять інтерес.
- **Ампліфікація збагачених бібліотек** — використовує ПЛР для ампліфікації збагачених бібліотек.
- **Очищення ампліфікованих збагачених бібліотек** — використовує процедуру очищення на магнітних гранулах для отримання чистих збагачених бібліотек, готових до секвенування.
- **Секвенування** — секвенування збагачених бібліотек виконується на системах секвенування MiSeqDx™, NextSeq 550Dx™ або NovaSeq 6000Dx™. У секвенаторах MiSeqDx для налаштування прогону секвенування, моніторингу перебігу аналізу та генерації файлів FASTQ на основі розпізнавання азотистих основ використовується інтегрований модуль DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager. У секвенаторах NextSeq 550Dx із сервером DRAGEN та NovaSeq 6000Dx для налаштування прогону та вторинного аналізу з кількома доступними робочими процесами використовується застосунок DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

## Обмеження процедури

- Використовувати для діагностики *in vitro*.
- Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit сумісний із геномною ДНК, отриманою з клітин і тканин людини.
- Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit сумісний із дволанцюговою гДНК у кількості від 50 до 1000 нг. Робочі характеристики не гарантуються для внесень поза цими межами.
- Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не містить реагентів для екстракції ДНК. Результати аналітичних випробувань, зокрема випробувань на інтерференцію, наведені в розділі [Технічні характеристики на стор. 63](#), були отримані з використанням цільної крові та FFPE як репрезентативних типів зразків і репрезентативних наборів для екстракції ДНК. Усі діагностичні тести, розроблені для використання з реагентами, що входять у Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, потребують повної валідації за всіма аспектами робочих характеристик із вибраним набором для екстракції ДНК.

- Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не рекомендований для зразків FFPE низької якості з  $\Delta Cq > 5$ . Використання зразків із  $\Delta Cq > 5$  може підвищити ймовірність збою під час підготовки бібліотеки та знизити робочі характеристики аналізу.
- Реагенти, що входять у Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, було налаштовано й випробувано для внесення зразка, реакцій збагачення та рівня плексності, зазначених у таблиці нижче.

Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Внесення зразка	Реакції збагачення	Плексність збагачення
Набір на 16 зразків	Низька якість (FFPE)	16 реакцій	1-plex
Набір на 96 зразків	Висока якість (наприклад, цільна кров)	8 реакцій	12-plex

- Обробку внесень FFPE було випробувано, і її рекомендовано виключно для реакцій збагачення 1-plex із використанням набору на 16 зразків.
- Для набору на 96 зразків можливі нестандартні рівні плексності (від 2-plex до 11-plex), але вони мають такі обмеження:
  - Обробка зразків у реакціях збагачення від 2-plex до 11-plex зменшує пропускну здатність набору.
  - Оптимальні результати не гарантовані. Для отримання прийняттого виходу збагачення при нестандартних рівнях плексності може знадобитися додаткова оптимізація.
  - Для стратегій пулінгу з низькою плексністю (від 2-plex до 8-plex) для оптимізації колірного балансу, необхідного для успішного секвенування та аналізу даних, потрібно вибирати індексні адаптери з різноманітними послідовностями. Модуль DNA GenerateFASTQ Dx на секвенаторах MiSeqDx і NextSeq 550Dx надає варіанти колірно збалансованих комбінацій індексів під час налаштування прогону. Докладніші відомості про стратегії пулінгу див. у розділі [Методи об'єднання в пул на стор. 38](#).
- Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit обмежується отриманням збагачених бібліотек, які секвенують лише на приладах MiSeqDx, NextSeq 550Dx і NovaSeq 6000Dx. Використання інших систем секвенування потребує повної валідації за всіма аспектами робочих характеристик.
- Панелі збагачення не входять до складу цього продукту. Результати аналітичних випробувань, наведені в розділі [Технічні характеристики на стор. 63](#), було отримано з використанням репрезентативних панелей збагачення й надано лише з інформаційною метою. Характеристики аналітичної ефективності слугують для ілюстрації загальних можливостей аналізу й не визначають можливості або придатність будь-яких конкретних заявлених характеристик аналізу. Усі діагностичні тести, розроблені для використання з цими реагентами, потребують повної валідації за всіма аспектами робочих характеристик.

- Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit сумісний як із панелями збагачення Illumina, так і зі сторонніми панелями. Однак робочі характеристики зі сторонніми панелями збагачення, що не відповідають вимогам до панелей, не гарантовані. Відомості про вимоги до панелей див. у розділі [Вимоги до панелі зондів для збагачення на стор. 11](#).
- Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit передбачає 2-годинний час гібридизації. Довша тривалість гібридизації може вплинути на робочі характеристики.
- Модулі DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager для MiSeqDx формують лише файли FASTQ. Якщо ви використовуєте ці модулі, потрібно виконати валідацію вторинного аналізу.
- Застосунок DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx доступний на секвенаторах NextSeq 550Dx із сервером DRAGEN і NovaSeq 6000Dx. Застосунок підтримує кілька робочих процесів вторинного аналізу, зокрема генерування FASTQ, генерування FASTQ і VCF для виявлення гермінальних варіантів, а також генерування FASTQ і VCF для виявлення соматичних варіантів. Якщо ви використовуєте застосунок для генерування VCF, виконувати валідацію вторинного аналізу не потрібно. Обмеження застосунку наведені нижче:
  - Інсерції довжиною >18 п. о. і делеції довжиною >21 п. о. не було валідовано.
  - Великі варіанти, зокрема багатонуклеотидні варіанти (MNV) і великі індели, можуть звітуватися як окремі менші варіанти у вихідному файлі VCF.
  - Невеликі MNV повідомляються у вихідному VCF-файлі як окремі варіанти.
  - Делеції повідомляються у VCF-файлі в координаті попередньої основи відповідно до формату VCF. Тому, перш ніж повідомляти про окреме розпізнавання основи як про гомозиготний еталонний варіант, розгляньте суміжні варіанти.
  - Обмеження, що стосуються варіантів зародкової лінії.
    - Робочий процес аналізу для генерації файлів FASTQ та VCF зародкової лінії у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx призначений для надання якісних результатів визначення гермінальних варіантів (наприклад, гомозигота, гетерозигота, дикий тип).
    - Варіація числа копій може впливати на визначення варіанта гомозиготним чи гетерозиготним.
    - Система не повідомлятиме більше двох варіантів в одному локусі, навіть за наявності варіації числа копій.
  - Обмеження, що стосуються соматичних варіантів.
    - Робочий процес аналізу для генерації файлів FASTQ та VCF соматичних варіантів у застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx призначений для надання якісних результатів визначення соматичних варіантів (тобто наявності соматичного варіанта).
    - Робочий процес аналізу для генерації файлів FASTQ та VCF соматичних варіантів не може відрізнити гермінальні варіанти від соматичних. Робочий процес призначений для виявлення варіантів у діапазоні частот варіанта, але частоту варіанта не можна використовувати для розрізнення соматичних і гермінальних варіантів.

- Нормальна тканина в зразку впливає на виявлення варіантів. Зареєстрована межа виявлення базується на частоті варіанта відносно загальної ДНК, екстрагованої як із пухлини, так і з нормальної тканини.
- Якщо в одному локусі визначено більше одного варіантного алеля, жоден із цих алелів не буде визнано варіантом, що проходить. Натомість буде повідомлено повний набір алелів, але його буде відфільтровано за тегом «multiallelic» (мультиалельний).

## Компоненти виробу

Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit складається з таких компонентів:

- набір A Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з індексами UD, № 20051354 (16 зразків) або № 20051352 (96 зразків) за каталогом;
- набір B Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з індексами UD, № 20051355 (16 зразків) або № 20051353 (96 зразків) за каталогом;
- модуль Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx для MiSeqDx, № 20063022 за каталогом;
- застосунок DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx для NovaSeq 6000Dx, № 20074609 за каталогом;
- застосунок DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx для NextSeq 550Dx, № 20074730 за каталогом.

## Реагенти в комплекті

Для виконання аналізу Illumina DNA Prep with Enrichment Dx потрібен набір A Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з індексами UD або набір B Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з індексами UD. Використовуючи набір на 16 або 96 зразків, можна виконати вказану далі кількість реакцій підготовки бібліотек та збагачення.

Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Внесення зразка	Реакції збагачення	Плексність збагачення
Набір на 16 зразків	Низька якість (FFPE)	16 реакцій	1-plex
Набір на 96 зразків	Висока якість (наприклад, цільна кров)	8 реакцій	12-plex

## Набір для підготовки бібліотек зі збагаченням Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з індексами UD, A/B

Реагенти для тагментації Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, зберігати за температури від 15 °C до 30 °C

Наведені нижче реагенти постачаються за кімнатної температури. Щоб забезпечити належну ефективність, негайно помістіть реагенти на зберігання за вказаної температури.

Назва реактиву	Кількість пробірок		Колір ковпачка	Об'єм наповнення	Активні фармацевтичні складники
	16 зразків (№ 20050020)	96 зразків (№ 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Червоний	350 мкл	Розчин очищувального засобу у воді.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Зелений	41 мл	Буферний водний розчин, що містить очищувальний засіб та сіль.
Cleanup Beads (CB)	1	Н/Д*	Червоний	10 мл	Твердофазні парамагнітні гранули в буферному водному розчині.

\* Парамагнітні гранули Cleanup Beads на 96 зразків входять у набір зразків Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (№ 20050030).

**Магнітні гранули Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 зразків), зберігати за температури від 15 °C до 30 °C**

У наборах на 96 зразків Cleanup Beads входять до складу реактиву Illumina Prep Dx Cleanup Beads (№ 20050030 за каталогом). Зазначений далі реагент постачається за кімнатної температури. Щоб забезпечити належну ефективність, негайно помістіть реагенти на зберігання за вказаної температури. У наборах на 16 зразків Cleanup Beads включені до реагентів для тагментації Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (№ 20050020 за каталогом).

Назва реактиву	Кількість	Колір ковпачка	Об'єм наповнення	Активні фармацевтичні складники
Cleanup Beads (CB)	4	Червоний	10 мл	Твердофазні парамагнітні гранули в буферному водному розчині.

## Реагенти для тагментації Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, зберігати за температури від 2 °C до 8 °C

Наведені нижче реагенти постачаються в охолоджену стані. Щоб забезпечити належну ефективність, негайно помістіть реагенти на зберігання за вказаної температури. Зберігайте пробірку зі стоковим розчином eBLTS у вертикальному положенні, щоб гранули завжди були занурені в буфер.

Назва реактиву	Кількість пробірок		Колір ковпачка	Об'єм наповнення		Активні фармацевтичні складники
	16 зразків (№ 20050021)	96 зразків (№ 20050026)		16 зразків	96 зразків	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Жовтий	200 мкл	290 мкл	Магнітні гранули стрептавідину, зв'язані з транспосомами, у буферному водному розчині, що містить гліцерол, ЕДТК, дитиотреїтол, сіль та очищувальний засіб.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Прозорий	1,8 мл	1,8 мл	Буферний водний розчин.

## Реагенти для тагментації Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, зберігати за температури від -25 °C до -15 °C

Наведені нижче реагенти постачаються замороженими. Щоб забезпечити належну ефективність, негайно помістіть реагенти на зберігання за вказаної температури.

Назва реактиву	Кількість пробірок		Колір ковпачка	Об'єм наповнення		Активні фармацевтичні складники
	16 зразків (№ 20050022)	96 зразків (№ 20050027)		16 зразків	96 зразків	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Прозорий	290 мкл	290 мкл	Буферний водний розчин, що містить сіль магнію та диметил-формамід.
Enhanced ПЛР Mix (EPM)	2	4	Прозорий	200 мкл	610 мкл	ДНК-полімераза й дНТФ у буферному водному розчині.

## Реагенти для збагачення бібліотек Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 зразків), зберігати за температури від 2 °C до 8 °C

У наборах на 16 зразків наведені далі реагенти входять до складу комплекту реагентів для збагачення Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (№ 20050023 за каталогом). У наборах на 96 зразків реагенти входять до складу комплекту реагентів Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (№ 20050028 за каталогом).

Наведені нижче реагенти постачаються в охолоджену стані. Щоб забезпечити належну ефективність, негайно помістіть реагенти на зберігання за вказаної температури.

Назва реактиву	Кількість пробірок	Колір ковпачка	Об'єм наповнення	Активні фармацевтичні складники
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Прозорий	1,2 мл	Магнітні гранули стрептавідину в буферному водному розчині, що містить формамід, очищувальний засіб і сіль.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Прозорий	1,8 мл	Буферний водний розчин.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Прозорий	200 мкл	Буферний водний розчин, що містить очищувальний засіб та сіль.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Прозорий	200 мкл	Буферний водний розчин.

## Реагенти для збагачення бібліотек Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 зразків), зберігати за температури від 2 °C до 8 °C

У наборах на 96 зразків наведені далі реагенти входять до комплекту реагентів Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (№ 20050028 за каталогом). У наборах на 16 зразків реагенти входять до комплекту реагентів Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (№ 20050023 за каталогом).

Наведені нижче реагенти постачаються в охолоджену стані. Щоб забезпечити належну ефективність, негайно помістіть реагенти на зберігання за вказаної температури.

Назва реактиву	Кількість пробірок	Колір ковпачка	Об'єм наповнення	Активні фармацевтичні складники
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Прозорий	1,2 мл	Магнітні гранули стрептавідину в буферному водному розчині, що містить формамід, очищувальний засіб і сіль.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Прозорий	1,8 мл	Буферний водний розчин.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Прозорий	200 мкл	Буферний водний розчин, що містить очищувальний засіб та сіль.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Прозорий	200 мкл	Буферний водний розчин.

## Реагенти для збагачення бібліотек Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, зберігати за температури від -25 °C до -15 °C

Наведені нижче реагенти постачаються замороженими. Щоб забезпечити належну ефективність, негайно помістіть реагенти на зберігання за вказаної температури.

Назва реактиву	Кількість пробірок		Колір ковпачка	Об'єм наповнення	Активні фармацевтичні складники
	16 зразків (№ 20050024)	96 зразків (№ 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Прозорий	580 мкл	Розчин очищувального засобу у воді.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Бурштиновий	4,1 мл	Буферний водний розчин, що містить солі та очищувальний засіб.
ПЛР Primer Cocktail (PPC)	1	1	Прозорий	320 мкл	Суміш праймерів для ПЛР (олігонуклеотиди).
2 N NaOH (HP3)	1	1	Прозорий	200 мкл	Розчин 2N гідроксиду натрію (NaOH).

Назва реактиву	Кількість пробірок		Колір ковпачка	Об'єм наповнення	Активні фармацевтичні складники
	16 зразків (№ 20050024)	96 зразків (№ 20050029)			
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Синій	480 мкл	Буферний водний розчин із ДНК Cot-1, агентом макромолекулярного витіснення та формамідом.
Enhanced ПЛР Мік (ЕРМ)	2	1	Прозорий	200 мкл	ДНК-полімераза та dNTP у буферному водному розчині.

## Набір індексів A/B Illumina Unique Dual Index Dx, зберігати за температури від -25 °C до -15 °C

Наведені нижче реагенти постачаються замороженими. Щоб забезпечити належну ефективність, негайно помістіть реагенти на зберігання за вказаної температури. Для отримання інформації щодо послідовностей індексних адаптерів див. [Додаток. Послідовності адаптерів індексів UD Illumina на стор. 69.](#)

Компонент	Кількість
Набір A Illumina Unique Dual Index Dx (96 індексів), № 20050038	1
Набір B Illumina Unique Dual Index Dx (96 індексів), № 20050039	1

## Реагенти, яких немає в комплекті

### Необхідні реагенти, не включені до комплекту

- Реагенти для екстрагування та очищення ДНК
- Реагенти для кількісного визначення ДНК
- Етанол (міцність 200 для молекулярно-біологічного застосування)
- Вода без нуклеаз
- 10 мМ Tris-HCl, pH 8,5
- Розчин 1N NaOH, для молекулярно-біологічного застосування
- Якщо використовується система секвенування NextSeq 550Dx:
  - 200 мМ Tris, pH 7,0 (можна розбавляти з 1 M Tris-HCL, pH 7,0)

- Набір реагентів NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (на 300 циклів) (№ 20028871 за каталогом)
- Якщо використовується система секвенування MiSeqDx:
  - Набір реагентів MiSeqDx Reagent Kit v3 (№ 20037124 за каталогом)
- Якщо використовується система секвенування NovaSeq 6000Dx:
  - 400 мМ Tris, рН 8,0 (можна розбавляти з 1 М Tris-HCL, рН 8,0)
  - Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (на 300 циклів) (№ 20046931 за каталогом)
  - Набір реагентів NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (на 300 циклів) (№ 20046933 за каталогом)
  - Картридж із буферами NovaSeq™ 6000Dx S2; (№ 20062292 за каталогом)
  - Картридж із буферами NovaSeq 6000Dx S4; (№ 20062293 за каталогом)
  - Пробірка з бібліотекою NovaSeq 6000Dx (№ 20062290 за каталогом)
  - Пробірка з бібліотекою NovaSeq 6000Dx, 24 шт. (№ 20062291 за каталогом)

## Вимоги до панелі зондів для збагачення

Реагенти, що входять у Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, сумісні з панелями збагачення на основі ДНК-олігонуклеотидів як від Illumina, так і від сторонніх виробників. Якщо використовуються сторонні біотинільовані зонди ДНК (стандартні або користувацькі панелі), переконайтеся, що вони відповідають потрібним нормативам.

Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit було оптимізовано та валідовано за наведеними нижче нормативами для сторонніх панелей. У разі використання сторонніх панелей, що не відповідають цим нормативам, аналогічна ефективність не гарантована.

- Довжина зондів 80 п. о. або 120 п. о.
- Від 500 до 675 000 зондів
- Одноланцюгова або дволанцюгова ДНК
- Загальна кількість внесених зондів  $\geq 3$  пмоль для збагачення з плексністю від 1-plex до 12-plex

## Зберігання й поводження

- Кімнатною температурою вважається температура від 15 °C до 30 °C.
- Реагенти є стабільними за умови зберігання за наведених температур до завершення терміну придатності, указанного на етикетках наборів. Температури зберігання див. у розділі [Реагенти в комплекті на стор. 5](#).
- Заморожені реагенти є стабільними максимум протягом чотирьох циклів заморожування-розморожування, що відбуваються до настання зазначеної дати закінчення терміну придатності.
- Процедура роботи, яку передбачає Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, має такі безпечні точки зупинки:

- Після етапу [Ампліфікація тагментованої ДНК на стор. 32](#) ампліфіковані бібліотеки зберігають стабільність до 30 днів у разі зберігання за температури від -25 °C до -15 °C.
- Після етапу [Очищення бібліотек на стор. 34](#) очищені ампліфіковані бібліотеки зберігають стабільність до 30 днів у разі зберігання за температури від -25 °C до -15 °C.
- Після етапу [Об'єднання бібліотек перед збагаченням на стор. 37](#) об'єднані бібліотеки зберігають стабільність до 30 днів у разі зберігання за температури від -25 °C до -15 °C.
- Після етапу [Ампліфікація збагаченої бібліотеки на стор. 49](#) планшет зі збагаченими ампліфікованими бібліотеками може залишатися в термоциклері до 24 годин. Або ж планшет можна зберігати за температури від 2 °C до 8 °C до 48 годин.
- Остаточні очищені збагачені бібліотеки зберігають стабільність до 7 днів у разі зберігання за температури від -25 °C до -15 °C.
- Якщо будь-яку частину пакування або реагентів, що входять у Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, пошкоджено або порушено їхню цілісність, зверніться до служби технічної підтримки компанії Illumina.
- Буфер Stop Tagment Buffer 2 (ST2) може утворювати видимий осад або кристали. Якщо спостерігається осад, нагрівайте за температури 37 °C протягом 10 хвилин, а потім перемішуйте на вихровій мішалці, доки осад не розчиниться.
- Реагенти Hybridization Oligos (HYB) і Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) потрібно попередньо нагріти до тієї самої температури, що й температура витримки під час гібридизації, яка застосовується для відповідного типу зразка та панелі зондів. Докладніші відомості про поводження з NHB2 і EEW див. у розділі [Зауваження до процедур на стор. 17](#).
- Реагенти Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) і HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) можуть утворювати кристали та ставати каламутними. Якщо спостерігаються кристали й каламутність, перемішайте на вихровій мішалці або пропіпетуйте вгору-вниз, доки розчин не стане прозорим. Обов'язково попередньо нагрійте NHB2 перед піпетуванням.
- Під час роботи з магнітними гранулами Cleanup Beads (CB) дотримуйтеся наведених нижче рекомендацій:
  - Ніколи не заморожуйте гранули.
  - Безпосередньо перед використанням перемішайте гранули на вихровій мішалці до ресуспендування, щоб колір став однорідним.
- Під час роботи з Enrichment BLT Small (eBLTS) дотримуйтеся наведених нижче рекомендацій:
  - Зберігайте пробірку eBLTS у вертикальному положенні, щоб гранули завжди були занурені в буфер.
  - Ретельно перемішуйте eBLTS на вихровій мішалці, доки гранули не буде ресуспендовано. Щоб уникнути повторного осідання гранул, рекомендовано не проводити центрифугування перед піпетуванням.
  - Якщо гранули прилипли до стінки або верхньої частини 96-лункового планшета, центрифугуйте на 280 xg протягом 3 секунд, а потім пропіпетуйте для ресуспендування.

- Під час роботи з планшетами індексних адаптерів дотримуйтеся наведених нижче рекомендацій:
  - Не додавайте зразки на планшет індексних адаптерів.
  - Кожна лунка індексного планшета призначена лише для одноразового використання.

## Потрібне обладнання й матеріали, що не надаються

Перед початком виконання протоколу переконайтеся, що у вас є не тільки Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, а й інше необхідне обладнання та матеріали.

### Обладнання

Перед початком виконання протоколу переконайтеся в наявності необхідного обладнання.

Протокол було оптимізовано та валідовано за наведеними нижче нормативами для сторонніх панелей. У разі використання обладнання, характеристики якого не відповідають технічним вимогам, аналогічна ефективність не гарантована.

Деякі компоненти потрібні лише для певних робочих процесів. Ці компоненти зазначено в окремих таблицях.

- Ампліфікатор (термоциклер) з наведеними нижче характеристиками.
  - Кришка з підігрівом
  - Мінімальний діапазон контролю температури від 10 °C до 98 °C
  - Мінімальна точність температури  $\pm 0,25$  °C
  - Максимальний об'єм реакційної суміші 100 мкл
  - Сумісність із 96-лунковими планшетами для ПЛР з повним бортиком
- Інкубатор для мікророзривів із такими характеристиками:
  - Діапазон температур навколишнього середовища від +5,0 °C до 99,0 °C
  - Сумісність із 96-лунковими планшетами MIDI
- Вставки в інкубатор для мікророзривів, сумісні з 96-лунковими планшетами MIDI
- Високошвидкісний шейкер для мікропланшетів із діапазоном швидкості змішування 200–3000 об/хв
- Магнітний штатив, сумісний з 96-лунковими планшетами для ПЛР
- Магнітний штатив, сумісний з 96-лунковими планшетами MIDI
- Фторометр, сумісний з обраним методом кількісного визначення
- Аналізатор фрагментів ДНК
- Прецизійні піпетки:
  - Одноканальні та багатоканальні піпетки, 10 мкл

- Одноканальні та багатоканальні піпетки, 20 мкл
- Одноканальні та багатоканальні піпетки, 200 мкл
- Одноканальні піпетки, 1000 мкл
- Прецизійні піпетки забезпечують точну подачу реагенту та зразка. Одноканальні або багатоканальні піпетки можна використовувати, якщо вони регулярно калібруються і мають точність у межах 5 % від зазначеного об'єму.
- Центрифуга для мікропланшетів
- Мікроцентрифуга
- Одна з таких систем секвенування Illumina:
  - Секвенатор MiSeqDx, № DX-410-1001 за каталогом
  - Секвенатор NextSeq 550Dx, № 20005715 за каталогом, з додатковим сервером Illumina DRAGEN для NextSeq 550Dx, № 20086130 за каталогом
  - Секвенатор NovaSeq 6000Dx, № 20068232 за каталогом
- [Необов'язково] Вакуумний концентратор
- [FFPE] Система виявлення ПЛР у режимі реального часу

## Матеріали

Перед початком виконання протоколу переконайтеся в наявності необхідних матеріалів.

Деякі компоненти потрібні лише для певних робочих процесів. Ці компоненти зазначено в окремих таблицях.

Протокол оптимізовано та затверджено з використанням перелічених пунктів. У разі використання альтернативних матеріалів аналогічна ефективність не гарантується.

- Наконечники для піпеток з фільтрами
- Конічні центрифужні пробірки, 15 мл або 50 мл
- Мікроцентрифужні пробірки на 1,5 мл
- Багатоканальні резервуари для реагентів, що не містять РНКаз/ДНКаз, одноразові
- 8-пробіркові стрип-панелі та їхні кришки, що не містять РНКаз/ДНКаз
- Серологічні піпетки
- 96-лунковий поліпропіленовий глибоколунковий планшет для зберігання об'ємом 0,8 мл (планшет MIDI)
- 96-лункові планшети для ПЛР Hard-Shell з повним бортиком
- [FFPE] Планшети для кПЛР, сумісні з секвенатором для кПЛР
- Клейкі плівки для герметизації до планшетів на 96 лунок з такими характеристиками:
  - прозора поліефірна плівка, що знімається;

- підходить для ПЛР-планшетів із бортиком;
- міцний клей, який витримує численні перепади температури від -40°C до 110°C;
- без ДНКази/РНКази.
- Пластикові витратні матеріали, сумісні з обраним методом кількісного визначення
- Набір для флуориметричного кількісного визначення длДНК, сумісний з обраною системою кількісного аналізу:
  - Для кількісного визначення ампліфікованих бібліотек до збагачення можна використовувати набір для кількісного аналізу в широкому діапазоні.
  - Для кількісного визначення збагачених бібліотек діапазон набору для кількісного аналізу залежить від обраної панелі зондів.
- Набір для аналізу фрагментів для оцінки якості бібліотек, сумісний з обраною системою аналізу:
  - Для оцінки якості ампліфікованих бібліотек до збагачення можна використовувати набір широкого діапазону.
  - Для оцінки якості збагачених бібліотек діапазон набору для оцінки якості залежить від обраної панелі зондів.
- [Необов'язково] Набір для екстракції ДНК із клітин і тканин людини. ви можете використовувати будь-який валідований метод екстракції.

## Узяття, транспортування та зберігання зразків



### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Зі зразками потрібно поводитися так, ніби вони потенційно інфіковані.

- Цей аналіз сумісний із геномною ДНК, отриманою із клітин і тканин людини.
- У разі використання очищеної гДНК, доступної в продажу, переконайтеся, що зразки транспортувалися за належних умов і зберігалися відповідно до інструкцій виробника. Дотримуйтеся найкращих практик зберігання та циклів заморожування-розморожування гДНК.
- У разі введення цільної крові дотримуйтеся вимог щодо взяття, транспортування та зберігання крові, які застосовуються до обраного методу екстракції ДНК. Можна використовувати будь-який валідований метод екстракції. Транспортування цільної крові має відповідати державним, федеральним, регіональним та місцевим нормам щодо транспортування збудників захворювань.
- Для екстрагування ДНК із тканини FFPE можна використовувати будь-який валідований метод екстракції. Дотримуйтеся інструкцій та рекомендацій, що застосовуються до обраного методу екстракції, для визначення таких процедур:
  - Метод фіксації формаліном і заливки парафіном для тканин, щоб забезпечити найкращу якість виділеної ДНК.
  - Зберігання зразків FFPE.

- Вимоги до вихідного матеріалу, такі як кількість і товщина зрізів FFPE. Для більшості методів очищення рекомендовано використовувати свіжовиготовлені зрізи тканин.

## Попередження та запобіжні заходи

- Реагенти, що входять у набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, містять потенційно небезпечні хімічні речовини. Вдихання, проковтування, потрапляння на шкіру та в очі може завдати шкоди здоров'ю. Надягайте захисне приладдя, зокрема засоби захисту очей, рукавички та лабораторний одяг, з урахуванням ризику впливу. Поводьтеся з використаними реагентами як із хімічними відходами й утилізуйте їх відповідно до застосованих регіональних, державних і місцевих законів та нормативних правил. Для отримання додаткової інформації про захист довкілля, охорону праці та техніку безпеки, див. паспорти безпеки продукції (SDS) на вебсайті [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).
- негайно повідомляйте про всі серйозні інциденти, пов'язані з цим виробом, у компанію Illumina й компетентні установи держав, у яких перебувають користувач і пацієнт.
- Зі зразками крові слід поводитися так, ніби вони заражені вірусом імунодефіциту людини (ВІЛ), вірусом гепатиту В людини (HBV) або іншими збудниками, що передаються через кров (універсальні заходи застереження).
- Використовуйте стандартні заходи застереження, прийняті в лабораторії. Не виконуйте піпетування ротом. Не вживайте їжу або напої і не паліть у робочих зонах. Під час роботи зі зразками та реагентами з набору надягайте одноразові рукавички й лабораторний одяг. Після роботи зі зразками та реагентами з набору ретельно мийте руки.
- Щоб запобігти погіршенню характеристик зразка або реагенту, перед прогоном протоколу переконайтеся, що всі випари гіпохлориту натрію після очищення повністю розсіялися.
- Забруднення зразків іншими продуктами або ампліконами ПЛР може призвести до неточних і недостовірних результатів. Щоб уникнути забруднення, дотримуйтеся наведених далі рекомендацій.
  - Дотримуйтеся правил належної лабораторної практики та гігієни.
  - Виконуйте етапи робочого процесу у спеціально відведених зонах преампліфікації та постампліфікації.
  - Зберігайте використані реагенти перед очищенням бібліотек у зоні преампліфікації.
  - Відокремлюйте реагенти для преампліфікації від реагентів для постампліфікації.
  - Виділіть для зон преампліфікації та постампліфікації спеціальне обладнання, як-от піпетки, наконечники піпеток, вихрову мішалку й центрифугу.
- Уникайте перехресного забруднення. Використовуйте свіжі наконечники піпеток для кожного зразка та для дозування різних реагентів. Використання наконечників із фільтрами знижує ризик перенесення ампліконів та перехресного забруднення між зразками.
  - Під час додавання або перенесення зразків чи майстер-сумішей реагентів змінюйте наконечники після кожного зразка.

- Під час додавання індексних адаптерів за допомогою багатоканальної піпетки змінюйте наконечники після кожного рядка або кожного стовпця. Якщо використовується одноканальна піпетка, змінюйте наконечники після кожного зразка.
- Прибирайте невикористані планшети індексних адаптерів з робочої зони.
- Використовуйте наведені далі передові практики для етапів промивання етанолом.
  - Завжди готуйте свіжий 80%-й етанол. Етанол може поглинати воду з повітря, що може вплинути на результати.
  - Під час етапів промивання забезпечте видалення усього вмісту етанолу з дна лунок. Залишковий етанол може вплинути на результати.
  - Для забезпечення повного випаровування дотримуйтеся вказаного часу сушіння під час етапів на магнітній підставці. Залишковий етанол може впливати на ефективність наступних реакцій.
- Завжди готуйте майстер-суміші перед використанням і ніколи не зберігайте об'єднані робочі розчини.
- У разі недотримання процедур, описаних в інструкції з використання, технічні характеристики, які передбачає Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, не гарантовані.
- Заборонено використовувати компоненти набору, якщо минув термін придатності, вказаний на етикетці упаковки набору.
- Не замінійте компоненти набору на компоненти з інших наборів Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Набори ідентифікуються за етикеткою на упаковці.

## Зауваження до процедур

### Рекомендації щодо кількості вхідної ДНК

Протокол роботи з реагентами, що входять у Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, сумісний із високоякісною дволанцюговою геномною ДНК (гДНК) у кількості 50–1000 нг на вході.

Переконайтеся, що вихідний зразок гДНК не містить > 1 мМ ЕДТК і його очищено від органічних забруднювачів, таких як фенол та етанол. Ці речовини можуть перешкоджати реакції тагментації і призводити до невдалого завершення аналізу.

#### Кількість вхідної гДНК $\geq$ 50 нг

Для кількості вхідної гДНК від 50 до 1000 нг кількісне визначення та нормалізація вихідного зразка гДНК не потрібні.

#### Кількість вхідної гДНК < 50 нг

Можна використовувати від 10 до 50 нг вхідної ДНК з урахуванням таких коригувань:

- У разі використання 10–49 нг вхідної гДНК рекомендовано кількісно визначити вихідний зразок гДНК, щоб встановити кількість циклів ПЛР, необхідних після тагментації. Використовуйте флуориметричний метод для кількісного визначення вхідної дволанцюгової гДНК. Уникайте методів, що вимірюють загальну кількість нуклеїнових кислот, наприклад NanoDrop або інших методів на основі УФ-поглинання.
- Цей протокол не нормалізує вихід кінцевих бібліотек перед збагаченням, отриманих із 10–49 нг гДНК, тому кількісне визначення та нормалізація бібліотек до та після збагачення є необхідними.
- Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit пройшов характеристизацію та верифікацію для кількості вхідної ДНК 50–1000 нг. Еквівалентна ефективність продукту не може бути гарантована для вхідної гДНК < 50 нг.

## Рекомендації щодо кількості вхідної крові

Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit сумісний із гДНК, виділеною з периферичної цільної крові. Можна використовувати будь-який валідований метод екстракції. Під час екстрагування гДНК із цільної крові початкове кількісне визначення вхідної ДНК не потрібне, оскільки Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit забезпечує нормалізовані виходи бібліотек перед збагаченням.

Негативно вплинути на кількість ДНК, отриманої зі зразків цільної крові отже, і на нормалізацію бібліотеки можуть такі фактори:

- вік зразка крові;
- умови зберігання;
- основні захворювання, що впливають на кількість лейкоцитів.

## Рекомендації щодо вхідної кількості зразків тканин FFPE

Використовуйте наведені нижче критерії якості ДНК із FFPE-тканин, щоб визначити відповідну вхідну кількість матеріалу для успішної підготовки бібліотек:

- Для зразків FFPE зі значенням  $\Delta Cq \leq 5$  рекомендована вхідна кількість ДНК становить 50–1000 нг.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx не рекомендовано для зразків FFPE низької якості з  $\Delta Cq > 5$ . Використовувати зразки із  $\Delta Cq > 5$  можливо, але це може збільшити ймовірність невдалої підготовки бібліотеки або знизити ефективність аналізу.

### Екстракція із FFPE

Використовуйте метод виділення нуклеїнових кислот, який забезпечує високий вихід, мінімізує витрату зразка та зберігає цілісність зразка. Ви можете використовувати будь-який валідований метод для екстракції ДНК зі зразків FFPE. Для гДНК, виділеної з тканин FFPE, необхідне попереднє кількісне визначення вхідної ДНК, оскільки Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не забезпечує нормалізованого виходу бібліотек перед збагаченням.

## Оцінювання якості ДНК із тканин FFPE

гДНК, виділена з тканин FFPE, має пройти оцінювання якості перед використанням. Для забезпечення оптимальної продуктивності оцінюйте якість зразків ДНК, використовуючи валідований метод екстракції для оцінювання якості гДНК, виділеної зі зразків FFPE. Протокол, який має Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, сумісний зі зразками ДНК із тканин FFPE, значення  $\Delta Cq$  яких становить  $\leq 5$ . Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit не рекомендовано використовувати для зразків FFPE низької якості, у яких значення  $\Delta Cq > 5$ . Використовувати зразки із  $\Delta Cq > 5$  можливо, але це може збільшити ймовірність невдалої підготовки бібліотеки або знизити ефективність аналізу.

## [Необов'язково] Контрольні зразки FFPE

Використовуйте атестовані контрольні матеріали, такі як Horizon HD799 (ДНК), як позитивний контроль під час виконання протоколу. Придатні за якістю матеріали FFPE з ксенотрансплантатів, отриманих із клітинних ліній (CDX), також можна використовувати як контрольні зразки. Використовуйте флуорометричний метод для кількісного визначення контрольних матеріалів перед використанням.

**ПРИМ.** Виконання прогону з позитивним контрольним зразком або негативним контролем (без матриці, NTC) потребує витрати реагентів і зменшує загальну кількість невідомих зразків, які можна обробити.

## Рекомендації щодо внесення зразка

Рекомендації щодо внесення зразка (Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit) наведено в таблиці нижче.

Таблиця 1. Рекомендації щодо внесення зразка

Тип внесеного зразка	Кількість внесеного зразка	Чи потрібне кількісне визначення вхідної ДНК	Необхідна якість вхідної ДНК	Нормалізований вихід бібліотеки до збагачення
гДНК	10–49 нг	Так	Співвідношення 260/280 у межах 1,8–2,0	Ні
гДНК	50–1000 нг	Ні	Співвідношення 260/280 у межах 1,8–2,0	Так
гДНК з крові	50–1000 нг	Ні	Співвідношення 260/280 у межах 1,8–2,0	Так
гДНК з FFPE	50–1000 нг	Так	Значення $\Delta Cq \leq 5$	Ні

Рекомендовану кількість циклів ПЛР для програми ПЛР eBLTS коригують залежно від концентрації та якості внесеного зразка. Для отримання додаткової інформації див. розділ [Ампліфікація тагментованої ДНК на стор. 32](#).

## Підказки й методи

### Уникнення перехресного забруднення

- Під час додавання або перенесення зразків змінюйте наконечники після *кожного зразка*.
- Під час додавання індексних адаптерів за допомогою багатоканальної піпетки змінюйте наконечники після *кожного рядка* або *кожного стовпця*. Якщо використовується одноканальна піпетка, змінюйте наконечники після кожного зразка.

### Закриття планшета

- Завжди герметично закривайте 96-лунковий планшет новою клейкою плівкою для герметизації за допомогою гумового ролика, щоб накрити планшет, перш ніж виконувати наведені далі етапи протоколу:
  - етапи струшування;
  - етапи інкубації. Неналежне закриття планшета може призвести до випаровування під час інкубації;
  - етапи центрифугування;
  - етапи гібридизації.
- Переконайтеся, що краї та лунки повністю герметично закриті, щоб зменшити ризик перехресного забруднення та випаровування.
  - Якщо на ущільнювачі або боковинах лунок планшета спостерігається будь-яка рідина або конденсація, центрифугуйте за потреби, перш ніж розкривати.
- Перш ніж відкрити планшет, розмістіть його на рівній поверхні.

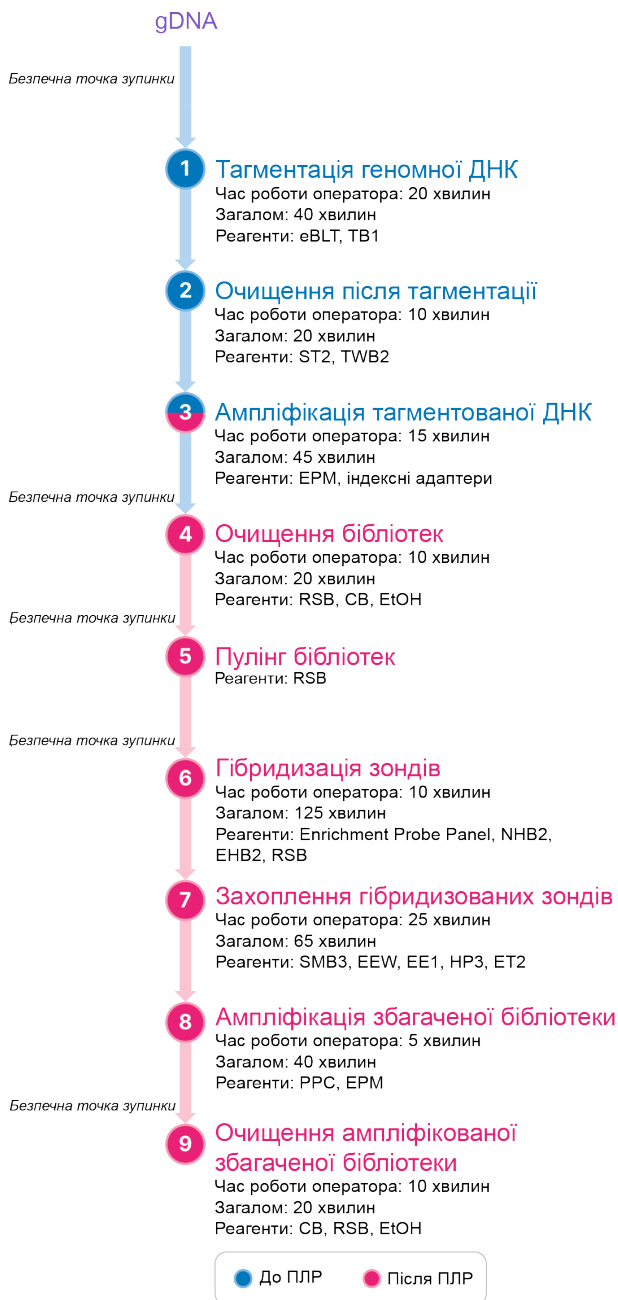
### Робота з реактивом Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Зберігайте основну пробірку eBLTS у вертикальному положенні в холодильнику, щоб гранули завжди були занурені в буфер.
- Безпосередньо перед використанням ретельно перемішайте вміст основної пробірки eBLTS на вихровій мішалці, доки гранули не ресуспендуються. Не рекомендовано центрифугувати суміш перед піпетуванням, щоб запобігти осадженню гранул.
- Якщо гранули прилипли до стінки або верхньої частини 96-лункового планшета, центрифугуйте на 280 ×g протягом 3 секунд, а потім пропіпетуйте для ресуспендування.
- Під час промивання eBLTS:
  - Використовуйте відповідний магнітний штатив для планшета.

- Тримайте планшет на магнітній підставці, доки в інструкції не буде вказівки зняти його.
- Якщо гранули аспіруються в наконечники піпеток, вилийте гранули назад у планшет на магнітній підставці та зачекайте, доки рідина не стане прозорою (2 хвилини).

# Робочий процес підготовки бібліотек зі збагаченням (Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit)

На наступній діаграмі проілюстровано робочий процес підготовки бібліотек зі збагаченням (Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit). Точки безпечного зупинення позначаються між етапами. Розрахунок часу базується на обробці 12 зразків при 12-плексному збагаченні.



## Інструкції з використання

У цьому розділі описано протокол підготовки бібліотек зі збагаченням (Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit).

- Перегляньте запланований повний робочий процес секвенування, від зразка до аналізу, щоб забезпечити сумісність виробів та параметрів експерименту.

- Перш ніж продовжити, перевірте вміст набору й переконайтеся, що маєте необхідні компоненти, обладнання та матеріали.
  - Сторонні біотинільовані зонди повинні відповідати певним вимогам. Зверніться до розділу [Вимоги до панелі зондів для збагачення на стор. 11](#), щоб переконатися, що ваші сторонні зонди відповідають вимогам.
- Дотримуйтеся протоколу у вказаному порядку, використовуючи вказані об'єми та параметри інкубації.
- Якщо точку безпечного зупинення не зазначено, відразу переходьте до наступного етапу.
- Під час створення майстер-суміші надлишок уже включено до наданих об'ємів.
- Переконайтеся, що використовується відповідний магнітний штатив для вашого типу планшета.

## Підготовка до об'єднання в пул

Цей етап необхідний для забезпечення успішного секвенування збагачених бібліотек. Об'єднання бібліотек у пул може відбуватися перед збагаченням і перед секвенуванням.

**Перед збагаченням** — окремі ампліфіковані бібліотеки з індексами об'єднуються в один пул для подальшого збагачення за допомогою обраної панелі зондів. Так створюється мультиплексний пул збагачених бібліотек. Для вхідного матеріалу з FFPE-зразків процес був протестований і рекомендований виключно для 1-плексних реакцій збагачення. Для високоякісної гДНК протестовано 12-плексну гібридизацію, проте можливі варіанти від 2-плексної до 11-плексної.

**Перед секвенуванням** — 1-плексні збагачені бібліотеки та/або мультиплексні збагачені бібліотеки об'єднуються в один пул перед початком секвенування. Кількість збагачених бібліотек, які можна секвенувати, залежить від цільової глибини зчитування для кожного зразка у вашій системі секвенування.

## Унікальне подвійне індексування

Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit використовує унікальні подвійні індекси.

- Бібліотеки з подвійною індексацією додають послідовності Index 1 (i7) і Index 2 (i5), щоб сформувати бібліотеки з унікальними мітками.
- Унікальні подвійні індекси (UD-індекси) мають різні, не пов'язані між собою послідовності індексів для зчитування індексів i7 та i5. Довжина індексів становить 10 основ.

Вибір індексних адаптерів із різноманітними послідовностями для пулів бібліотек оптимізує колірний баланс для успішного секвенування та аналізу даних. Пули з рівнем плексності  $\geq 10$ -plex за своєю природою є колірно збалансованими, тому можна використовувати будь-яку комбінацію індексних адаптерів. Під час прогону секвенування модуль DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager надає варіанти колірно збалансованих комбінацій індексів і повідомляє, якщо в обраних комбінаціях індексів недостатньо різноманітності.

Інформацію про послідовності адаптерів індексів UD Illumina та макети планшетів див. у розділі [Додаток. Послідовності адаптерів індексів UD Illumina на стор. 69](#)

## Підтримувані рівні мультиплексності збагачення

Реагенти, що входять у Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, сконфігуровані та протестовані для рівнів плексності збагачення 1-плекс і 12-плекс. Хоча можливі й інші рівні мультиплексності збагачення, деякі з них потребують додаткових реагентів для підготовки бібліотек перед збагаченням та додаткових панелей зондів для збагачення.

Отримання належного виходу збагачення для нестандартної мультиплексності збагачення може потребувати додаткової оптимізації. Оптимальні результати не гарантовані.

- **Мультиплексність збагачення** — кількість підготовлених до збагачення бібліотек (1–12), об'єднаних разом в одній реакції збагачення для гібридизації з панелями зондів для збагачення. Наприклад, поєднання 12 підготовлених до збагачення бібліотек дає змогу створити 12-плексний пул збагачення.
- **Реакція збагачення** — кількість окремих підготовлених реакцій збагачення, незалежно від кількості підготовлених до збагачення бібліотек, об'єднаних у пул для однієї реакції. Наприклад, одна реакція збагачення може забезпечувати одержання 1-плексного або 12-плексного пулу збагачення.

Щоб розрахувати загальну кількість бібліотек після збагачення, помножте мультиплексність збагачення на одну реакцію на кількість реакцій збагачення. Наприклад, одна реакція збагачення 12-плексного пулу збагачення дає на виході пул із 12 бібліотек після збагачення.

Під час об'єднання в пул підготовлених до збагачення бібліотек реагенти, що входять у Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, підтримують наведені далі реакції збагачення та плексності.

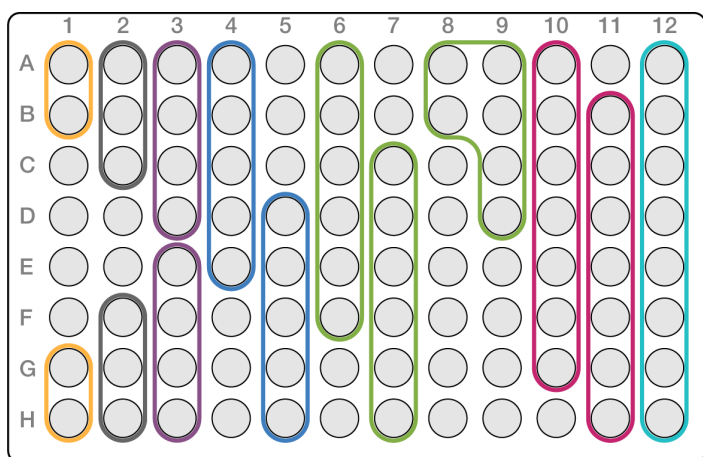
Реагенти: Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Реакції збагачення	Плексність збагачення
Набір на 16 зразків	16 реакцій	1-plex
Набір на 96 зразків	8 реакцій	12-плексний

## Стратегії об'єднання в пули від двоплексів до восьмиплексів

У таблиці нижче наведено індексні адаптери (лунки), які можна об'єднувати у 2–8-плексний пул, а на рисунку з колірним кодуванням проілюстровано кожну комбінацію.

Об'єднуйте в пул з будь-яким рівнем мультиплексності  $\geq 2$ , починаючи зверху або знизу стовпця. Не об'єднуйте в пул уздовж рядка.

Мультиплексність	Комбінації	Колір на рисунку
2	Перші дві або останні дві лунки у стовпці: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A і B</li> <li>• G і H</li> </ul> Рядки C–F не використовуються.	Помаранчевий
3	Перші три або останні три лунки у стовпці: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–C</li> <li>• F–H</li> </ul> Рядки D і E не використовуються.	Сірий
4	Перші чотири або останні чотири лунки у стовпці: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–D</li> <li>• E–H</li> </ul>	Фіолетовий
5	Перші п'ять або останні п'ять лунок у стовпці: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–E</li> <li>• D–H</li> </ul>	Синій
6	[Варіант 1] Перші шість або останні шість лунок у стовпці: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–F</li> <li>• C–H</li> </ul> [Варіант 2] Перші дві лунки (A і B) або останні дві лунки (G і H) в одному стовпці та будь-які чотири лунки у сусідньому стовпці.	Зелений
7	Перші сім або останні сім лунок у стовпці: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–G</li> <li>• B–H</li> </ul>	Рожевий
8	Весь стовпець.	Бірюзовий

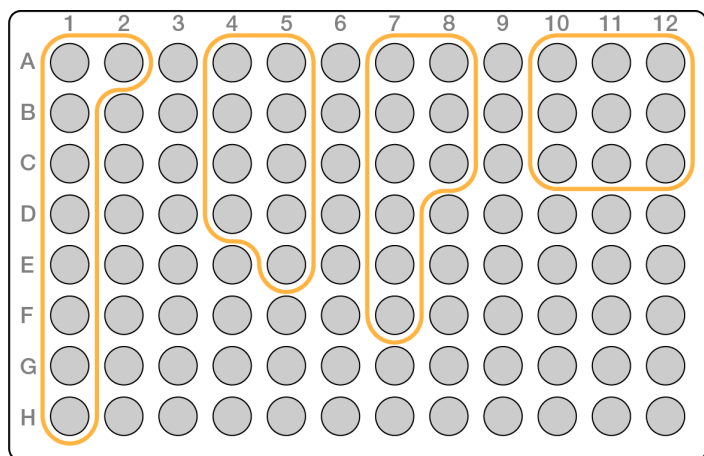


## Стратегії об'єднання в пули дев'ятиплексів

Використовуйте індексні адаптери з будь-яких лунок, які оптимізують колірний баланс у прогоні секвенування, наприклад:

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

На рисунку нижче показано всі чотири приклади.



## Тагментація геномної ДНК

На цьому етапі для тагментації ДНК проводиться процес Enrichment BLT Small (eBLTS), під час якого ДНК фрагментується та мітиться адаптерними послідовностями.

### Витратні матеріали

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (жовта кришка)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Вода без нуклеаз
- 96-лунковий ПЛР-планшет
- Клейка плівка для герметизації
- Мікроцентрифужні пробірки 1,7 мл
- 8-пробіркова стрип-панель
- Наконечники для піпеток
  - Багатоканальні піпетки на 200 мкл



## ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Цей набір реагентів містить потенційно небезпечні хімічні речовини. Вдихання, проковтування, потрапляння на шкіру та в очі може завдати шкоди здоров'ю. Надягайте захисне приладдя, зокрема засоби захисту очей, рукавички та лабораторний одяг, з урахуванням ризику впливу. Поводьтеся з використаними реагентами як із хімічними відходами й утилізуйте їх відповідно до застосовних регіональних, державних і місцевих законів та нормативних правил. Для отримання додаткової інформації про захист довкілля, охорону праці та техніку безпеки, див. паспорти безпеки продукції (SDS) на вебсайті [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Відомості про реагенти

- Реагент eBLTS слід зберігати за температури від 2 °C до 8 °C. Не використовуйте eBLTS, якщо його зберігали за температури нижче ніж 2 °C.
- Не центрифугуйте eBLTS.

## Підготовка

1. Підготуйте наведені нижче витратні матеріали:

Найменування	Зберігання	Інструкції
eBLTS (жовта кришка)	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури. Перемішайте на вихровій мішалці безпосередньо перед використанням. Не центрифугуйте перед піпетуванням.
TB1	Від -25 °C до -15 °C	Доведіть до кімнатної температури. Перемішайте на вихровій мішалці.

2. Перемішайте ДНК на вихровій мішалці або піпетуванням, а потім нетривалий час центрифугуйте.
3. Збережіть на термоциклері таку програму TAG:
  - Виберіть опцію попереднього нагрівання кришки та встановіть температуру 100 °C
  - Встановіть об'єм реакції 50 мкл
  - 55 °C протягом 5 хвилин
  - Витримка за температури 10 °C

## Процедура

1. Додайте 2–30 мкл ДНК у кожен лунку 96-лункового ПЛР-планшета так, щоб загальна кількість внесеного матеріалу становила 50–1000 нг.  
Якщо об'єм ДНК <30 мкл, додайте до зразків ДНК воду без нуклеаз, щоб довести загальний об'єм до 30 мкл.
2. Ретельно перемішуйте eBLTS на вихровій мішалці, доки гранули не буде повністю ресуспендовано.
3. Об'єднайте у пробірці наведені нижче об'єми, щоб приготувати майстер-суміш для тагментації.  
Помножьте кожен об'єм на кількість зразків, що обробляються.
  - eBLTS (11,5 мкл)
  - TB1 (11,5 мкл)Надлишок реагенту вже враховано в об'ємі.
4. Ретельно перемішайте майстер-суміш для тагментації піпетуванням.
5. Розподіліть об'єм майстер-суміш для тагментації рівномірно в 8-пробіркову стрип-панель.
6. За допомогою 200 мкл багатоканальної піпетки перенесіть 20 мкл майстер-суміш для тагментації у кожен лунку ПЛР-планшета, що містить зразок. Для кожного стовпця або рядка зразків використовуйте нові наконечники.
7. Утилізуйте 8-пробіркову стрип-панель після розподілення майстер-суміш для тагментації.
8. За допомогою 200 мкл багатоканальної піпетки, встановленої на 40 мкл, перемішайте кожний зразок, пропіпетувавши його 10 разів. Для кожного стовпця зразків використовуйте нові наконечники.  
Або ж заклейте ПЛР-планшет і використайте шейкер для планшетів за 1600 об./хв протягом 1 хвилини.
9. Заклейте планшет, потім установіть його в попередньо запрограмований термоциклер і запустіть програму TAG.
10. Дочекайтеся, доки програма TAG дійде до етапу витримки за температури 10 °C, а потім негайно вийміть планшет.
11. Залиште 96-лунковий ПЛР-планшет за кімнатної температури на 2 хвилини, а потім переходьте до наступного етапу.

## Очищення після тагментації

На цьому етапі на eBLTS виконується промивання ДНК, міченої адаптером, перед ампліфікацією ПЛР.

### Витратні матеріали

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- Магнітний штатив 96-лункового планшета для ПЛР
- Клейка плівка для герметизації

- 8-пробіркова стрип-панель
- Наконечники для піпеток
  - Багатоканальні піпетки об'ємом 20 мкл
  - Багатоканальні піпетки на 200 мкл
- Підготовка до наступної процедури:
  - ЕРМ (Enhanced ПЛР Міх)
  - Планшет індексних адаптерів

## Відомості про реагенти

- Переконайтеся, що використовується відповідний магнітний штатив для планшета. Використання магнітного штатива планшета MIDI для планшета для ПЛР може запобігти прилипанню TWB2 до гранул.
- Піпетуйте TWB2 повільно, щоб мінімізувати піноутворення та запобігти неправильній аспірації об'єму і неповному перемішуванню.

## Підготовка

1. Підготуйте наведені нижче витратні матеріали:

Найменування	Зберігання	Інструкції
ЕРМ	Від -25 °С до -15 °С	Розморозьте на льоду протягом 1 години. Переверніть для змішування, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
ST2	Від 15 до 30 °С	Якщо спостерігається осад, прогрійте за температури 37 °С протягом 10 хвилин, а потім змішайте на вихровій мішалці, доки осад не розчиниться. Використовуйте за кімнатної температури.
TWB2	Від 15 до 30 °С	Використовуйте за кімнатної температури.
Планшет індексних адаптерів	Від -25 °С до -15 °С	Розморозуйте за кімнатної температури протягом 30 хвилин.

## Процедура

1. Додайте 10 мкл ST2 до кожної реакції тагментації. Якщо ви використовуєте багатоканальну піпетку, за допомогою піпетки внесіть ST2 на 8-пробіркову стрип-панель, а потім перенесіть відповідні об'єми на планшет для ПЛР. Для кожного стовпця або рядка зразків використовуйте нові наконечники.
2. За допомогою піпетки об'ємом 200 мкл, встановленої на 50 мкл, повільно піпетуйте в кожну лунку 10 разів, щоб ресуспендувати гранули.

Або герметично закрийте планшет і струшуйте на 1600 об/хв протягом 1 хвилини. Повторіть за потреби.

3. Герметично закрийте планшет, а потім відцентрифугуйте на 280 ×g протягом 10 секунд.
4. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 5 хвилин.
5. Помістіть на магнітний штатив планшета для ПЛР і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (3 хвилини).
6. [≤ 48 зразків] Промийте тричі, як описано далі.
  - a. За допомогою багатоканальної піпетки об'ємом 200 мкл, встановленої на 60 мкл, видаліть та утилізуйте всю надосадову рідину, не порушуючи осаду гранул.
  - b. Зніміть із магнітного штатива.
  - c. Відразу після цього повільно додайте 100 мкл TWB2 безпосередньо на гранули.
  - d. Піпетуйте повільно, доки гранули не будуть повністю ресуспендовані. Або герметично закрийте планшет і струшуйте на 1600 об/хв протягом 1 хвилини.
  - e. У разі розбризкування обертайте на 280 ×g протягом 10 секунд.
  - f. Помістіть на магнітний штатив планшета для ПЛР і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (3 хвилини).

Залиште пластину на магнітній підставці, а TWB2 в лунках, щоб запобігти пересушуванню під час виконання третього промивання. Після приготування майстер-суміші для ПЛР (PCR Master Mix) видаліть і утилізуйте надосадову рідину.
  - g. За допомогою багатоканальної піпетки об'ємом 200 мкл, встановленої на 100 мкл, видаліть та утилізуйте надосадову рідину.
  - h. Повторіть етапи b–g двічі, всього три цикли промивання.
7. [> 48 зразків] Промийте тричі, як описано далі.
  - a. Виконайте етапи b і c з кроком від 1 стовпчика до 2 стовпчиків, доки всі стовпчики не будуть оброблені, щоб запобігти пересушуванню.
  - b. За допомогою багатоканальної піпетки об'ємом 200 мкл, встановленої на 60 мкл, видаліть та утилізуйте надосадову рідину.
  - c. Зніміть із магнітного штатива.
  - d. Відразу після цього повільно дозуйте 100 мкл TWB2 безпосередньо на гранули.
  - e. Піпетуйте повільно, доки гранули не будуть повністю ресуспендовані. Або герметично закрийте планшет і струшуйте на 1600 об/хв протягом 1 хвилини.
  - f. У разі розбризкування обертайте на 280 ×g протягом 10 секунд.
  - g. Помістіть на магнітний штатив планшета для ПЛР і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (3 хвилини).

Залиште пластину на магнітній підставці, а TWB2 в лунках, щоб запобігти пересушуванню під час виконання третього промивання. Після приготування майстер-суміші для ПЛР (PCR Master Mix) видаліть і утилізуйте надосадову рідину.

- h. За допомогою багатоканальної піпетки об'ємом 200 мкл, встановленої на 100 мкл, видаліть та утилізуйте надосадову рідину.
  - i. Зніміть із магнітного штатива та повільно додайте 100 мкл TWB2 безпосередньо на гранули.
  - j. Повторюйте етапи h та i з кроком 1 або 2 стовпчики, доки всі стовпчики не будуть оброблені.
  - k. Повторіть етапи e–h двічі, всього три цикли промивання.
8. Тримайте на магнітній підставці до етапу 4 розділу «Процедура» в частині «Ампліфікація тагментованої ДНК».
- TWB2 залишається в лунках для запобігання пересушуванню гранул.

## Ампліфікація тагментованої ДНК

На цьому етапі виконується ампліфікація тагментованої ДНК за допомогою програми ПЛР з обмеженим циклом. На етапі ПЛР додають адаптери індексу 1 (i7), адаптери індексу 2 (i5) і послідовності, необхідні для створення кластера секвенування.

### Витратні матеріали

- ERM (Enhanced ПЛР Mix)
- Планшет індексних адаптерів
- 96-лунковий ПЛР-планшет
- Вода без нуклеаз
- Клейка плівка для герметизації
- Мікроцентрифужні пробірки на 1,5 мл
- Наконечники для піпеток
  - Багатоканальні піпетки об'ємом 20 мкл
  - Багатоканальні піпетки на 200 мкл

### Відомості про реагенти

- Планшети індексних адаптерів
  - Лунка може містити > 10 мкл індексних адаптерів.
  - Не додавайте зразки на планшет індексних адаптерів.
  - Кожна лунка індексного планшета призначена лише для одноразового використання.

### Підготовка

1. Підготуйте наведені нижче витратні матеріали:

Найменування	Зберігання	Інструкції
ERM	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте за температури 4 °C або на льоду протягом 1 години. Переверніть для змішування, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
Планшет індексних адаптерів	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте за кімнатної температури протягом 30 хвилин.

2. Збережіть наведену нижче програму ПЛР eBLTS на термоциклері, використовуючи відповідну кількість циклів ПЛР, зазначену в таблиці нижче.

- Виберіть опцію попереднього нагрівання кришки й установіть температуру 100 °C.
- Встановіть об'єм реакції 50 мкл
- 72 °C протягом 3 хвилин
- 98 °C протягом 3 хвилин
- X циклів:
  - 98 °C протягом 20 секунд
  - 60 °C протягом 30 секунд
  - 72 °C протягом 1 хвилини
- 72 °C протягом 3 хвилин
- Витримка за температури 10 °C

Загальний час прогону становить ~38 хвилин протягом 9 циклів і ~46 хвилин протягом 12 циклів.

Тип внесеного зразка	Кількість циклів ПЛР (X)
10–49 нг гДНК	12
50–1000 нг гДНК	9
50–1000 нг гДНК, виділеної з FFPE	12
гДНК, виділена з крові	9

## Процедура

1. Для приготування реакційної суміші PCR Master Mix змішайте наведені нижче компоненти. Помножте кожен об'єм на кількість зразків, що обробляються.
  - ERM (23 мкл)
  - Вода без нуклеаз (23 мкл)
 Надлишок реагенту вже враховано в об'ємі.
2. Піпетуйте PCR Master Mix 10 разів, щоб перемішати, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.

3. Тримайте планшет на магнітному штативі, за допомогою багатоканальної піпетки на 200 мкл видаліть і утилізуйте TWB2.  
Піна, яка залишається на стінках лунок, не чинить негативного впливу на бібліотеку.
4. Зніміть із магнітного штатива.
5. Негайно додайте 40 мкл реакційної суміші ПЛР Master Mix безпосередньо на гранули в кожній лунці.
6. Негайно перемішайте піпетуванням, доки гранули не будуть повністю ресуспендовані. Або герметично закрийте планшет і струшуйте на 1600 об/хв протягом 1 хвилини.
7. Герметично закрийте планшет зі зразками і центрифугуйте на 280 xg протягом 10 секунд.
8. Відцентрифугуйте планшет індексних адаптерів на 1000 g протягом 1 хвилини.
9. Підготуйте планшет індексних адаптерів.
  - [< 96 зразків] Проткніть фольгове ущільнення на планшеті індексних адаптерів новим наконечником піпетки для кожної лунки лише для тієї кількості зразків, що обробляється.
  - [96 зразків] Вирівняйте новий планшет для ПЛР із напівбортиком над планшетом індексних адаптерів і натисніть на нього, щоб проколоти фольгове ущільнення. Утилізуйте планшет для ПЛР, який використовується для проколювання фольгового ущільнення.
10. За допомогою нового наконечника піпетки додайте в кожну лунку 10 мкл попередньо сполучених індексних адаптерів.
11. За допомогою піпетки, встановленої на 40 мкл, піпетуйте 10 разів для перемішування. Або герметично закрийте планшет і струшуйте на 1600 об/хв протягом 1 хвилини.
12. Герметично закрийте планшет, а потім відцентрифугуйте на 280 xg протягом 10 секунд.
13. Помістіть на термоциклер і запустіть програму ПЛР eBLTS.

### БЕЗПЕЧНА ТОЧКА ЗУПИНКИ

Якщо виконуєте зупинення, зберігайте за температури від -25 °C до -15 °C протягом до 30 діб.

## Очищення бібліотек

На цьому етапі для очищення ампліфікованих бібліотек застосовується двостороння процедура очищення на гранулах.

### Витратні матеріали

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Свіжоприготовлений 80 % етанол (EtOH)
- 96-лунковий поліпропіленовий планшет для зберігання Deerwell на 0,8 мл (планшет MIDI)
- 96-лунковий ПЛР-планшет
- Магнітний штатив для планшета MIDI

- Магнітний штатив для ПЛР-планшета
- Мікроцентрифужні пробірки на 1,5 мл
- Вода без нуклеаз

## Відомості про реагенти

- Cleanup Beads
  - Перед кожним використанням перемішуйте на вихровій мішалці.
  - Часто перемішуйте на вихровій мішалці, щоб гранули були розподілені рівномірно.
  - Через в'язкість розчину аспіруйте та диспенсуйте повільно.

## Підготовка

1. Підготуйте наведені нижче витратні матеріали:

Найменування	Зберігання	Інструкції
CB	Кімнатна температура	Перемішайте на вихровій мішалці та шляхом перевертання, доки колір рідини не стане однорідним.
RSB	Від 2 °C до 8 °C	Розморозьте протягом 30 хвилин за кімнатної температури. Перемішайте на вихровій мішалці.

## Процедура

1. Струсіть 96-лунковий планшет для ПЛР на 1800 об/хв протягом 1 хвилини, а потім недовго відцентрифугуйте.
2. Помістіть на магнітний штатив планшета для ПЛР і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (1 хвилина).
3. Перемішайте CB на вихровій мішалці 3 рази протягом 10 секунд, а потім переверніть декілька разів, щоб ресуспендувати.
4. У разі використання високоякісної гДНК виконайте наведені далі дії.
  - a. Додайте 77 мкл води без нуклеаз у кожен лунку нового планшета MIDI.
  - b. Додайте 88 мкл CB у кожен лунку планшета MIDI.
  - c. Перенесіть 45 мкл надосадової рідини з кожної лунки планшета для ПЛР у відповідну лунку планшета MIDI.
  - d. Утилізуйте планшет для ПЛР.
  - e. Піпетуйте кожен лунку 10 разів, щоб перемішати. Або герметично закрийте планшет і струшуйте на 1800 об/хв протягом 1 хвилини.
  - f. Герметично закрийте планшет та інкубуйте за кімнатної температури протягом 5 хвилин.
  - g. Перевірте наявність бульбашок повітря. Якщо спостерігаються, відцентрифугуйте.

- h. Помістіть на магнітний штатив планшета MIDI і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (5 хвилин).
  - i. Під час інкубації ретельно перемішуйте СВ на вихровій мішалці, а потім додайте 20 мкл у кожную лунку *нового* планшета MIDI.
  - j. Перенесіть 200 мкл надосадової рідини з кожної лунки планшета MIDI у відповідну лунку нового планшета MIDI (містить 20 мкл СВ).
  - k. Утилізуйте перший планшет MIDI.
  - l. Піпетуйте кожную лунку нового планшета MIDI 10 разів, щоб перемішати. Або герметично закрийте планшет і струшуйте на 1800 об/хв протягом 1 хвилини.
5. Для екстрагованого FFPE виконайте наведені далі дії.
- a. Додайте 81 мкл СВ у кожную лунку нового планшета MIDI.
  - b. Перенесіть 45 мкл надосадової рідини з кожної лунки планшета для ПЛР у відповідну лунку планшета MIDI.
  - c. Утилізуйте планшет для ПЛР.
  - d. Піпетуйте кожную лунку 10 разів, щоб перемішати. Або герметично закрийте планшет і струшуйте на 1800 об/хв протягом 1 хвилини.
6. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 5 хвилин.
7. Перевірте на наявність бульбашок повітря. Якщо спостерігаються, відцентрифугуйте.
8. Помістіть на магнітний штатив планшета MIDI і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (5 хвилин).
9. Не порушуючи шару гранул, видаліть і утилізуйте супернатант.
10. Промийте гранули наступним чином.
- a. Залиште планшет на магнітній підставці та додайте 200 мкл свіжого 80 % EtOH, не перемішуючи.
  - b. Інкубуйте протягом 30 секунд.
  - c. Не порушуючи шару гранул, видаліть і утилізуйте супернатант.
11. Промийте гранули **вдруге**.
12. Висушіть на повітрі на магнітній підставці протягом 5 хвилин.
13. Під час сушіння на повітрі за допомогою піпетки об'ємом 20 мкл видаліть і утилізуйте залишок EtOH.
14. Зніміть із магнітного штатива.
15. Додайте 17 мкл RSB до гранул.
16. Герметично закрийте планшет і струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
17. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 2 хвилин.
18. Перевірте на наявність бульбашок повітря. Якщо спостерігаються, відцентрифугуйте.
19. Помістіть планшет на магнітний штатив для планшета MIDI та зачекайте, доки рідина не стане прозорою (2 хвилини).
20. Перенесіть 15 мкл надосадової рідини в новий 96-лунковий планшет для ПЛР.

### **БЕЗПЕЧНА ТОЧКА ЗУПИНКИ**

Якщо виконуєте зупинення, герметично закрийте планшет і зберігайте його за температури від -25 °C до -15 °C протягом до 30 діб.

## **Об'єднання бібліотек перед збагаченням**

На цьому етапі бібліотеки ДНК з унікальними індексами об'єднуються в один пул, що містить до 12 бібліотек.

## Методи об'єднання в пул

Бібліотеки можна об'єднувати в пул за об'ємом або за масою. Використовуйте наведену нижче таблицю, щоб визначити метод, який підходить для вашого вхідного матеріалу.

Таблиця 2. Рекомендовані методи об'єднання в пул

Внесення зразка	Метод об'єднання в пул
10–49 нг гДНК	за масою
50–1000 нг гДНК	за об'ємом
гДНК, виділена з FFPE	за масою
гДНК, виділена з крові	за об'ємом

- Одноплексне збагачення не потребує об'єднання бібліотек у пул перед збагаченням. Однак може знадобитися додавання RSB.
- Після вимірювання кількості бібліотек перед збагаченням усі типи вхідних зразків можна об'єднати за масою для досягнення оптимального балансу індексів.
- Кінцевий вихід бібліотек перед збагаченням, отриманих у різних експериментальних підготовках, може відрізнитися. Тому для досягнення оптимального балансу індексу рекомендовано об'єднувати в пул за масою.
- Використовуйте 1-плексне збагачення у таких випадках:
  - 10–49 нг гДНК;
  - 50–1000 нг гДНК, виділеної з FFPE;
  - виявлення низької частоти мінорних алелів для розпізнавання соматичних варіантів.

## Об'єднання в пул за масою

У наведених нижче ситуаціях проведіть кількісне визначення бібліотек, щоб розрахувати масу ДНК на кожну бібліотеку для збагачення, як зазначено в розділі [Об'єднання бібліотек у пул перед збагаченням у рівній концентрації на стор. 39](#).

- Вхідна кількість гДНК зразка становить 10–49 нг
- Вхідна кількість гДНК, виділеної з FFPE-зразка, становить 50–1000 нг
- Виявлення низької частоти мінорних алелів для розпізнавання соматичних варіантів
- гДНК, виділена з крові, для оптимального балансу індексів

## Кількісне визначення бібліотек перед збагаченням

- Виконайте прогін 1 мкл бібліотек перед збагаченням за допомогою обраного вами флуоресцентного методу кількісного визначення з використанням барвника, що інтеркалює у длДНК.
  - Для 50–1000 нг високоякісної гДНК очікуваний вихід бібліотеки перед збагаченням становить  $\geq 500$  нг.
  - Для 50–1000 нг гДНК, виділеної з FFPE, очікуваний вихід бібліотеки перед збагаченням становить 500–6000 нг, залежно від якості вихідного зразка.

**ПРИМ.** Оскільки методи кількісного визначення мають різні систематичні похибки, необхідно провести валідацію обраного методу для цього робочого процесу. Результати концентрації можуть відрізнятися залежно від методу, що використовується.

## Об'єднання бібліотек у пул перед збагаченням у рівній концентрації

Використовуйте наведену нижче таблицю для визначення маси ДНК на бібліотеку, необхідної для збагачення, відповідно до типу зразка та мультиплексності збагачення. Оптимальний вихід збагачення та продуктивність аналізу не гарантуються у разі використання нижчого виходу бібліотек перед збагаченням, ніж рекомендовано.

Загальна маса ДНК у реакції збагачення не повинна перевищувати 6000 нг.

Внесення зразка	Плексність збагачення	Маса ДНК на бібліотеку (нг)	Загальна маса бібліотеки ДНК (нг)
Високоякісна гДНК	12	250–500	3000–6000
гДНК, виділена з FFPE	1	200	200

- Запишіть індекси для бібліотек, які ви плануєте об'єднати в пул на цьому етапі.
- На основі концентрації кожної бібліотеки розрахуйте об'єм, який необхідно додати до реакції збагачення для досягнення необхідної маси ДНК.
  - Високоякісна гДНК: розрахуйте об'єм бібліотеки, необхідний для внесення 250–500 нг матеріалу.
  - гДНК, виділена з FFPE: розрахуйте об'єм бібліотеки, необхідний для внесення 200 нг матеріалу.
- Додайте розрахований об'єм для кожної бібліотеки в одну лунку планшета для ПЛР.
- Якщо використовується високоякісна гДНК, виконайте одну з наведених нижче дій залежно від загального об'єму пулу бібліотек перед збагаченням:
  - Якщо об'єм бібліотеки перед збагаченням = 30 мкл, перейдіть до етапу [Гібридизація зондів на стор. 41](#).
  - Якщо об'єм бібліотеки перед збагаченням < 30 мкл, додайте RSB, щоб довести загальний об'єм до 30 мкл.

- Якщо об'єм бібліотеки перед збагаченням > 30 мкл, скористайтеся методом на основі магнітних гранул або вакуумним концентратором, щоб концентрувати зразок, об'єднаний у пул. Додайте RSB до концентрованого зразка, об'єднаного у пул, для досягнення загального об'єму 30 мкл.
5. Якщо використовується гДНК, виділена з FFPE-зразків, виконайте одну з наведених нижче дій залежно від загального об'єму пулу бібліотек перед збагаченням.
- Якщо об'єм бібліотеки перед збагаченням = 7,5 мкл, перейдіть до етапу [Гібридизація зондів на стор. 41](#).
  - Якщо об'єм бібліотеки перед збагаченням < 7,5 мкл, додайте RSB, щоб довести загальний об'єм до 7,5 мкл.

### БЕЗПЕЧНА ТОЧКА ЗУПИНКИ

Якщо ви виконуєте зупинення, заклейте планшет і зберігайте його за температури від -25 °C до -15 °C до 30 днів.

### Об'єднання в пул за об'ємом

Якщо на вхід подається 50–1000 нг гДНК, кількісне визначення та нормалізація окремих бібліотек, створених у межах одного експерименту, не потрібні.

Для досягнення оптимальних результатів об'єднуйте в пул лише ті зразки бібліотек перед збагаченням, що були підготовлені одним користувачем, з використанням однієї серії реагентів та одного планшета з індексними адаптерами.

1. Запишіть індекси для бібліотек, які ви плануєте об'єднати в пул на цьому етапі.
2. Змішайте в одній лунці нового планшета для ПЛР наведені нижче об'єми бібліотек перед збагаченням та буфера RSB відповідно до вашої мультиплексності збагачення.

Кінцевий об'єм становить 30 мкл.

Мультиплексність збагачення *	Об'єм кожної бібліотеки перед збагаченням (мкл)	Об'єм RSB (мкл)
1-plex	14	16
2-плексний	14	2
3-плексний	10	0
4-плексний	7,5	0
5-плексний	6	0
6-плексний	5	0
7-плексний	4,2	0,6
8-плексний	3,7	0,4
9-плексний	3,3	0,3

Мультиплексність збагачення*	Об'єм кожної бібліотеки перед збагаченням (мкл)	Об'єм RSB (мкл)
10-плексний	3	0
11-plex	2,7	0,3
12-plex	2,5	0

\*Для отримання інформації про нестандартну мультиплексність (від 2-плексного до 11-плексного набору) див. розділ [Обмеження процедури на стор. 2](#).

### БЕЗПЕЧНА ТОЧКА ЗУПИНКИ

Якщо ви виконуєте зупинення, заклейте планшет і зберігайте його за температури від -25 °C до -15 °C до 30 днів.

## [Необов'язково] Валідація бібліотек перед збагаченням

У разі об'єднання в пул за об'ємом для кількісного визначення бібліотек перед збагаченням використовуйте флуориметричний метод із застосуванням інтеркаляційного барвника для длДНК. Для валідації бібліотек перед збагаченням використовуйте секвенатор фрагментів ДНК з відповідним набором для аналізу фрагментів

Для валідації бібліотеки використовуйте загалом 1 мкл. Бібліотеки перед збагаченням мають достатньо високу концентрацію, що дозволяє виконувати невеликі розведення для кількісного визначення або аналізу фрагментів.

## Гібридизація зондів

Цей етап забезпечує зв'язування цільових ділянок ДНК із зондами для захоплення.

Реагенти, що входять у Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, сумісні з панелями збагачення на основі ДНК-олігонуклеотидів як від Illumina, так і від сторонніх виробників. Для отримання інформації про необхідні нормативи для панелей сторонніх виробників див. розділ [Вимоги до панелі зондів для збагачення на стор. 11](#)

### Витратні матеріали

- ЕНВ2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- ННВ2 (буфер 2 НУВ + блокатори NXT IDT) (синя кришка)
- Панель зондів для збагачення
- 96-лунковий ПЛР-планшет
- Клейка плівка для герметизації
- Підготовка до наступної процедури:
  - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (бурштинова кришка)

## Відомості про реагенти

- NHB2 осаджується та розділяється під час зберігання.
- Панель зондів для збагачення — це вибрана панель олігонуклеотидів для збагачення від постачальника Illumina.

## Підготовка

1. Підготуйте наведені нижче витратні матеріали:

Найменування	Зберігання	Інструкції
ENB2	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури. Перемішайте на вихровій мішалці. Якщо спостерігаються кристали та помутніння, повторно перемішайте розчин на вихровій мішалці або шляхом піпетування вгору-вниз до повного розчинення та прозорості.
Панель зондів для збагачення	-25 °C до -15 °C (Illumina)	Для панелей Illumina та панелей сторонніх виробників: доведіть до кімнатної температури. Перемішайте на вихровій мішалці.
NHB2 (синя кришка)	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте за кімнатної температури. Після досягнення кімнатної температури попередньо нагрійте в інкубаторі для мікророзків до тієї самої температури, що й зонд, який ви використовуєте, протягом 5 хвилин. Змішуйте кожен на вихровій мішалці на максимальній швидкості 3 рази по 10 секунд щоразу, щоб ресуспендувати. Нетривалий час відцентрифугуйте. Пропіпетуйте вгору-вниз, починаючи від дна пробірки. Якщо спостерігаються кристали та помутніння, повторно перемішайте розчин на вихровій мішалці або шляхом піпетування вгору-вниз до повного розчинення та прозорості. Використовуйте розчин, поки він теплий, щоб уникнути повторного утворення осаду.

Найменування	Зберігання	Інструкції
SMB3*	Від 2 °C до 8 °C	Якщо ви переходите до наступної процедури відразу після 90-хвилинної витримки в програмі НУВ, доведіть до кімнатної температури принаймні за 2 години до прогону програми НУВ.
EEW* (бурштинова пробірка)	Від -25 °C до -15 °C	Якщо ви переходите до наступної процедури відразу після 90-хвилинної витримки в програмі НУВ, доведіть до кімнатної температури принаймні за 2 години до прогону програми НУВ. Після доведення до кімнатної температури попередньо нагрійте в інкубаторі для мікророзривів до відповідної температури гібридизації та захоплення протягом 30 хвилин до завершення програми НУВ.

\*Якщо ви зупиняєтеся перед наступною процедурою, відкладіть підготовку цього реагенту до моменту, коли перейдете до цієї процедури.

2. Збережіть наведену нижче програму НУВ у термоциклері, використовуючи відповідну кількість циклів ([Таблиця 3](#)).

- Виберіть опцію попереднього нагрівання кришки й установіть температуру 100 °C.
- Установіть об'єм реакції.
  - [Високоякісна гДНК] 100 мкл
  - [гДНК, виділена з FFPE] 25 мкл
- 98 °C протягом 5 хвилин
- X циклів тривалістю 1 хвилина кожен, починаючи з 98 °C для першого циклу, з подальшим зниженням на 2 °C за цикл.
- Утримуйте протягом 90 хвилин за відповідної температури:
  - [гДНК, виділена з FFPE] 58 °C
  - [Панелі зондів довжиною 80 мер] 58 °C
  - [Розпізнавання соматичних варіантів] 58 °C
  - [Усі інші] 62 °C

Загальний час прогону становить ~115 хвилин.

Таблиця 3. Кількість циклів на зразок або панель

Тип зразка та панелі	Кількість циклів (X)
гДНК, виділена з FFPE (незалежно від типу панелі)	20
Панелі зондів довжиною 80 мер (незалежно від типу зразка)	20

Тип зразка та панелі	Кількість циклів (X)
Розпізнавання соматичних варіантів	20
Усі інші зразки та панелі	18

## Процедура

1. **[Високоякісна гДНК]** Додайте наведені нижче реагенти *в порядку, у якому їх зазначено у списку*, до кожної об'єднаної бібліотеки на планшеті для ПЛР.  
Не створюйте майстер-суміш. Створення майстер-суміші NHB2 та ENB2 негативно впливає на ефективність збагачення.
  - NHB2 (синя кришка) (50 мкл);
  - панель зондів для збагачення (10 мкл);
  - ENB2 (10 мкл).
2. **[Високоякісна гДНК]** За допомогою піпетки, встановленої на 90 мкл, пропітуйте кожну лунку 10 разів для перемішування.
3. **[гДНК, виділена з FFPE]** Додайте наведені нижче реагенти *в порядку, у якому їх зазначено у списку*, до кожної об'єднаної бібліотеки на планшеті для ПЛР.  
Не створюйте майстер-суміш. Створення майстер-суміші NHB2 та ENB2 негативно впливає на ефективність збагачення.
  - NHB2 (синя кришка) (12,5 мкл);
  - панель зондів для збагачення (2,5 мкл);
  - ENB2 (2,5 мкл).
4. **[гДНК, виділена з FFPE]** За допомогою піпетки, встановленої на 20 мкл, пропітуйте кожну лунку 10 разів для перемішування.
5. Герметично закрийте планшет і відцентрифугуйте на 280 xg протягом 10 секунд.
6. Помістіть планшет зі зразками в попередньо запрограмований термоциклер і запустіть програму НУВ.
7. Щойно час утримання температури програми НУВ закінчиться, відразу переходьте до наступної процедури.



### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Якщо температура гібридаційної реакції опускається нижче кімнатної, відбувається осадження.

## Захоплення гібридизованих зондів

На цьому етапі за допомогою стрептавідинових магнітних гранул (Streptavidin Magnetic Beads, SMB3) відбувається захоплення зондів, гібридизованих з цільовими досліджуваними ділянками.

## Витратні матеріали

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (бурштинова кришка)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2 N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- Мікроцентрифужна пробірка на 1,5 мл
- 96-лунковий планшет MIDI
- 96-лунковий ПЛР-планшет
- Клейка плівка для герметизації
- Магнітний штатив для MIDI plate
- Підготовка до наступної процедури:
  - Enhanced ПЛР Mix (EPM)
  - ПЛР Primer Cocktail (PPC)

## Відомості про реагенти

- EEW
  - Переконайтеся, що буфер EEW розморожувався за кімнатної температури щонайменше 2 години перед попереднім нагріванням в інкубаторі для мікрорезаків.
  - Переконайтеся, що EEW прогрівався в інкубаторі для мікрорезаків протягом 30 хвилин до завершення програми НУВ.
  - Залишайте EEW в інкубаторі для мікрорезаків, коли він не використовується. EEW має залишатися нагрітим протягом усього протоколу.
  - Може помутніти після досягнення кімнатної температури.
  - Може жовтіти.
- SMB3
  - Магнітні гранули SMB3 перед використанням мають бути кімнатної температури.

## Підготовка

1. Підготуйте наведені нижче витратні матеріали:

Найменування	Зберігання	Інструкції
SMB3	Від 2 °C до 8 °C	Залиште на 2 години нагріватися до кімнатної температури. Переверніть, а потім перемішайте у вихровій мішалці до повного ресуспендування.

Найменування	Зберігання	Інструкції
EEW (бурштинова пробірка)	Від -25 °C до -15 °C	Через 2 години інкубації за кімнатної температури попередньо нагрійте в інкубаторі для мікроразків до відповідної температури гібридизації та захоплення протягом 30 хвилин до завершення програми НУВ.
EE1	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте за кімнатної температури, а потім перемішайте на вихровій мішалці.
HP3	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте за кімнатної температури, а потім перемішайте на вихровій мішалці.
ET2	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури. Перемішайте на вихровій мішалці.
ERM	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте на льоду протягом однієї години. Переверніть для змішування, потім відцентрифугуйте нетривалий час. Відставте на лід.
PPC	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте на льоду протягом однієї години. Перемішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте. Відставте на лід.

- Попередньо прогрійте один інкубатор для мікроразків зі вставкою термоблока для MIDI-планшетів, щоб інкубувати планшет зі зразками за однієї з указаних далі температур. Для попереднього прогрівання EEW можна використовувати додатковий другий інкубатор для мікроразків. Покладіть EEW зверху на вставку термоблока MIDI.
  - [FFPE] 58 °C
  - [Панелі зондів довжиною 80 мер] 58 °C
  - [Розпізнавання соматичних варіантів] 58 °C
  - [Усі інші] 62 °C

## Процедура

### Захоплення

- Додайте SMB3 у відповідну лунку нового планшета MIDI, як описано нижче.
  - [Високоякісна гДНК] Додайте 250 мкл SMB3.
  - [гДНК, виділена з FFPE] Додайте 62,5 мкл SMB3.
- За допомогою піпетки, встановленої на 100 мкл для високоякісної гДНК або 25 мкл для FFPE, перенесіть кожну об'єднану в пул бібліотеку з 96-лункового планшета для ПЛР до відповідної лунки нового планшета MIDI.
- Герметично закрийте планшет і струшуйте на 1200 об/хв протягом 4 хвилин.
- У разі розбрикування відцентрифугуйте планшет нетривалий час.

5. Помістіть об'єднані бібліотеки на вставку термоблока MIDI в інкубатор для мікрорезків, під пробірку EEW, закрийте кришку та інкубуйте протягом 15 хвилин за відповідної температури:
  - [FFPE] 58 °C
  - [Панель зондів довжиною 80 мер] 58 °C
  - [Розпізнавання соматичних варіантів] 58 °C
  - [Усі інші] 62 °C
6. Видаліть об'єднані в пул бібліотеки та центрифугуйте на 280 ×g протягом 30 секунд.
7. негайно помістіть на магнітний штатив планшета MIDI і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (2 хвилини).
8. **[Високоякісна гДНК]** За допомогою піпетки, встановленої на 200 мкл, видаліть і утилізуйте всю надосадову рідину з кожної лунки, не порушуючи осаду гранул.
9. **[гДНК, виділена з FFPE]** За допомогою піпетки, встановленої на 90 мкл, видаліть і утилізуйте всю надосадову рідину з кожної лунки, не порушуючи осаду гранул.
10. Видаліть і утилізуйте всі залишки надосадової рідини.

## Промивання

1. Зніміть із магнітного штатива.
2. **[Високоякісна гДНК]** Швидко вийміть EEW з інкубатора для мікрорезків і додайте 200 мкл у кожну лунку.
3. **[гДНК, екстрагована з FFPE]** Швидко вийміть EEW з інкубатора для мікрорезків і додайте 50 мкл у кожну лунку.
4. Поверніть невикористаний EEW в інкубатор для мікрорезків та зберігайте його нагрітим.
5. Герметично закрийте і струшуйте на 1800 об/хв протягом 4 хвилин.
6. Помістіть планшет для зразків на вставку термоблока MIDI в інкубатор для мікрорезків, під пробірку EEW, закрийте кришку, а потім інкубуйте протягом 5 хвилин за відповідної температури:
  - [FFPE] 58 °C
  - [Панелі зондів довжиною 80 мер] 58 °C
  - [Розпізнавання соматичних варіантів] 58 °C
  - [Усі інші панелі] 62 °C
7. негайно помістіть на магнітний штатив планшета MIDI і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (2 хвилини).
8. За допомогою піпетки, встановленої на 200 мкл для високоякісної гДНК або 50 мкл для FFPE, видаліть і утилізуйте всю надосадову рідину з кожної лунки.
9. Повторіть етапи 1–8 двічі, всього три цикли промивання.

## Перенесення та промивання

1. Зніміть із магнітного штатива.
2. [Високоякісна гДНК] Швидко вийміть EEW з інкубатора для мікророзрізків і додайте 200 мкл у кожну лунку.
3. [гДНК, екстрагована з FFPE] Швидко вийміть EEW з інкубатора для мікророзрізків і додайте 50 мкл у кожну лунку.
4. Герметично закрийте і струшуйте на 1800 об/хв протягом 4 хвилин. У разі розбризкування зменште швидкість до 1600 об/хв.
5. Перенесіть ресуспендований розчин гранул на новий MIDI-планшет.  
Трохи зразка може залишатися в лунках.



### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Перенесення реагенту зводить до мінімуму контамінацію залишками реагентів, які здатні інгібувати подальшу ПЛР.

6. Помістіть планшет для зразків на вставку термоблока MIDI в інкубаторі для мікророзрізків, закрийте кришку та інкубуйте протягом 5 хвилин за відповідної температури:
  - [FFPE] 58 °C
  - [Панелі зондів довжиною 80 мер] 58 °C
  - [Розпізнавання соматичних варіантів] 58 °C
  - [Усі інші] 62 °C
7. негайно помістіть на магнітний штатив планшета MIDI і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (2 хвилини).
8. За допомогою піпетки, встановленої на 200 мкл для високоякісної гДНК або 50 мкл для FFPE, видаліть і утилізуйте всю надосадову рідину з кожної лунки.
9. Відцентрифугуйте планшет на 280 xg протягом 30 секунд.
10. Помістіть на магнітну стійку планшета MIDI на 10 секунд.
11. За допомогою піпетки об'ємом 20 мкл видаліть і утилізуйте залишки рідини з кожної лунки.
12. негайно перейдіть до етапу [Елюювання на стор. 48](#) для запобігання надмірному висиханню гранул і втраті виходу бібліотеки.

## Елюювання

1. Змішайте наведені нижче об'єми для підготовки майстер-суміші для елюювання. Помножте кожен об'єм на кількість об'єднаних у пул оброблюваних бібліотек.
  - EE1 (28,5 мкл)
  - HP3 (1,5 мкл)Зазначений об'єм включає додатковий надлишок реагенту.

2. Змішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте.
3. Зніміть планшет MIDI з магнітного штатива.
4. Додайте в кожен лунку по 23 мкл майстер-суміші для вимивання.
5. Герметично закрийте і струшуйте на 1800 об/хв протягом 2 хвилин.
6. Інкубуйте планшет за кімнатної температури протягом 2 хвилин.
7. Відцентрифугуйте на 280 × g протягом 30 секунд.
8. Помістіть на магнітний штатив планшета MIDI і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (2 хвилини).
9. Перенесіть 21 мкл надосадової рідини з планшета MIDI у відповідну лунку нового 96-лункового планшета для ПЛР.
10. Утилізуйте планшет MIDI.
11. Додайте 4 мкл ET2 у кожен лунку, що містить 21 мкл надосадової рідини.
12. Установіть піпетку на 20 мкл і повільно пропіпетуйте кожен лунку 10 разів для перемішування.
13. Герметично закрийте планшет, а потім відцентрифугуйте на 280 ×g протягом 10 секунд.
14. Інкубуйте планшет протягом 1 хвилини за кімнатної температури.

## Ампліфікація збагаченої бібліотеки

На цьому етапі використовується ПЛР для ампліфікації збагачених бібліотек.

### Витратні матеріали

- EPM (Enhanced ПЛР Mix)
- PPC (ПЛР Primer Cocktail)
- Клейка плівка для герметизації

### Підготовка

1. Підготуйте наведені нижче витратні матеріали:

Найменування	Зберігання	Інструкції
EPM	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте за температури 4 °C або на льоду протягом однієї години. Переверніть для змішування, потім відцентрифугуйте нетривалий час. Відставте на лід.
PPC	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте за температури 4 °C на льоду протягом однієї години. Перемішайте на вихровій мішалці, а потім нетривалий час відцентрифугуйте. Відставте на лід.

2. Збережіть наведену нижче програму AMP на термоциклері, використовуючи відповідну кількість циклів ПЛР, які перелічені в таблиці нижче.

- Виберіть опцію попереднього нагрівання кришки й установіть температуру 100 °С.
- Установіть об'єм реакції на 50 мкл
- 98 °С протягом 45 секунд
- (X) циклів:
  - 98 °С протягом 30 секунд
  - 60 °С протягом 30 секунд
  - 72 °С протягом 30 секунд
- 72 °С протягом 5 хвилин
- Витримка за температури 10 °С

Загальний час прогону становить ~35 хвилин.

Тип зразка та панелі	(X) циклів
FFPE	14
Екзомна панель (СЕХ) Illumina для високоякісної гДНК	10
Екзомна панель (СЕХ) Illumina для FFPE	12
Усі інші зразки та панелі	12 <sup>1234</sup>

<sup>1</sup> У разі використання невеликих панелей сторонніх виробників кількість циклів можна скоригувати до 15. У разі використання FFPE кількість циклів може бути скоригована до 17.

<sup>2</sup> Можна скоригувати до 17 циклів для панелей сторонніх виробників, які мають лише 500 зондів. У разі використання FFPE кількість циклів може бути скоригована до 19.

<sup>3</sup> Можна скоригувати до 14 циклів для зразків FFPE.

<sup>4</sup> Збільшення кількості циклів ПЛР може призвести до більшої частоти дублікатів і менших розмірів фрагментів для зразків FFPE.

## Процедура

1. Додайте 5 мкл PPC у кожен лунку.
2. Додайте 20 мкл EPM в кожен лунку.
3. Герметично закрийте планшет і струшуйте на 1200 об/хв протягом 1 хвилини.
4. Відцентрифугуйте планшет на 280 ×g протягом 10 секунд.
5. Помістіть на попередньо запрограмований термоциклер і запустіть програму AMP.

### БЕЗПЕЧНА ТОЧКА ЗУПИНКИ

Якщо виконуєте зупинення, зберігайте за температури від 2 °С до 8 °С протягом до двох діб. Або залиште на термоциклері до 24 годин.

## Очищення ампліфікованих збагачених бібліотек

На цьому етапі проводиться очищення збагаченої бібліотеки та видалення небажаних продуктів за допомогою магнітних гранул (Cleanup Beads).

### Витратні матеріали

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Свіжоприготований 80% етанол (EtOH)
- Клейкі плівки для герметизації
- 96-лунковий планшет MIDI
- 96-лунковий ПЛР-планшет
- Магнітний штатив для MIDI plate

### Відомості про реагенти

- Cleanup Beads
  - Перед кожним використанням перемішуйте на вихровій мішалці.
  - Часто перемішуйте на вихровій мішалці, щоб гранули були розподілені рівномірно.
  - Через в'язкість розчину аспіруйте та диспенсуйте повільно.

### Підготовка

1. Підготуйте наведені нижче витратні матеріали:

Найменування	Зберігання	Інструкції
CB	Кімнатна температура	Перемішайте на вихровій мішалці та шляхом перевертання, доки колір рідини не стане однорідним.
RSB	Від 2 °C до 8 °C	Доведіть до кімнатної температури. Перемішайте на вихровій мішалці.

2. Приготуйте свіжий 80 % EtOH з абсолютного етанолу.

### Процедура

1. Центрифугуйте ПЛР-планшет на 280 xg протягом 10 секунд.
2. Перемішайте CB на вихровій мішалці 3 рази по 10 секунд, а потім переверніть.
3. Додайте 40,5 мкл CB у кожен лунку нового планшета **MIDI**.
4. Перенесіть 45 мкл з кожної лунки ПЛР-планшета у відповідну лунку планшета MIDI.
5. Заклейте планшет і струшуйте при 1800 об./хв протягом 1 хвилини.

6. Інкубуйте планшет MIDI за кімнатної температури протягом 5 хвилин.
7. Центрифугуйте на 280 × g протягом 10 секунд.
8. Установіть на магнітний штатив для планшета MIDI і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (5 хвилин).
9. За допомогою піпетки, установленної на 95 мкл, видаліть та утилізуйте весь супернатант із кожної лунки.
10. Двічі виконайте промивання, як описано далі.
  - a. Залиште планшет на магнітній підставці та додайте 200 мкл свіжого 80 % EtOH, не перемішуючи.
  - b. Інкубуйте протягом 30 секунд.
  - c. Не порушуючи шару гранул, видаліть і утилізуйте супернатант.
11. Висушіть на повітрі на магнітній підставці протягом 5 хвилин.
12. Під час підсушування на повітрі використовуйте піпетку на 20 мкл, щоб видалити та утилізувати залишки EtOH з кожної лунки.
13. Зніміть із магнітного штатива та додайте 32 мкл RSB у кожну лунку.
14. Заклейте планшет і струшуйте при 1800 об./хв протягом 1 хвилини.
15. Інкубуйте планшет за кімнатної температури протягом 5 хвилин.
16. Центрифугуйте на 280 × g протягом 10 секунд.
17. Установіть на магнітний штатив для планшета MIDI і зачекайте, доки рідина не стане прозорою (2 хвилини).
18. Перенесіть 30 мкл супернатанту з 96-лункового планшета MIDI у відповідну лунку нового ПЛР-планшета.
19. Утилізуйте планшет MIDI.

### БЕЗПЕЧНА ТОЧКА ЗУПИНКИ

Якщо виконуєте зупинення, герметично закрийте планшет і зберігайте його за температури від -25 °C до -15 °C протягом до 7 діб.

## Перевірка збагачених бібліотек

Для кількісного визначення внесеної дволанцюгової гДНК використовуйте метод на основі флуоресценції із застосуванням інтеркалювального барвника. Уникайте методів, що вимірюють загальну кількість нуклеїнових кислот, наприклад NanoDrop або інших методів на основі УФ-поглинання.

1. Виконайте аналіз 1 мкл збагачених бібліотек, використовуючи обраний метод кількісного визначення.

**ПРИМ.** Загальна молярність зондів пропорційно впливає на вихід бібліотеки після збагачення.

За очікуваннями, середній розмір інсерцій становить 125–235 п. о., а розподіл фрагментів бібліотеки в діапазоні розмірів від ~200 п. о. до ~1000 п. о.

## Розведення бібліотеки до початкової концентрації

Цей етап передбачає розведення бібліотек до початкової концентрації для вашої системи секвенування та є першим кроком у послідовному розведенні. Після розведення до початкової концентрації бібліотеки готові до денатурації та розведення до кінцевої концентрації завантаження.

Для секвенування, незалежно від використовуваної панелі зондів для збагачення, Illumina рекомендує налаштувати парно-кінцевий прогін зі 151 циклом на кожне зчитування (2 × 151) та з 10 циклами на кожне зчитування індексу. Якщо ви бажаєте отримувати меншу кількість перекритих зчитувань або менше сирого покриття, можна знизити параметри секвенування до 2 × 126 або 2 × 101.

- Обчисліть значення молярності бібліотеки або об'єднаних у пул бібліотек за наведеною далі формулою.
  - Для бібліотек, які відповідають вимогам секвенатора фрагментів ДНК, використовуйте середній розмір, отриманий для бібліотеки.
  - Для всіх інших методів оцінювання якості використовуйте 350 п. о. як середній розмір бібліотеки.

$$\frac{\text{нг/мкл} \times 10^6}{660 \frac{\text{Г}}{\text{моль}} \times \text{середній розмір бібліотеки (п. о.)}} = \text{Молярність (нМ)}$$

Наприклад, якщо концентрація вашої бібліотеки становить 20 нг/мкл, а середній розмір — 350 п. о., отримане значення молярності становить 86,58 нМ.

$$\frac{20 \text{ нг/мкл} \times 10^6}{660 \frac{\text{Г}}{\text{моль}} \times 350 \text{ (п. о.)}} = 86,58 \text{ (нМ)}$$

- Використовуючи значення молярності, розрахуйте об'єми RSB та бібліотек, необхідні для розведення бібліотек до початкової концентрації для вашої системи.

Система секвенування	Мінімальний необхідний об'єм бібліотеки (мкл)	Початкова концентрація (нМ)	Кінцева концентрація завантаження (пМ)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) або 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 нМ — це початкова концентрація для кінцевої концентрації завантаження 350 пМ. За необхідності відрегулюйте кінцеву концентрацію завантаження, використовуючи таблицю нижче.

Кінцева концентрація завантаження (пМ)	Концентрація об'єднаної бібліотеки (нМ)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

3. Розведіть бібліотеки за допомогою RSB:

- **Бібліотеки, кількісно визначені як мультиплексний пул бібліотек**, — розведіть пул до початкової концентрації для вашої системи.
- **Бібліотеки, кількісно визначені окремо**, — розведіть кожну бібліотеку до початкової концентрації для вашої системи. Додайте 10 мкл кожної розведеної бібліотеки в пробірку, щоб створити мультиплексний пул бібліотек.

4. Дотримуючись інструкцій із денатурації та розведення для вашої системи, виконайте розведення до кінцевої концентрації завантаження.

- Для отримання інформації щодо NextSeq 550Dx System див. розділ [Підготовка до секвенування на NextSeq 550Dx на стор. 54](#).
- Для отримання інформації щодо MiSeqDx™ System див. розділ [Підготовка до секвенування на MiSeqDx на стор. 56](#).
- Для отримання інформації щодо NovaSeq 6000Dx System див. розділ [Підготовка до секвенування на NovaSeq 6000Dx на стор. 58](#).

Кінцеві концентрації завантаження є відправною точкою та загальною рекомендацією. Оптимізуйте концентрації для свого робочого процесу та методу кількісного визначення за допомогою подальших прогонів секвенування або шляхом титрування проточної кювети.

## Підготовка до секвенування на NextSeq 550Dx

Використовуйте наведені нижче інструкції для денатурації та розведення бібліотек для секвенування на NextSeq 550Dx Sequencing System.

## Витратні матеріали

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1N NaOH
- 200 мМ Tris-HCl, рН 7,0

## Підготовка

Приготуйте *свіже* розведення 0,2 N NaOH для денатурації бібліотек перед секвенуванням. Щоб невеликі похибки піпетування не впливали на кінцеву концентрацію NaOH, готують додатковий об'єм.



### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Свіжоприготоване розведення 0,2 N NaOH є критично важливим для процесу денатурації. Неналежна денатурація може зменшити вихід.

1. Підготуйте наведені нижче витратні матеріали:

Найменування	Зберігання	Інструкції
HT1	Від -25 °С до -15 °С	Розморозьте за кімнатної температури. Зберігайте за температури від 2 °С до 8 °С, доки не будете готові розводити денатуровані бібліотеки.

2. Об'єднайте наведені нижче об'єми в мікроцентрифужній пробірці, щоб приготувати свіже розведення NaOH:
  - Вода лабораторної якості (800 мкл);
  - 1N NaOH (200 мкл)
 У результаті виходить 1 мл 0,2 N NaOH.
3. Переверніть пробірку кілька разів, щоб перемішати.
4. Змішайте у мікроцентрифужній пробірці наведені нижче об'єми, щоб приготувати 200 мМ Tris-HCl, рН 7,0.
  - Вода лабораторної якості (800 мкл);
  - 1M Tris-HCl, рН 7,0 (200 мкл)
 У результаті виходить 1 мл 200 мМ Tris-HCl, рН 7,0

**ПРИМ.** Тримайте пробірку закритою ковпачком. Використайте свіже розведення протягом **12 годин**.

## Денатурація бібліотек

1. У мікроцентрифужній пробірці такі об'єми бібліотеки та свіжорозведеного 0,2 N NaOH:
  - бібліотека об'ємом 10 мкл;

- 10 мкл 0,2 N NaOH.
2. Виконайте нетривале змішування на вихровій мішалці, а потім відцентрифугуйте за 280 ×g протягом 1 хвилини.
  3. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 5 хвилин.
  4. Додайте 10 мкл 200 мМ Tris-HCl, pH 7.

## Розведення денатурованих бібліотек до 20 пМ

1. Додайте 970 мкл попередньо охолодженого HT1 до пробірки з денатурованими бібліотеками. Результат — денатурована бібліотека 20 пМ.
2. Виконайте нетривале змішування на вихровій мішалці, а потім відцентрифугуйте за 280 ×g протягом 1 хвилини.
3. Помістіть бібліотеки з концентрацією 20 пМ на лід, доки не будете готові перейти до кінцевого розведення.

## Розведення бібліотек до концентрації завантаження

1. Додайте наведені далі об'єми, щоб розвести денатурований розчин бібліотеки з концентрацією 20 пМ до 1,2 пМ.
  - Розчин денатурованої бібліотеки (78 мкл);
  - попередньо охолоджений HT1 (1222 мкл).Загальний об'єм становить 1,3 мл при 1,2 пМ.
2. Переверніть для перемішування, а потім короткочасно центрифугуйте.
3. Перейдіть до секвенування. Інструкції див. у *Довідковому посібнику до секвенатора NextSeq 550Dx (документ № 100000009513)* та *Посібнику користувача застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx в системі NextSeq 550Dx (документ № 200025238)*.

## Підготовка до секвенування на MiSeqDx

Для денатурації та розведення бібліотек перед секвенуванням на системі секвенування MiSeqDx використовуйте наведені нижче вказівки.

### Витратні матеріали

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1N NaOH

### Підготовка

Приготуйте *свіже* розведення 0,2 N NaOH для денатурації бібліотек перед секвенуванням. Щоб невеликі похибки піпетування не впливали на кінцеву концентрацію NaOH, готують додатковий об'єм.

**ЗАСТЕРЕЖЕННЯ**

Свіжоприготоване розведення 0,2 N NaOH є критично важливим для процесу денатурації. Неналежна денатурація може зменшити вихід.

1. Підготуйте наведені нижче витратні матеріали:

Найменування	Зберігання	Інструкції
HT1	Від -25 °C до -15 °C	Розморозьте за кімнатної температури. Зберігайте за температури від 2 °C до 8 °C, доки не будете готові розводити денатуровані бібліотеки.

2. Об'єднайте наведені нижче об'єми в мікроцентрифужній пробірці, щоб приготувати свіже розведення NaOH:

- вода лабораторної якості (800 мкл);
- 1 N NaOH (200 мкл)

У результаті виходить 1 мл 0,2 N NaOH.

**ПРИМ.** Тримайте пробірку закритою ковпачком. Використайте свіже розведення протягом **12 годин**.

**Денатурація бібліотеки 4 нМ**

1. Змішайте наведені далі об'єми в мікроцентрифужній пробірці.
  - Бібліотека 4 нМ (5 мкл);
  - 0,2 N NaOH (5 мкл)
2. Виконайте нетривале змішування на вихровій мішалці, а потім відцентрифугуйте за 280 xg протягом 1 хвилини.
3. Інкубуйте за кімнатної температури протягом 5 хвилин.
4. Додайте 990 мкл попередньо охолодженого HT1 до пробірки з денатурованою бібліотекою. Результат — 1 мл денатурованої бібліотеки 20 пМ.

**Розведення денатурованої бібліотеки з концентрацією 20 пМ**

1. Розведіть до бажаної концентрації, використовуючи наведені далі об'єми.

Концентрація	6 пМ	8 пМ	10 пМ	11 пМ	12 пМ	15 пМ	20 пМ
<b>Бібліотека з концентрацією 20 пМ</b>	180 мкл	240 мкл	300 мкл	330 мкл	360 мкл	450 мкл	600 мкл
<b>Попередньо охолоджений HT1</b>	420 мкл	360 мкл	300 мкл	270 мкл	240 мкл	150 мкл	0 мкл

2. Переверніть для перемішування, а потім короткочасно центрифугуйте.

3. Перейдіть до секвенування. Інструкції див. у *Довідковому посібнику до секвенатора MiSeqDx для MOS v4 (документ № 200010452)* та *Посібнику з робочого процесу Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx для MiSeqDx (документ № 200015661)*.

## Підготовка до секвенування на NovaSeq 6000Dx

Для денатурації та розведення бібліотек для секвенування в системі секвенування NovaSeq 6000Dx дотримуйтеся наведених нижче вказівок.

### Витратні матеріали

- НРЗ (2 N NaOH)
- RSB (Resuspension Buffer)
- 1N NaOH
- 10 мМ Tris-HCl, рН 8,5
- 400 мМ Tris-HCl, рН 8,0
- Пробірка з бібліотекою NovaSeq 6000Dx

### Підготовка

Приготуйте *свіже* розведення 0,2 N NaOH для денатурації бібліотек перед секвенуванням. Щоб невеликі похибки піпетування не впливали на кінцеву концентрацію NaOH, готують додатковий об'єм.



#### ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

Свіжоприготоване розведення 0,2 N NaOH є критично важливим для процесу денатурації. Неналежна денатурація може зменшити вихід.

1. Об'єднайте наведені нижче об'єми в мікроцентрифужній пробірці, щоб розвести 1 N NaOH до 0,2 N NaOH:

Таблиця 4. Режим S2

Реагент	Об'єм для однієї проточної кювети (мкл)	Об'єм для двох проточних кювет (мкл)
Вода лабораторної якості.	40	80
Стоковий 1 N NaOH	10	20

Ці об'єми дають 50 мкл 0,2 N NaOH для однієї проточної кювети або 100 мкл 0,2 N NaOH для двох проточних кювет.

Таблиця 5. Режим S4

Реагент	Об'єм для однієї проточної кювети (мкл)	Об'єм для двох проточних кювет (мкл)
Вода лабораторної якості.	80	160
Стоковий 1 N NaOH	20	40

Ці об'єми дають 100 мкл 0,2 N NaOH для однієї проточної кювети або 200 мкл 0,2 N NaOH для двох проточних кювет.

- Кілька разів переверніть для перемішування або ретельно перемішайте на вихровій мішалці.
- Об'єднайте наведені нижче об'єми в мікроцентрифужній пробірці, щоб приготувати 400 мМ Tris-HCl, pH 8,0.

- Вода лабораторної якості (600 мкл);
- 1 М Tris-HCl, pH 8,0 (400 мкл).

У результаті отримують 1 мл 400 мМ Tris-HCl, pH 8,0

**ПРИМ.** Тримайте пробірку закритою ковпачком. Використайте свіже розведення протягом **12 годин**.

## Створення нормалізованого пулу бібліотек

Концентрація завантаження може бути різною залежно від підготовки бібліотеки, методів кількісного оцінювання і нормалізації.

Дотримуйтеся наведених нижче інструкцій, щоб нормалізувати бібліотеки до відповідної концентрації, а потім об'єднати їх у пул. Бібліотеки, що секвенуються на одній проточній кюветі, мають бути об'єднані в один нормалізований пул.

**ПРИМ.** Максимальна кількість зразків, які можна проаналізувати на одній доріжці, використовуючи Набір Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, становить 192. Це обмеження зумовлене загальною кількістю індексів UD у наборах A та B.

## Нормалізація бібліотек для об'єднання в пул

- Визначте необхідну концентрацію об'єднаної в пул бібліотеки на основі бажаної кінцевої концентрації завантаження.
  - Для кінцевої концентрації завантаження 350 пМ необхідна концентрація об'єднаної в пул бібліотеки становить 1,75 нМ.
  - Для визначення концентрації об'єднаної в пул бібліотеки для іншої кінцевої концентрації завантаження див. розділ [Розведення бібліотеки до початкової концентрації на стор. 53](#).

2. Проведіть нормалізацію бібліотек до бажаної концентрації об'єднаної в пул бібліотеки, використовуючи 10 мМ Tris-HCl, pH 8,5.  
Для отримання допомоги з розведення бібліотек до належної концентрації скористайтеся [калькулятором об'єднання в пул](#) на вебсайті Illumina.

#### Рекомендовані концентрації завантаження

Оптимальна концентрація завантаження ДНК залежить від типу бібліотеки та розміру вставки. Для бібліотек > 450 п. о. можуть знадобитися вищі концентрації завантаження.

### Об'єднання нормалізованих бібліотек у пул та додавання необов'язкового контролю PhiX

1. Змішайте відповідний об'єм кожної нормалізованої бібліотеки в новій мікроцентрифужній пробірці, щоб отримати один із наведених нижче кінцевих об'ємів.

Режим	Кінцевий об'єм (мкл)
S2	150
S4	310

2. **(Необов'язково)** Внесіть 1 % неденатурованого PhiX, як зазначено далі.
- Розведіть 10 нМ PhiX до 2,5 нМ, використовуючи 10 мМ Tris-HCl, pH 8,5.
  - Додайте відповідний об'єм неденатурованого 2,5 нМ PhiX у пробірку з неденатурованим пулом бібліотек.

Режим	Неденатурований 2,5 нМ PhiX (мкл)	Неденатурований пул бібліотек (мкл)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

У разі внесення PhiX рекомендована кількість становить 1 % для добре збалансованих бібліотек. Бібліотеки з низькою різноманітністю можуть потребувати більшої кількості. За роз'ясненнями щодо використання контролю PhiX із бібліотеками з низькою різноманітністю звертайтеся до служби технічної підтримки Illumina.

### Денатурація пулу бібліотек та додаткового контролю PhiX

1. Додайте 0,2 N NaOH у пробірку з денатурованим пулом бібліотек та додатковим PhiX, як наведено далі.

Проточна кювета	0,2 N NaOH	Неденатурований пул бібліотек (мкл)	Отриманий об'єм
S2	37	150	187 мкл або 187,9 мкл з PhiX

Проточна кювета	0,2 N NaOH	Неденатурований пул бібліотек (мкл)	Отриманий об'єм
S4	77	310	387 мкл або 388,9 мкл з PhiX

- Закрийте кришкою, а потім короткочасно перемішайте на вихровій мішалці.
- Центрифугуйте за 280 ×g до 1 хвилини.
- Інкубуйте за кімнатної температури протягом 8 хвилин до денатурації.
- Для нейтралізації додайте 400 мМ Tris-HCl, pH 8,0, як описано нижче.

Режим	400 мМ Tris-HCl, pH 8,0 (мкл)	Отриманий об'єм
S2	38	225 мкл або 225,9 мкл з PhiX
S4	78	465 мкл або 466,9 мкл з PhiX

- Закрийте кришкою, а потім короткочасно перемішайте на вихровій мішалці.
- Центрифугуйте за 280 ×g до 1 хвилини.
- Перенесіть весь об'єм денатурованої бібліотеки або денатурованої бібліотеки та PhiX у пробірку з бібліотекою NovaSeq 6000Dx.
- Перейдіть до секвенування. Інструкції див. у документації на продукт для NovaSeq 6000Dx (документ № 200010105) та DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx для NovaSeq 6000Dx (документ № 200014776).

## Пошук та усунення несправностей

Використовуйте наведену нижче таблицю для усунення несправностей у робочому процесі. Якщо прогін секвенування або підготовка бібліотеки для зразка завершуються невдало двічі, може знадобитися додатковий етап пошуку та усунення несправностей. Зверніться до служби технічної підтримки Illumina.

Спостереження	Можлива причина	Рекомендовані дії
Прогін секвенування не відповідає вимогам контролю якості для прогону	Помилка користувача або лабораторного обладнання в робочому процесі аналізу	<p>Оцініть збагачені бібліотеки, щоб переконатися в належному виході бібліотеки та розподілі фрагментів за розміром. Повторіть підготовку бібліотеки, починаючи з одного з наведених нижче етапів, залежно від того, на якому етапі, імовірно, сталася помилка користувача або обладнання. Якщо це невідомо або сталися інші помилки, зверніться до служби технічної підтримки Illumina для пошуку та усунення несправностей під час прогону.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Повторно виконайте секвенування бібліотек. Див. розділи <a href="#">Підготовка до секвенування на NextSeq 550Dx на стор. 54</a>, <a href="#">Підготовка до секвенування на MiSeqDx на стор. 56</a> або <a href="#">Підготовка до секвенування на NovaSeq 6000Dx на стор. 58</a>.</li> <li>• Повторно виконайте збагачення бібліотек. Див. розділ <a href="#">Гібридизація зондів на стор. 41</a>.</li> <li>• Розпочніть підготовку бібліотеки із самого початку робочого процесу. Див. розділ <a href="#">Інструкції з використання на стор. 23</a>.</li> </ul>
	Проблема з приладом	Зверніться до служби технічної підтримки Illumina.
Помилка під час генерування FASTQ або загальна помилка системи секвенування (наприклад, помилка мережі, помилки під час завантаження/вивантаження реагентів тощо)	Проблема з програмним забезпеченням або приладом	<p>Щоб отримати довідку щодо аналізу, зверніться до посібника модуля або застосунку, або див. <a href="#">Довідковий посібник до секвенатора NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)</a>, <a href="#">вказівки в Довідковому посібнику до секвенатора MiSeqDx для MOS v4 (документ № 200010452)</a> або <a href="#">Документацію на продукт NovaSeq 6000Dx (документ № 200010105)</a>.</p> <p>Для отримання допомоги зверніться до служби технічної підтримки Illumina.</p>

Спостереження	Можлива причина	Рекомендовані дії
Бібліотека ДНК не забезпечує достатнього виходу для завантаження на секвенування	Вимоги до введення зразків не були виконані	Переконайтеся, що кількість внесеного зразка є належною, і повторіть підготовку бібліотеки. Див. <a href="#">Рекомендації щодо внесення зразка на стор. 19</a> .
	Помилка користувача або обладнання в робочому процесі аналізу	Повторіть підготовку бібліотеки, починаючи з одного з наведених нижче етапів, залежно від того, на якому етапі, імовірно, сталася помилка користувача або обладнання. Якщо це невідомо або сталися інші помилки, зверніться до служби технічної підтримки Illumina для пошуку та усунення несправностей під час прогону. <ul style="list-style-type: none"> <li>Повторно виконайте секвенування бібліотек. Див. розділи <a href="#">Підготовка до секвенування на NextSeq 550Dx на стор. 54</a>, <a href="#">Підготовка до секвенування на MiSeqDx на стор. 56</a> або <a href="#">Підготовка до секвенування на NovaSeq 6000Dx на стор. 58</a>.</li> <li>Повторно виконайте збагачення бібліотек. Див. розділ <a href="#">Гібридизація зондів на стор. 41</a>.</li> <li>Розпочніть підготовку бібліотеки із самого початку робочого процесу. Див. розділ <a href="#">Інструкції з використання на стор. 23</a>.</li> </ul>
	Не було дотримано вимог до панелі зондів для збагачення	Переконайтеся, що використовується належна панель зондів для збагачення, і повторіть підготовку бібліотеки. Див. <a href="#">Вимоги до панелі зондів для збагачення на стор. 11</a> .

## Технічні характеристики

### Ефективність роботи з повноекзомними панелями

Ефективність екзомних панелей було протестовано з використанням найменшої (50 нг) та найбільшої (1000 нг) рекомендованої вхідної кількості гДНК клітинної лінії Coriell NA12878 з відомим набором істинних даних для виявлення варіантів зародкової лінії (Coriell platinum genome). Екзомна панель 1 (45 Мб) та екзомна панель 2 (36,8 Мб) були використані як репрезентативні панелі. 24 технічні повторності були протестовані за допомогою аналізу Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з

використанням екзомної панелі 1 (45 Мб) у двох 12-плексних реакціях збагачення. 12 технічних повторностей були протестовані за допомогою аналізу Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з використанням екзомної панелі 2 (36,8 Мб) в одній 12-плексній реакції збагачення. Збагачені бібліотеки були секвензовані на системі секвенування NextSeq 550Dx із використанням модуля DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

У наведеній нижче таблиці представлено середні значення показників вторинного секвенування та розпізнавання варіантів для технічних повторностей, протестованих з кожною панеллю.

Таблиця 6. Ефективність аналізу з двома повноекзомними панелями

Панель	Збагачення унікальних зчитувань із відступами	однорідність покриття	Медіана довжини фрагментів	Повнота виявлення SNV <sup>1</sup>	Прецизійність виявлення SNV <sup>2</sup>	Повнота виявлення інделів <sup>1</sup>	Прецизійність виявлення інделів <sup>2</sup>
Екзомна панель 1 (45 Мб)	80 %	96 %	186 п. о.	96 %	99 %	90 %	89 %
Екзомна панель 2 (36,8 Мб)	93 %	98 %	188 п. о.	96 %	99 %	92 %	93 %

<sup>1</sup> Повнота виявлення = позитивні / (істинно позитивні + хибно негативні)

<sup>2</sup> Прецизійність виявлення = істинно позитивні / (істинно позитивні + хибно позитивні)

## Межа виявлення

Для перевірки межі виявлення використовували стандартний зразок ДНК Horizon HD799. HD799 складається з помірно деградованої ДНК, обробленої формаліном, із відомими SNV, частота алелів яких становить 1–24,5 %. Використовувалася мінімальна рекомендована кількість введеної ДНК (50 нг), а також оцінювався показник виявлення варіантів для SNV із частотою варіантного алеля (VAF)  $\geq 5,0$  %. Було протестовано 16 технічних повторностей за допомогою аналізу Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з використанням робочого процесу для FFPE-зразків; збагачення проводилося за допомогою пан-онкологічної панелі (1,94 Мб) у 16 окремих збагаченнях (1-плексних), після чого виконувалося секвенування на секвенаторі NextSeq 550Dx з модулем DNA GenerateFASTQ Dx.

Усі зразки відповідали специфічним вимогам до ефективності панелі для кожного зразка, як показано в таблиці нижче.

Таблиця 7. Ефективність зразків для визначення межі виявлення

Панель	Показник виявлення варіантів для SNV із VAF $\geq$ 5,0 %	Середня однорідність покриття
Пан-онкологічна панель для збагачення (1,94 Мб, 523 гени)	100 %	99 %

## Інтерферентні речовини

Вплив потенційних інтерферентів було оцінено в застосунку Illumina DNA Prep with Enrichment Dx шляхом оцінювання ефективності аналізу за наявності інтерферентних речовин.

### Інтерференція в цільній крові

Ацетамінофен (екзогенна сполука, препарат), креатинін і тригліцериди (ендогенні метаболіти) досліджували шляхом їх додавання до зразків цільної крові людини перед екстракцією ДНК. Для оцінки інтерференції, спричиненої взяттям крові (неповне заповнення пробірки), у зразки цільної крові також додавали ЕДТК. Окрім того, для оцінки інтерференції, спричиненої підготовкою зразків, до ДНК, екстрагованої з цільної крові, додавали етанол молекулярного ступеня чистоти.

У таблиці нижче показано тестові концентрації для кожного інтерферента.

Таблиця 8. Потенційно інтерферентні речовини і концентрації, протестовані в цільній крові

Досліджувана речовина	Тестова концентрація
Ацетамінофен	15,6 мг/дл* Утричі більше за найвищу концентрацію, що очікується після введення терапевтичної дози препарату.
Креатинін	15 мг/дл* Найвища концентрація, що спостерігається у популяції.
Тригліцериди	1,5 г/дл* Найвища концентрація, що спостерігається у популяції.
ЕДТК	6 мг/мл Утричі більше за концентрацію, що очікується в крові, зібраній у пробірки з ЕДТК.
Етанол молекулярного ступеня чистоти	15 % об/об В елюаті після екстракції ДНК.

\* Відповідно до CLSI EP37-ED1:2018

Для кожної інтерферентної речовини було протестовано 12 технічних повторностей за допомогою аналізу в програмі Illumina DNA Prep with Enrichment Dx зі збагаченням екзомною панеллю 1 (45 Мб) в одному (12-плексному) збагаченні, а потім секвеновано на секвенаторі NextSeq 550Dx із використанням модуля DNA GenerateFASTQ Dx.

Для протестованих речовин усі 12 зразків відповідали вимогам до ефективності зразків, і жодної інтерференції з характеристиками ефективності аналізу виявлено не було.

## Інтерференція у тканині FFPE

Два колоректальні зразки FFPE було досліджено за наявності та відсутності гемоглобіну в кількості 0,1 мг на один зріз FFPE завтовшки 10 мкм, щоб змодельювати найгірший сценарій 50 % контамінації зразка тканини FFPE кров'ю з високим рівнем гемоглобіну. Зразки досліджували за допомогою аналізу Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з використанням пан-онкологічної панелі для збагачення 1 (1,94 Мб) як репрезентативної панелі в реакціях збагачення 1-plex. Потім збагачені бібліотеки секвенували на секвенаторі NextSeq 550Dx за допомогою модуля DNA GenerateFASTQ Dx. Усі зразки відповідали вимогам до робочих характеристик зразків, і було продемонстровано, що гемоглобін не впливає на роботу аналізу.

Щоб оцінити інтерференцію, зумовлену підготовкою зразка, до ДНК, екстрагованої зі зразка тканини сечового міхура FFPE, додавали два екзогенні сполуки. Досліджені екзогенні речовини є розчинами для екстракції, які зазвичай використовують під час процесу екстракції ДНК. Їх наведено з дослідженими кількостями в таблиці нижче.

Розчини досліджуваних речовин є комерційно доступними у наборах для виділення ДНК на основі стовпців.

Таблиця 9. Потенційно інтерферувальні екзогенні речовини та досліджені концентрації у FFPE

Досліджувана речовина	Досліджена концентрація (мкл/30 мкл елюату)
Розчин для депарафінізації	113 x 10 <sup>-6</sup>
Буфер для промивання AW2	0,417

Для кожної інтерферувальної речовини вісім технічних повторів досліджували за допомогою аналізу Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, збагачували пан-онкологічною панеллю збагачення (1,94 Мб) у реакціях збагачення 1-plex, а потім секвенували на секвенаторі NextSeq 550Dx за допомогою модуля DNA GenerateFASTQ Dx.

Для обох досліджених речовин усі вісім зразків відповідали вимогам до робочих характеристик зразків, і жодної інтерференції з роботою аналізу не спостерігалось.

## Перехресне забруднення

Зразки гДНК клітинної лінії Coriell NA12878 (жіноча стать, 10 зразків), гДНК клітинної лінії Coriell NA12877 (чоловіча стать, 12 зразків) та контрольні зразки без матриці (NTC, 2 зразки) були протестовані за допомогою аналізу Illumina DNA Prep with Enrichment Dx з використанням планшета з шаховим розташуванням зразків. Для всіх зразків використовували максимальну рекомендовану кількість вихідної гДНК (1000 нг) як найбільш сувору умову для оцінки перехресного забруднення зразків. Тестування проводилося двічі двома окремими операторами. Екзомна панель 1 (45 Мб) використовувалася в 12-

плексних реакціях збагачення. Збагачені бібліотеки секвенували на приладі NextSeq 550Dx з використанням DNA GenerateFASTQ Dx. Оцінку проводили шляхом аналізу покриття специфічної для чоловічої статі Y-хромосоми в жіночих зразках порівняно з фоновими рівнями повного планшета жіночих зразків, а також шляхом оцінки представленості індексів у зразках NTC.

Таблиця 10. Результати перехресного забруднення

<b>Жіночі зразки з покриттям чоловічої Y-хромосоми на рівні &lt; 3x фонового шуму</b>	<b>Представленість індексів у зразках NTC</b>
100 %	< 0,0005 %

## Ефективність застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Характеристики ефективності застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx для системи NovaSeq 6000Dx наведені в *Інструкції з використання NovaSeq 6000Dx (документ № 200025276)*.

Застосунок DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx на NextSeq 550Dx забезпечує ті самі робочі процеси вторинного аналізу, що й застосунок на NovaSeq 6000Dx, у тому числі такі три процеси: генерація FASTQ, генерація FASTQ та VCF для виявлення варіантів зародкової лінії, а також генерація FASTQ та VCF для розпізнавання соматичних варіантів.

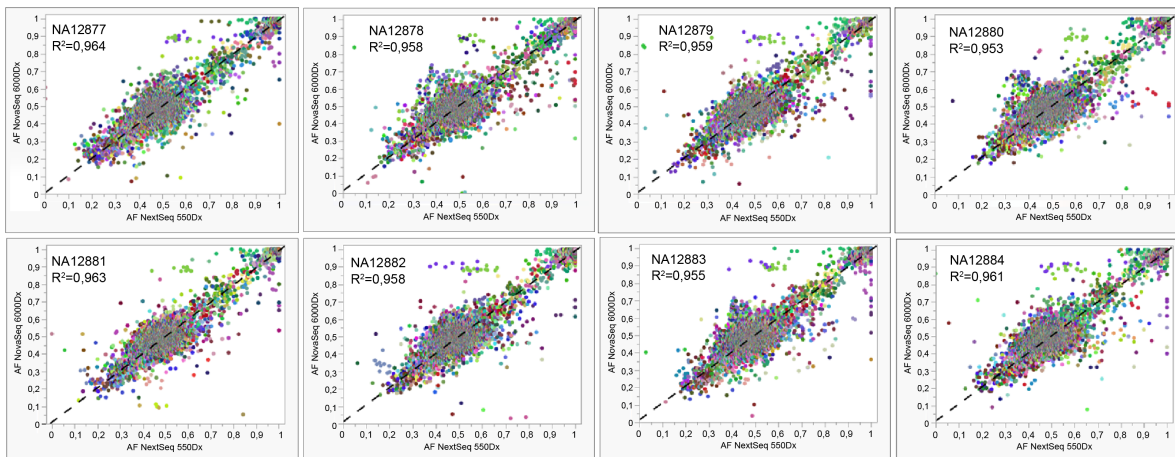
Порівняння ефективності вторинного аналізу була отримана для однієї і тієї ж підготовки бібліотек, секвенованих на обох платформах. Показник виявлення варіантів ([Таблиця 11](#)) та узгодженість частот (див. [Рисунок 1](#)) для зразків гДНК клітинної лінії Coriell були оцінені за допомогою репрезентативного аналізу, розробленого для дослідження різноманітних генів, що охоплюють 1 970 505 основ (9 232 мішені) в усіх 23 хромосомах людини. Було випробувано вісім зразків ДНК Platinum Genome: сім у шести технічних повторностях (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) та один (NA12881) у п'яти технічних повторностях (див. [Рисунок 1](#)). Бібліотеки секвенували у трьох прогонах на кожному із секвенаторів NovaSeq 6000Dx та NextSeq 550Dx, а виявлення варіантів проводили за допомогою робочого процесу аналізу «Генерація FASTQ та VCF для виявлення варіантів зародкової лінії» застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

На основі сильної кореляції між ефективністю застосунку на секвенаторах NovaSeq 6000Dx і NextSeq 550Dx було встановлено, що характеристики ефективності вторинного аналізу, наведені в *Інструкції з використання секвенатора NovaSeq 6000Dx (документ № 200025276)*, також дійсні і для аналізу DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx на секвенаторі NextSeq 550Dx.

Таблиця 11. Ефективність застосунку — показник виявлення варіантів SNV, інсерцій і делецій

Панель	Показник виявлення варіантів на NovaSeq 6000Dx	Показник виявлення варіантів на NextSeq 550Dx
Пангеномна панель (1,97 Мб, 9 232 мішені, 23 хр.)	99,9 %	99,9 %

Рисунок 1. Порівняння частоти варіантів для прогонів на NovaSeq 6000Dx і NextSeq 550Dx за допомогою аналізу в застосунку DRAGEN для IDPE Dx



## Додаток. Послідовності адаптерів індексів UD Illumina

Ці унікальні подвійні (UD) індексні адаптери розташовані в планшеті таким чином, щоб забезпечити дотримання рекомендованої стратегії поєднання. Індексні адаптери мають довжину 10 основ замість типових восьми основ.

### Індексні адаптери 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [ i7 ] GTCTCGTGGGCTCGG

### Індексні адаптери 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [ i5 ] TCGTCGGCAGCGTC

Наведена нижче послідовність використовується для тримінгу адаптерів Зчитування 1 і Зчитування 2.

CTGTCTCTTATACACATCT

## Індексні адаптери Plate A/Set 1

Назва індексу	Основи i7 в адаптері	Основи i5 в адаптері
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT

Назва індексу	Основи i7 в адаптері	Основи i5 в адаптері
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TГАГАКАГТА
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	СТАСТСАГТС	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CSTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	ТААТGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	СТААТГАТGG
UDP0019	СТААТГАТGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCTT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	ТААGGAAACGT
UDP0024	GТАТGТАGAA	СТААСТGТАА
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATG
UDP0026	CCTCGCAACC	AАТАGAGCAA
UDP0027	TGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	СТТАТGGAAТ
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA

Назва індексу	Основи i7 в адаптері	Основи i5 в адаптері
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAAC TGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATG	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	TTCCGTGCGA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA

Назва індексу	Основи i7 в адаптері	Основи i5 в адаптері
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	ГГАТАККАГА	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGCАСТААТG	TGACTACATA
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGT	CTCATAGCGA
UDP0083	GTAAGGCATA	AGACACATTA
UDP0084	GTCCACTTGT	GCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	CATGAGTACT
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	CATGTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGAAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

## Індексні адаптери Plate B/Set 2

Назва індексу	Основи i7 в адаптері	Основи i5 в адаптері
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGСТААТТА	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGСТАACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCTT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Назва індексу	Основи і7 в адаптері	Основи і5 в адаптері
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCCTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTATTATAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTATTATAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA

Назва індексу	Основи і7 в адаптері	Основи і5 в адаптері
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGTAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGTGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	ГATAAGKT
UDP0177	TATATTTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	АТАССТGGAT	CAACGTCAGC

Назва індексу	Основи i7 в адаптері	Основи i5 в адаптері
UDP0185	ГТТGGACCGT	ТСТTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	СТАATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	ТTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGТАCT

## Історія редакцій

Документ	Дата	Опис зміни
Документ № 200038118, вер. 01	Грудень 2025 р.	<ul style="list-style-type: none"> <li>Видалено посилання на модуль Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Module для секвенатора NextSeq 550Dx.</li> <li>Уточнено процедуру «Очищення після тагментації».</li> <li>Оновлено номер документа «Довідковий посібник до приладу MiSeqDx» для MOS v4.</li> </ul>
Документ № 200038118, вер. 00	Липень 2023 р.	<p>Початковий випуск. Попередній документ 200019584 замінено цим документом. Зміни від документа 200019584 вер. 2 у цьому новому документі:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Додано вміст для підтримки секвенування на секвенаторі NextSeq 550Dx з використанням застосунку DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx для NextSeq 550Dx.</li> <li>Уточнено перелік «Реагенти, яких немає в комплекті».</li> <li>Додано інформацію про повідомлення щодо інцидентів до розділу «Попередження та запобіжні заходи».</li> <li>Уточнено очікувані характеристики «Збагачення бібліотек».</li> <li>Додано вказівку щодо приготування 400 мМ Tris-HCl, pH 8,0.</li> <li>Видалено друкарську помилку в етапі «Підготовка до секвенування».</li> </ul> <p>Зміни, внесені раніше до документа 200019584:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Додано вміст для підтримки секвенування на секвенаторі NovaSeq 6000Dx.</li> <li>Додано назви систем секвенування та номери за каталогом.</li> <li>Видалено інформацію про унікальне подвійне індексування для бібліотек з одинарною індексацією.</li> </ul>

## Патенти й товарні знаки

Цей документ і його вміст є власністю компанії Illumina, Inc. та її філій (надалі — Illumina). Він призначений лише для того, щоб користувач використовував вироби тільки за угодою в цілях, описаних у цьому документі. Цей документ і його вміст не слід використовувати або поширювати з будь-якою іншою метою та/або для іншого обговорення, розкриття або відтворення тим або іншим чином без попередньої письмової згоди компанії Illumina. Цим документом компанія Illumina не надає жодного дозволу на свій патент, товарний знак, авторське право або загальноприйняті права, а також на подібні права будь-яких третіх сторін.

Щоб гарантувати правильне та безпечне використання виробів, описаних у цьому документі, кваліфікований і належним чином навчений персонал повинен суворо та чітко дотримуватись інструкцій, описаних у цьому документі. Перед використанням цих виробів потрібно повністю прочитати й зрозуміти весь вміст цього документа.

НЕПОВНЕ ВИВЧЕННЯ ВСІХ ЗАЗНАЧЕНИХ У ЦЬОМУ ДОКУМЕНТІ ВКАЗІВОК І ЇХ НЕЧІТКЕ ДОТРИМАННЯ МОЖЕ ПРИЗВОДИТИ ДО ПОШКОДЖЕННЯ ЦИХ ВИРОБІВ, ТРАВМУВАННЯ ЛЮДЕЙ, ЗОКРЕМА КОРИСТУВАЧІВ АБО ІНШИХ ОСІБ, І ДО ПОШКОДЖЕННЯ ІНШОЇ ВЛАСНОСТІ, А ТАКОЖ ПРИЗВЕДЕ ДО ВТРАТИ БУДЬ-ЯКИХ ГАРАНТІЙНИХ ЗОБОВ'ЯЗАНЬ, ЗАСТОСОВНИХ ДО ЦИХ ВИРОБІВ.

КОМПАНІЯ ILLUMINA НЕ НЕСЕ ЖОДНОЇ ВІДПОВІДАЛЬНОСТІ, ЩО ВИНΙΚАЄ ВНАСЛІДОК НЕНАЛЕЖНОГО ВИКОРИСТАННЯ ВИРОБІВ, ОПИСАНИХ У ЦЬОМУ ДОКУМЕНТІ (ВКЛЮЧНО З ЙОГО ЧАСТИНАМИ АБО ПРОГРАМНИМ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯМ).

© 2025 Illumina, Inc. Усі права застережено.

Усі товарні знаки є власністю компанії Illumina, Inc. або їхніх відповідних власників. Конкретну інформацію про товарні знаки зазначено на сторінці [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Контактна інформація



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A. (США)  
+1 800 809.ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (за межами Північної Америки)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



**Австралійський спонсор**  
Illumina Australia Pty Ltd  
Nursing Association Building  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Австралія

## Маркування виробу

Повний список символів, які може бути зображено на пакованні або маркуванні виробу, див. у поясненні символів на вебсайті [support.illumina.com](http://support.illumina.com) у вкладці *Documentation* (Документи) для вашого набору.