

DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT
POUR L'EXPORTATION UNIQUEMENT

Utilisation prévue

L'Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx est un ensemble de réactifs et de consommables utilisés pour préparer les bibliothèques d'échantillons à partir d'ADN génomique dérivé de cellules et de tissus humains. Des panels de sondes fournis par l'utilisateur sont nécessaires pour la préparation de bibliothèques qui ciblent des régions génomiques d'intérêt spécifiques. Les bibliothèques d'échantillons ainsi générées sont destinées aux systèmes de séquençage d'Illumina.

Principes procéduraux

L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit est destiné à la préparation de bibliothèques de séquençage d'ADN enrichies pour les régions ciblées à partir d'ADN génomique dérivé de cellules et de tissus humains.

Des panels d'oligonucléotides biotinylés fournis par l'utilisateur sont requis pour l'enrichissement de la cible. L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit est compatible avec une large gamme de tailles de panel, allant des plus petites (< 20 000 sondes) aux plus grandes (> 200 000 sondes). Les bibliothèques enrichies générées sont destinées au séquençage sur les systèmes de séquençage d'Illumina.

La procédure avec l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit comprend les étapes suivantes :

- **Tagmentation de l'ADN génomique** : utilise l'Enrichment BLT Small (EBLTS) pour tagmenter l'entrée d'ADN. La tagmentation consiste en la fragmentation de l'ADNg et l'ajout d'adaptateurs en une seule étape. Une entrée minimale d'ADN de 50 ng est nécessaire pour saturer l'EBLTS dans la réaction de tagmentation. Une fois saturé, l'EBLTS fragmente un ensemble défini de molécules d'ADN pour générer des bibliothèques normalisées présentant une distribution de taille des fragments uniforme.
- **Purification post-tagmentation** : purifie l'ADN marqué d'adaptateurs sur l'EBLTS à utiliser dans l'amplification.
- **Amplification de l'ADN tagmenté** : amplifie l'ADN tagmenté au moyen d'un programme PCR à cycle limité. Des index doubles uniques (UD) sont ajoutés aux extrémités des fragments d'ADN, permettant l'inscription d'un code à barre double unique sur les bibliothèques d'ADN et la génération d'amplifiats durant le séquençage.
- **Purification des bibliothèques** : utilise la procédure de purification des billes pour purifier et sélectionner la taille des bibliothèques d'ADN amplifiées.
- **Regroupement des bibliothèques** : combine les bibliothèques d'ADN avec des index uniques dans un seul groupe contenant jusqu'à 12 bibliothèques. Vous pouvez regrouper les bibliothèques par volume ou par masse.
- **Hybridation des sondes** : consiste en une réaction d'hybridation durant laquelle les bibliothèques d'ADN double brin sont dénaturées et un panel de sondes d'ADN biotinylés est hybridé aux régions génomiques ciblées.

- L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit est compatible avec plusieurs panels. L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit n'inclut pas de panel d'enrichissement. Les panels de sondes sont fournis par l'utilisateur et doivent être conformes aux spécifications requises. Les réactifs de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sont compatibles aussi bien avec les panels d'oligonucléotides d'ADN d'enrichissement de fournisseurs tiers qu'avec ceux d'Illumina qui sont conformes aux spécifications requises. Pour plus d'informations sur les spécifications requises pour les panneaux tiers, reportez-vous à la section Exigences relatives aux [Exigences relatives aux panels de sondes d'enrichissement](#), page 11.
- **Capture des sondes hybridées** : utilise les Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) pour capturer les sondes biotinylées hybridées aux régions d'intérêt ciblées.
- **Amplification des bibliothèques enrichies** : utilise la PCR pour amplifier les bibliothèques enrichies.
- **Purification des bibliothèques enrichies amplifiées** : utilise une procédure de purification des billes pour purifier les bibliothèques enrichies prêtes pour le séquençage.
- **Séquençage** : le séquençage des bibliothèques enrichies est réalisé sur les systèmes de séquençage MiSeqDx, NextSeq 550Dx ou NovaSeq 6000Dx. Pour MiSeqDx and NextSeq 550Dx, le module intégré DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager est utilisé pour la configuration de l'analyse de séquençage, la surveillance de l'analyse et l'analyse primaire (génération de fichiers FASTQ depuis la définition des bases). Pour le NovaSeq 6000Dx, l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx est utilisée pour la configuration des cycles et l'analyse secondaire avec plusieurs flux de travail disponibles.

Limites de la procédure

- Destiné au diagnostic *in vitro*.
- L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit est compatible avec l'ADN génomique dérivé de cellules et de tissus humains.
- L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit est compatible avec les apports d'ADNg double brin de 50 à 1000 ng. La performance n'est pas garantie avec des entrées hors de ces seuils.
- L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit n'inclut pas les réactifs pour l'extraction d'ADN. Les résultats de l'analyse, y compris ceux du test d'interférence, indiqués dans la section [Caractéristiques de performance](#), page 60 à la page 1 ont été obtenus au moyen de sang entier et de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FPPE) comme types d'échantillons représentatifs avec des trousse d'extraction d'ADN représentatives. Tous les tests diagnostiques développés en vue d'être utilisés avec les réactifs de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit requièrent une validation complète de tous les aspects de la performance avec la trousse d'extraction d'ADN choisie.
- L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx kit n'est pas recommandé pour les échantillons FFPE de mauvaise qualité avec $\Delta Cq > 5$. L'utilisation d'échantillons avec $\Delta Cq > 5$ est possible, mais pourrait augmenter les risques d'échec de la préparation de la bibliothèque ou diminuer les performances du test.

- Les réactifs de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ont été configurés et testés pour les apports d'échantillons, les réactions d'enrichissement et la plexité spécifiées dans le tableau suivant.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Apport d'échantillon	Réactions d'enrichissement	Plexité d'enrichissement
Trousse de 16 échantillons	Mauvaise qualité (FFPE)	16 réactions	Simple
Trousse de 96 échantillons	Haute qualité (p. ex. sang entier)	8 réactions	12 niveaux

- Le traitement de l'entrée FFPE a été testé et est exclusivement recommandé pour les réactions d'enrichissement simple avec la trousse à 16 échantillons.
- Pour la trousse à 96 échantillons, des plexités non standard (de 2 à 11 niveaux) sont possibles mais présentent les limites suivantes :
 - Le traitement d'échantillons dans des réactions d'enrichissement de 2 à 11 niveaux réduit le débit de la trousse.
 - Des résultats optimaux ne sont pas garantis. Une optimisation supplémentaire peut être nécessaire pour obtenir un rendement d'enrichissement approprié pour les plexités non standard.
 - La sélection d'adaptateurs d'index avec des séquences diverses est nécessaire pour les stratégies de regroupement dont la plexité est faible (de 2 à 8 niveaux) afin d'optimiser l'équilibre des couleurs pour une analyse des données et un séquençage réussis. Le module DNA GenerateFASTQ Dx des systèmes MiSeqDx et NextSeq 550Dx propose des options pour les combinaisons d'index à équilibrage de couleurs durant la configuration de l'analyse. Pour plus d'informations sur les stratégies de mise en commun, reportez-vous à [Méthodes de regroupement, page 36](#).
- L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit est limité à la production de bibliothèques enrichies séquencées sur les systèmes MiSeqDx, NextSeq 550Dx et NovaSeq 6000Dx uniquement. L'utilisation d'autres systèmes de séquençage implique une validation complète de tous les aspects de la performance.
- Les panels d'enrichissement ne sont pas inclus avec ce produit. Les résultats de l'analyse indiqués dans la section [Caractéristiques de performance, page 60](#) ont été obtenus au moyen de panels d'enrichissement représentatifs et sont fournis à titre d'information uniquement. Les caractéristiques de la performance analytique ne servent qu'à illustrer les capacités générales du test et n'établissent pas de capacités ni de pertinence en ce qui a trait aux demandes de test particulières. Tous les tests diagnostiques développés en vue d'être utilisés avec ces réactifs requièrent une validation complète de tous les aspects de la performance.
- L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit est compatible avec les panels d'Illumina ainsi que ceux de fournisseurs tiers. Cependant, la performance n'est pas garantie avec des panels d'enrichissement de fournisseurs tiers qui ne sont pas conformes aux exigences relatives aux panels. Pour plus d'informations sur les exigences du panneau, reportez-vous à [Exigences relatives aux panels de sondes d'enrichissement, page 11](#).

- L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit utilise une durée d'hybridation de 2 heures. L'utilisation d'une durée d'hybridation plus longue peut affecter les indicateurs de rendement.
- Les modules DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager pour MiSeqDx et NextSeq 550Dx ne fournissent que des fichiers FASTQ. Si vous utilisez ces modules, vous êtes tenu d'effectuer une validation de l'analyse secondaire.
- L'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx est disponible sur NovaSeq 6000Dx. L'application prend en charge plusieurs flux de travail d'analyse secondaire, notamment la génération de FASTQ, la génération de FASTQ et de VCF pour la détection de variantes germinales, et la génération de FASTQ et de VCF pour la détection de variantes somatiques. Si vous utilisez l'application pour la génération de VCF, vous n'avez pas besoin d'effectuer la validation de l'analyse secondaire.
- Pour connaître les limites de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lorsqu'elle est utilisée avec le *NovaSeq 6000Dx*, consultez la notice de l'instrument *NovaSeq 6000Dx* (document n° 200025276).

Composants du produit

L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit comprend les composants suivants :

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, n° de référence 20051354 (16 échantillons) ou n° de référence 20051352 (96 échantillons)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, n° de référence 20051355 (16 échantillons) ou n° de référence 20051353 (96 échantillons)
- Module Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx pour NextSeq 550Dx, n° de référence 20063024
- Module Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx pour MiSeqDx, n° de référence 20063022
- L'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx est disponible sur NovaSeq 6000Dx, ref n° 20074609

Réactifs fournis

Il est nécessaire de compléter l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx avec l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A ou l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B. Vous pouvez réaliser le nombre suivant de réactions d'enrichissement et de préparation de bibliothèques au moyen de la trousse de 16 ou 96 échantillons.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Apport d'échantillon	Réactions d'enrichissement	Plexité d'enrichissement
Trousse de 16 échantillons	Mauvaise qualité (FFPE)	16 réactions	Simple

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Apport d'échantillon	Réactions d'enrichissement	Plexité d'enrichissement
Trousse de 96 échantillons	Haute qualité (p. ex. sang entier)	8 réactions	12 niveaux

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx avec index UD, ensembles A/B

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, stockage à une température maintenue entre -15°C et -15°C

Les réactifs suivants sont expédiés à température ambiante. Rangez rapidement les réactifs à la température de stockage indiquée afin de garantir leur performance.

Nom du réactif	Quantité de tubes		Couleur du bouchon	Volume de remplissage	Ingrédients actifs
	16 échantillons (n° 20050020)	96 échantillons (n° 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Rouge	350 µl	Solution détergente dans l'eau.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Vert	41 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant du détergent et des sels.
Billes de nettoyage (CB, pour Cleanup Beads)	1	S. O.*	Rouge	10 ml	Billes paramagnétiques pour la phase solide dans une solution aqueuse tamponnée.

* Les billes de nettoyage pour la trousse à 96 échantillons sont incluses dans l'Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (n° 20050030).

Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 échantillons), stockage à une température maintenue entre 15°C et 30°C

Les billes de nettoyage sont incluses dans l'Illumina Prep Dx Cleanup Beads (n° de réf. 20050030) pour les trousse à 96 échantillons. Le réactif suivant est expédié à température ambiante. Rangez rapidement les réactifs à la température de stockage indiquée afin de garantir leur performance. Les billes de nettoyage sont incluses dans Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (n° de réf. 20050020) pour les trousse à 16 échantillons.

Nom du réactif	Quantité	Couleur du bouchon	Volume de remplissage	Ingrédients actifs
Billes de nettoyage (CB, pour Cleanup Beads)	4	Rouge	10 ml	Billes paramagnétiques pour la phase solide dans une solution aqueuse tamponnée.

Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, stockage à une température maintenue entre 2°C et 8°C

Les réactifs suivants sont expédiés réfrigérés. Rangez rapidement les réactifs à la température de stockage indiquée afin de garantir leur performance. Conservez le tube de stockage d'eBLTS en position verticale de manière à ce que les billes soient toujours submergées dans le tampon.

Nom du réactif	Quantité de tubes		Couleur du bouchon	Volume de remplissage		Ingrédients actifs
	16 échantillons (n° 20050021)	96 échantillons (n° 20050026)		16 échantillons	96 échantillons	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Jaune	200 µl	290 µl	Billes magnétiques de streptavidine liées aux transposomes dans une solution aqueuse tamponnée contenant du glycérol, de l'EDTA, du dithiothréitol, des sels et du détergent.
Tampon de resuspension	1	4	Transparent	1,8 ml	1,8 ml	Solution aqueuse tamponnée.

Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, stockage à une température maintenue entre -25°C et -15°C

Les réactifs suivants sont expédiés congelés. Rangez rapidement les réactifs à la température de stockage indiquée afin de garantir leur performance.

Nom du réactif	Quantité de tubes		Couleur du bouchon	Volume de remplissage		Ingrédients actifs
	16 échantillons (n° 20050022)	96 échantillons (n° 20050027)		16 échantillons	96 échantillons	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Transparent	290 µl	290 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant du sel de magnésium et du diméthyl-formamide.
EPM (Enhanced PCR Mix)	2	4	Transparent	200 µl	610 µl	ADN polymérase et dNTP dans une solution aqueuse tamponnée.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 échantillons), stockage à une température maintenue entre 2°C et 8°C

Les réactifs suivants sont inclus dans l'Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (n° de réf. 20050023) pour les trousse à 16 échantillons. Les réactifs sont inclus dans l'Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (n° de réf. 20050028) pour les trousse à 96 échantillons.

Les réactifs suivants sont expédiés réfrigérés. Rangez rapidement les réactifs à la température de stockage indiquée afin de garantir leur performance.

Nom du réactif	Quantité de tubes	Couleur du bouchon	Volume de remplissage	Ingrédients actifs
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Transparent	1,2 ml	Billes magnétiques de streptavidine dans une solution aqueuse tamponnée contenant du formamide, du détergent et des sels.

Nom du réactif	Quantité de tubes	Couleur du bouchon	Volume de remplissage	Ingrédients actifs
Tampon de resuspension	1	Transparent	1,8 ml	Solution aqueuse tamponnée.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Transparent	200 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant du détergent et des sels.
Tampon d'éluion cible 2 (ET2)	1	Transparent	200 µl	Solution aqueuse tamponnée.

Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 échantillons), stockage à une température maintenue entre 2°C et 8°C

Les réactifs suivants sont inclus dans Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (n° de réf. 20050028) pour les trousse à 96 échantillons. Les réactifs sont inclus dans l'IlluminaDNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (n° de réf. 20050023) pour les trousse à 16 échantillons.

Les réactifs suivants sont expédiés réfrigérés. Rangez rapidement les réactifs à la température de stockage indiquée afin de garantir leur performance.

Nom du réactif	Quantité de tubes	Couleur du bouchon	Volume de remplissage	Ingrédients actifs
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Transparent	1,2 ml	Billes magnétiques de streptavidine dans une solution aqueuse tamponnée contenant du formamide, du détergent et des sels.
Tampon de resuspension	4	Transparent	1,8 ml	Solution aqueuse tamponnée.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Transparent	200 µl	Solution aqueuse tamponnée contenant du détergent et des sels.
Tampon d'éluion cible 2 (ET2)	1	Transparent	200 µl	Solution aqueuse tamponnée.

Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, stockage à une température maintenue entre -25°C et -15°C

Les réactifs suivants sont expédiés congelés. Rangez rapidement les réactifs à la température de stockage indiquée afin de garantir leur performance.

Nom du réactif	Quantité de tubes		Couleur du bouchon	Volume de remplissage	Ingrédients actifs
	16 échantillons (n° 20050024)	96 échantillons (n° 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Transparent	580 µl	Solution détergente dans l'eau.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Ambre	4,1 ml	Solution aqueuse tamponnée contenant des sels et du détergent.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Transparent	320 µl	Mélange de primers PCR (oligonucléotides).
2N NaOH (HP3)	1	1	Transparent	200 µl	Solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 2N.
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Bleu	480 µl	Solution aqueuse tamponnée avec ADN Cot-1, agent de surpeuplement et formamide.
EPM (Enhanced PCR Mix)	2	1	Transparent	200 µl	ADN polymérase et dNTP dans une solution aqueuse tamponnée.

Ensemble Dx Illumina Unique Dual Index A/B, à conserver entre -25°C et -15°C

Les réactifs suivants sont expédiés congelés. Rangez rapidement les réactifs à la température de stockage indiquée afin de garantir leur performance. Pour les séquences d'adaptateurs d'index, consultez [Annexe : Séquences d'adaptateurs d'index UD d'Illumina, page 64](#).

Composant	Quantité
Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 index), n° 20050038	1
Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 index), n° 20050039	1

Réactifs non fournis

Réactifs nécessaires, non fournis

- Réactifs de purification et d'extraction d'ADN
- Réactifs pour quantification d'ADN
- Éthanol (200 pour la biologie moléculaire)
- Eau sans nucléase
- Tris-HCl 1M, pH 7,0
- Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 à 8,5
- Solution de NaOH 1N, de qualité biologie moléculaire
- Si vous utilisez le système de séquençage NextSeq 550Dx :
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (n° de référence 20028871)
- Si vous utilisez le système de séquençage MiSeqDx :
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (n° de référence 20037124)
- Si vous utilisez le système de séquençage NextSeq 6000Dx :
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (n° de référence 20046931)
 - Kit de réactifs NovaSeq 6000Dx S4 (300 cycles) (n° de référence 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (n° de référence 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (n° de référence 20062293)
 - Tube de bibliothèques pour NovaSeq 6000Dx (n° de référence 20062290)
 - Tube de bibliothèques pour NovaSeq 6000Dx, boîte de 24 (n° de référence 20062291)

Exigences relatives aux panels de sondes d'enrichissement

Les réactifs de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sont compatibles aussi bien avec les panels d'oligonucléotides d'ADN d'enrichissement de fournisseurs tiers qu'avec ceux d'Illumina. Si vous utilisez des sondes d'ADN biotinylées de fournisseurs tiers (panels préconçus ou personnalisés), assurez-vous qu'elles sont conformes aux spécifications requises.

L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit a été optimisé et validé en tenant compte des spécifications suivantes relatives aux panels de fournisseurs tiers. Une performance comparable n'est pas garantie lors de l'utilisation de panels de fournisseurs tiers qui ne sont pas conformes aux spécifications.

- Longueur de sonde de 80 pb ou 120 pb
- Entre 500 et 675 000 sondes
- ADN à brin unique ou double brin
- Entrée de sonde totale ≥ 3 pmol pour des plexités d'enrichissement allant d'un à 12 niveaux

Stockage et manipulation

- La température ambiante correspond à une température de 15 à 30°C.
- Les réactifs sont stables lorsqu'ils sont entreposés comme indiqué jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes des trousseaux. Pour les températures de stockage, se reporter à [Réactifs fournis, page 4](#).
- Les réactifs congelés sont stables pendant un maximum de quatre cycles gel-dégel qui doivent se produire avant la date de péremption indiquée.
- La procédure avec l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit contient les points d'arrêt sûr suivants :
 - Après l'étape [Amplification de l'ADN tagmenté, page 31](#), les bibliothèques amplifiées sont stables pendant une durée maximale de 30 jours lorsqu'elles sont stockées à une température comprise entre -25°C et -15°C.
 - Après l'étape [Purification des bibliothèques, page 33](#), les bibliothèques purifiées sont stables pendant une durée maximale de 30 jours lorsqu'elles sont stockées à une température comprise entre -25°C et -15°C.
 - Après l'étape [Regroupement des bibliothèques préenrichies, page 36](#), les bibliothèques regroupées sont stables pendant une durée maximale de 30 jours lorsqu'elles sont stockées à une température comprise entre -25°C et -15°C.
 - Après l'étape [Amplification de la bibliothèque enrichie, page 47](#), la plaque des bibliothèques amplifiées et enrichies peut rester sur le thermocycleur pendant une durée maximale de 24 heures. Sinon, la plaque peut être conservée à une température comprise entre 2°C et 8°C pendant une durée maximale de 48 heures.
 - Les bibliothèques enrichies purifiées finales sont stables pendant une durée maximale de 7 jours lorsqu'elles sont stockées à une température comprise entre -25°C et -15°C.
- Si l'emballage ou le contenu des composants de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sont endommagés ou altérés, communiquez avec le service à la clientèle d'Illumina .
- Le Stop Tagment Buffer 2 (ST2) peut former des cristaux ou des précipités visibles. En cas de présence de précipités, chauffez à 37°C pendant 10 minutes et agitez jusqu'à ce que les précipités soient dissous.
- L'Hybridation Oligos (HYB) et l'Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) doivent être préchauffés à la même température que la température de maintien d'hybridation spécifiée selon le type d'échantillon et le panel de sondes. Pour plus d'informations sur la manipulation du NHB2 et du EEW, reportez-vous à [Remarques procédurales, page 18](#).

- L'Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) et l'HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) peuvent former des cristaux et une trace de voile. Si vous observez des cristaux et une turbidité, agitez ou pipettez de haut en bas pour mélanger jusqu'à ce que la solution soit claire. Assurez-vous de préchauffer le NHB2 avant le pipetage.
- Lorsque vous manipulez les billes de nettoyage Cleanup Beads (CB), respectez les meilleures pratiques suivantes :
 - Ne congelez jamais les billes.
 - Immédiatement avant l'utilisation, agitez les billes jusqu'à obtenir une remise en suspension et une couleur d'apparence homogène.
- Lorsque vous manipulez l'Enrichment BLT Small (eBLTS), respectez les meilleures pratiques suivantes :
 - Conservez le tube d'eBLTS en position verticale de manière à ce que les billes soient toujours submergées dans le tampon.
 - Agitez vigoureusement l'eBLTS jusqu'à ce que les billes soient remises en suspension. La centrifugation avant le pipetage n'est pas recommandée pour éviter que les billes ne se déposent à nouveau.
 - Si des billes sont collées aux côtés ou à la partie supérieure d'une plaque à 96 puits, centrifugez à 280 × g pendant 3 secondes, puis utilisez une pipette pour les remettre en suspension.
- Lorsque vous manipulez les plaques d'adaptateurs d'index, respectez les meilleures pratiques suivantes :
 - N'ajoutez pas d'échantillons à la plaque d'adaptateur d'index.
 - Chaque puits de la plaque d'index est à usage unique.

Équipement et matériel nécessaires, non fournis

En plus de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, assurez-vous d'avoir à votre disposition l'équipement et le matériel requis avant de démarrer le protocole.

Équipement

Assurez-vous d'avoir à votre disposition l'équipement requis avant de démarrer le protocole.

Le protocole a été optimisé et validé avec les éléments dotés des spécifications techniques répertoriées. Une performance comparable n'est pas garantie lors de l'utilisation d'un équipement non conforme aux spécifications.

Certains éléments ne sont requis que pour des flux de travail spécifiques. Ces éléments sont indiqués dans des tableaux distincts.

- Thermocycleur avec les caractéristiques suivantes :
 - Couvercle chauffant
 - Plage de régulation de la température minimale de 10°C à 98°C
 - Exactitude de la température minimale de $\pm 0,25^\circ\text{C}$
 - Volume de réaction maximum de 100 μl

- Compatible avec les plaques PCR à 96 puits à embase pleine
- Incubateur de microéchantillons avec les caractéristiques suivantes :
 - Plage de température ambiante de +5,0°C à 99,0°C
 - Compatible avec les plaques MIDI à 96 puits
- Inserts d'incubateur de microéchantillons compatibles avec les plaques MIDI à 96 puits
- Agitateur de microplaques à grande vitesse avec plage de vitesses de mélange de 200 à 3 000 tr/min
- Support magnétique compatible avec les plaques PCR à 96 puits
- Support magnétique compatible avec les plaques MIDI à 96 puits
- Fluorimètre compatible avec votre méthode de quantification
- Analyseur de fragments d'ADN
- Pipettes de précision :
 - Pipettes multicanaux et à canal unique de 10 µl
 - Pipettes multicanaux et à canal unique de 20 µl
 - Pipettes multicanaux et à canal unique de 200 µl
 - Pipettes à canal unique de 1 000 µl
 - Les pipettes de précision assurent une distribution précise des réactifs et des échantillons. Des pipettes à canal unique ou multicanaux peuvent être utilisées si elles sont étalonnées régulièrement et sont précises à moins de 5 % du volume indiqué.
- Centrifugeuse pour microplaques
- Microcentrifugeuse
- Un des systèmes de séquençage d'Illumina suivants :
 - Instrument MiSeqDx, n° de référence DX-410-1001
 - Instrument NextSeq 550Dx, n° de référence 20005715
 - NovaSeq 6000Dx Instrument, n° de référence 20068232
- **[Facultatif]** Concentrateur à vide
- **[FFPE]** Système de détection PCR en temps réel

Matériel

Assurez-vous d'avoir à votre disposition le matériel requis avant de démarrer le protocole.

Certains éléments ne sont requis que pour des flux de travail spécifiques. Ces éléments sont indiqués dans des tableaux distincts.

Le protocole a été optimisé et validé avec les éléments répertoriés. Une performance comparable n'est pas garantie si vous utilisez un équipement différent.

- Pointes de pipette avec filtre
- Tubes coniques pour centrifugeuse, 15 ml ou 50 ml
- Tubes de microcentrifugeuse de 1,5 ml
- Réservoirs de réactifs multicanaux, jetables, sans RNase ni DNase
- Barrettes de 8 tubes sans RNase ni DNase et bouchons
- Pipettes sérologiques
- Plaque de stockage à 96 puits profonds en polypropylène, 0,8 ml (plaque MIDI)
- Plaques PCR à 96 puits à embase pleine et coque rigide
- [FFPE] Plaque qPCR compatible avec l'instrument qPCR
- Scellés adhésifs pour plaques à 96 puits avec les caractéristiques techniques suivantes :
 - Polyester pelable optiquement transparent
 - Convient aux plaques PCR à jupe
 - Adhésif fort résistant aux changements de températures multiples sur une fourchette de -40 à 110°C
 - Sans DNase/RNase
- Consommables en plastique compatibles avec la méthode de quantification choisie
- Trousse de quantification fluorométrique de l'ADN double brin compatible avec le système de quantification choisi :
 - Pour la quantification des bibliothèques amplifiées pré-enrichies, il est possible d'utiliser une trousse de quantification de grande portée.
 - Pour la quantification des bibliothèques enrichies, la portée de la trousse de quantification dépend du panel de sondes utilisé.
- Trousse d'analyse de fragments pour la qualification des bibliothèques avec le système de qualification choisi :
 - Pour la qualification des bibliothèques amplifiées pré-enrichies, il est possible d'utiliser une trousse de grande portée.
 - Pour la qualification des bibliothèques enrichies, la portée de la trousse de qualification dépend du panel de sondes utilisé.
- [Facultatif] Trousse pour l'extraction d'ADN à partir de cellules et de tissus humains. Vous pouvez utiliser n'importe quelle méthode d'extraction validée.

Prélèvement, transport et stockage des échantillons



ATTENTION

Manipulez tous les échantillons comme s'ils étaient des agents potentiellement infectieux.

- Ce test est compatible avec l'ADN génomique dérivé de cellules et de tissus humains.
- Pour l'ADNg purifié disponible sur le marché, assurez-vous que les échantillons ont été transportés correctement et stockés conformément aux instructions du fabricant. Suivez les meilleures pratiques pour le stockage et les cycles de congélation et de décongélation de l'ADNg.
- Pour l'apport de sang entier, respectez les exigences de prélèvement, transport et stockage du sang qui s'appliquent à la méthode d'extraction d'ADN choisie. Toute méthode d'extraction validée peut être utilisée. Le transport du sang total doit être conforme à tous les règlements nationaux, fédéraux, étatiques et locaux applicables au transport d'agents étiologiques.
- Pour l'extraction d'ADN de tissus FFPE, il est possible d'utiliser n'importe quelle méthode d'extraction validée. Suivez les instructions et les recommandations qui s'appliquent à la méthode d'extraction choisie pour déterminer les pratiques suivantes :
 - Méthode de fixation dans le formol et d'inclusion dans la paraffine pour les tissus, pour garantir la meilleure qualité possible de l'ADN extrait.
 - Stockage des échantillons FFPE.
 - Les exigences du matériel initial, comme le nombre et l'épaisseur des sections FFPE. La plupart des méthodes de purification recommandent d'utiliser des sections nouvellement coupées.

Avertissements et précautions

- Les réactifs de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx contiennent des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire, adapté à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour plus de renseignements relatifs à la protection de l'environnement, à la santé et à la sécurité, consultez la fiche signalétique (SDS) à l'adresse support.illumina.com/sds.html.
- Manipulez tous les échantillons de sang comme si vous les saviez infectés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH), du virus de l'hépatite B humain (VHB) ou d'autres pathogènes transmissibles par le sang (précautions universelles).

- Utilisez les précautions habituelles en laboratoire. Ne pipettez pas avec la bouche. Ne mangez pas, ne buvez pas et ne fumez pas dans les zones de travail indiquées. Portez des gants jetables et une blouse de laboratoire lors de la manipulation des échantillons et des réactifs de la trousse. Lavez-vous les mains soigneusement après avoir manipulé les échantillons et les réactifs de la trousse.
- Afin d'éviter toute dégradation des échantillons et des réactifs, veuillez faire en sorte que toutes les émanations d'hypochlorite sodique du nettoyage sont entièrement dissipées avant de lancer le protocole.
- La contamination des échantillons par d'autres produits PCR/amplicons peut causer des résultats erronés et non fiables. Pour éviter la contamination, utilisez les meilleures pratiques suivantes :
 - Suivez les pratiques de laboratoire appropriées et respectez une bonne hygiène dans le laboratoire.
 - Réalisez les étapes du flux de travail dans les zones de préamplification et de post-amplification indiquées.
 - Conservez les réactifs usagés avant de purifier les bibliothèques dans une zone de préamplification.
 - Séparez les réactifs de préamplification des réactifs de postamplification.
 - Veillez à ce que les zones de préamplification et de postamplification aient un équipement réservé, comme des pipettes, pointes de pipette, agitateur et centrifugeuse.
- Évitez la contamination croisée. Utilisez de nouvelles pointes de pipette entre les échantillons et entre les distributions de réactifs. L'utilisation de pointes avec filtre réduit le risque de rétention d'amplicons et de contamination croisée d'un échantillon à l'autre.
 - Lorsque vous ajoutez ou transférez des échantillons ou des mélanges maîtres de réactifs, changez les pointes entre chaque échantillon.
 - Lorsque vous ajoutez des adaptateurs d'index avec une pipette multicanal, changez les pointes entre chaque ligne ou chaque colonne. Si vous utilisez une pipette à canal unique, changez les pointes entre chaque échantillon.
 - Retirez les plaques d'adaptateur d'index inutilisées de la zone de travail.
- Respectez les meilleures pratiques suivantes lors des étapes du lavage à l'éthanol :
 - Préparez toujours une nouvelle solution d'éthanol à 80 %. L'éthanol peut absorber l'eau présente dans l'air, ce qui peut affecter les résultats.
 - Veillez à ce que tout l'éthanol soit retiré du bas des puits pendant les étapes de lavage. Des résidus d'éthanol peuvent affecter les résultats.
 - Respectez le temps de séchage indiqué pour les étapes du support magnétique pour assurer une évaporation totale. L'éthanol résiduel peut modifier la performance des réactions ultérieures.
- Préparez toujours les mélanges maîtres avant l'utilisation et ne conservez jamais les solutions de travail combinées.
- La performance de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit n'est pas garantie si les procédures indiquées dans la notice d'accompagnement ne sont pas suivies.
- N'utilisez pas les composants de la trousse au-delà de la date de péremption indiquée sur l'étiquette de la trousse.

- N'interchangez pas les composants venant de trousse Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit différentes. Les trousse sont identifiées sur l'étiquette de la trousse.

Remarques procédurales

Recommandations en matière d'entrée d'ADN

Le protocole de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit est compatible avec les entrées d'ADN génomique (ADNg) double brin de haute qualité allant de 50 à 1000 ng.

Assurez-vous que l'échantillon d'ADNg initial ne contient pas plus de 1 mM d'EDTA et qu'il ne présente pas de contaminants organiques tels que du phénol et de l'éthanol. Ces substances peuvent interférer avec la réaction de tagmentation et entraîner un échec du test.

Entrée d'ADNg \geq 50 ng

Pour les entrées d'ADNg allant de 50 à 1 000 ng, la quantification et la normalisation de l'échantillon d'ADNg initial ne sont pas nécessaires.

Entrée d'ADNg < 50 ng

Les entrées d'ADN de 10 à 50 ng peuvent être utilisées avec les ajustements suivants :

- Si vous utilisez une entrée d'ADNg allant de 10 à 49 ng, la quantification de l'échantillon d'ADNg initial est recommandée pour déterminer le nombre de cycles PCR requis après la tagmentation. Utilisez une méthode fluorescente pour quantifier l'entrée d'ADNg double brin. Évitez les méthodes servant à mesurer la concentration totale d'acide nucléique comme NanoDrop ou toute autre méthode d'absorbance d'UV.
- Ce protocole ne normalise pas le rendement final des bibliothèques pré-enrichies à des niveaux d'ADNg allant de 10–49 ng. Par conséquent, la quantification et la normalisation des bibliothèques avant et après l'enrichissement sont requises.
- L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit a été caractérisé et vérifié pour les entrées d'ADN allant de 50 à 1000 ng. Une performance équivalente du produit ne peut pas être garantie pour les entrées d'ADNg < 50 ng.

Recommandations concernant l'entrée de sang

L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit est compatible avec l'ADNg extrait de sang entier périphérique. Toute méthode d'extraction validée peut être utilisée. La quantification initiale de l'ADN d'entrée n'est pas requise lors de l'extraction d'ADNg du sang entier et l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit produit des rendements de bibliothèques pré-enrichies normalisées.

Les facteurs suivants peuvent avoir des effets négatifs sur la quantité d'ADN obtenue à partir d'échantillons de sang entier et, par conséquent, la normalisation des bibliothèques :

- Maturité des échantillons de sang
- Conditions de stockage
- Pathologies sous-jacentes affectant la numération leucocytaire

Recommandations concernant l'apport d'échantillons de tissu FFPE

Utilisez les critères de qualité de l'ADN FFPE suivants pour déterminer l'entrée appropriée pour une préparation réussie des bibliothèques :

- Pour les échantillons FFPE avec une valeur ΔCq de ≤ 5 , l'entrée d'ADN recommandée est de 50 à 1 000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx n'est pas recommandé pour les échantillons FFPE de mauvaise qualité avec $\Delta Cq > 5$. L'utilisation d'échantillons avec un $\Delta Cq > 5$ est possible, mais pourrait augmenter les chances d'échec de la préparation de la bibliothèque ou diminuer les performances du test.

Extraction d'échantillons FFPE

Utilisez une méthode d'isolation des acides nucléiques permettant de produire des résultats de récupération élevés, de minimiser la consommation d'échantillons et de préserver l'intégrité des échantillons. Vous pouvez utiliser n'importe quelle méthode validée pour l'extraction d'ADN à partir d'échantillons FFPE. Pour l'ADNg extrait de tissu FFPE, la quantification initiale de l'ADN d'entrée est requise et l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit ne produit pas de rendements de bibliothèques pré-enrichies normalisées.

Qualification de l'ADN extrait de tissu FFPE

L'ADNg extrait de tissu FFPE doit être qualifié avant utilisation. Pour une performance optimale, évaluez la qualité des échantillons d'ADN au moyen d'une méthode d'extraction validée pour la qualification de l'ADN extrait d'échantillons FFPE. Le kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit est compatible avec les échantillons d'ADN FFPE dont la valeur ΔCq est ≤ 5 . Le kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx n'est pas recommandé pour les échantillons FFPE de mauvaise qualité avec $\Delta Cq > 5$. L'utilisation d'échantillons avec $\Delta Cq > 5$ est possible, mais pourrait augmenter les risques d'échec de la préparation de la bibliothèque ou diminuer les performances du test.

[Facultatif] Échantillons de référence FFPE

Utilisez un matériel de référence caractérisé comme l'Horizon HD799 (ADN) servant de contrôle positif lors de l'exécution du protocole. Le matériel FFPE qualifié issu de xénogreffes de lignées cellulaires peut également être utilisé en tant qu'échantillon de référence. Utilisez une méthode fluorescente pour quantifier le matériel de référence avant utilisation.

REMARQUE L'analyse d'un échantillon de contrôle positif de référence ou d'un contrôle négatif consomme des réactifs et réduit le nombre total d'échantillons inconnus qui peuvent être traités.

Recommandations concernant l'apport d'échantillons

Les recommandations concernant l'apport d'échantillons pour Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sont résumées dans le tableau suivant.

Tableau 1 Recommandations concernant l'apport d'échantillons

Type d'apport d'échantillons	Quantité d'apport d'échantillons	Quantification de l'apport d'ADN requise	Qualité d'apport d'ADN requise	Rendement des librairies pré-enrichies normalisées
ADNg	10 à 49 ng	Oui	Ratio 260/280 de 1,8 à 2,0	Non
ADNg	50 à 1 000 ng	Non	Ratio 260/280 de 1,8 à 2,0	Oui
ADNg extrait du sang	50 à 1 000 ng	Non	Ratio 260/280 de 1,8 à 2,0	Oui
ADNg extrait de tissu FFPE	50 à 1 000 ng	Oui	Valeur ΔCq de ≤ 5	Non

Les cycles PCR recommandés pour le programme EBLTS PCR sont ajustés selon la qualité et la concentration de l'apport d'échantillons. Pour plus d'informations, reportez-vous à [Amplification de l'ADN tagmenté, page 31](#).

Conseils et techniques

Prévention de la contamination croisée

- Lorsque vous ajoutez ou transférez des échantillons, changez les pointes entre *chaque échantillon*.
- Lorsque vous ajoutez des adaptateurs d'index avec une pipette multicanal, changez les pointes entre *chaque ligne* ou *chaque colonne*. Si vous utilisez une pipette à canal unique, changez les pointes entre chaque échantillon.

Scellage de la plaque

- Scellez toujours la plaque à 96 puits en la recouvrant d'un nouvel opercule adhésif au moyen d'un rouleau en caoutchouc avant de suivre les étapes du protocole ci-dessous :
 - Étapes d'agitation
 - Étapes d'incubation. Un mauvais scellage de la plaque peut entraîner une évaporation potentielle durant l'incubation.

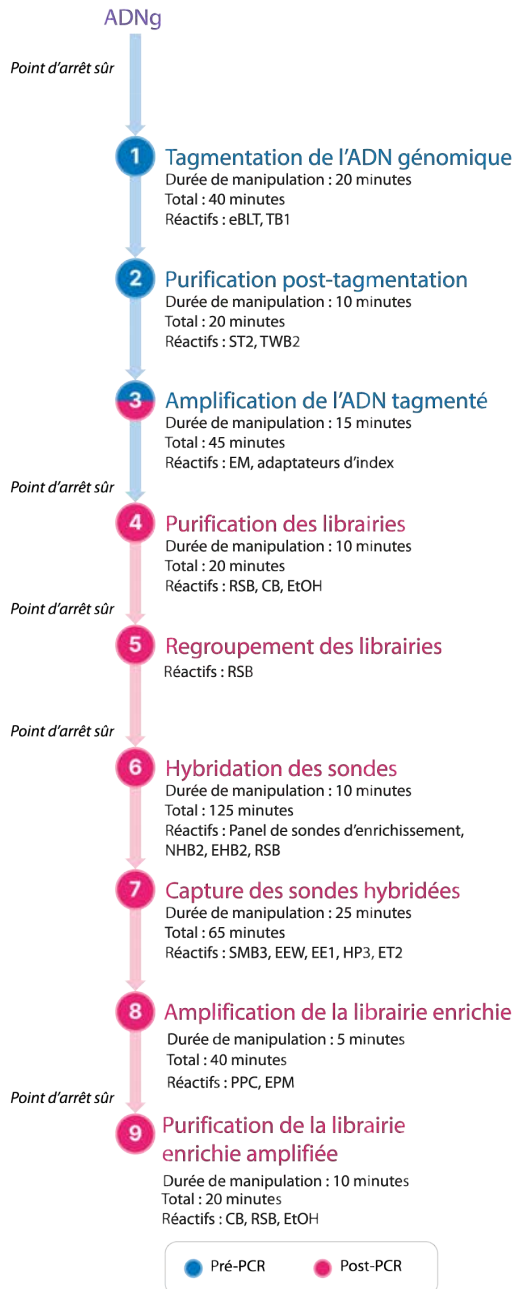
- Étapes de centrifugation
- Étapes d'hybridation
- Assurez-vous que les bords et les puits sont complètement scellés afin de réduire le risque de contamination croisée et d'évaporation.
 - Si les opercules ou les parois des puits de la plaque présentent du liquide ou de la condensation, centrifugez au besoin avant de desceller.
- Placez la plaque sur une surface plane avant de retirer lentement le sceau.

Manipulation de l'Enrichment BLT Small (EBLTS)

- Conservez le tube de stockage d'EBLTS en position verticale dans le réfrigérateur de manière à ce que les billes soient toujours submergées dans le tampon.
- Immédiatement avant l'utilisation, agitez vigoureusement le tube de stockage d'EBLTS jusqu'à ce que les billes soient remises en suspension. Pour éviter que les billes ne se déposent à nouveau, il n'est pas recommandé de réaliser la centrifugation avant le pipetage.
- Si des billes sont collées aux côtés ou à la partie supérieure d'une plaque à 96 puits, centrifugez à 280 × g pendant 3 secondes, puis utilisez une pipette pour les remettre en suspension.
- Lors du lavage de l'EBLTS :
 - Utilisez le support magnétique recommandé pour la plaque.
 - Conservez la plaque sur le support magnétique jusqu'à ce que la procédure indique de la retirer.
 - Si des billes sont aspirées par la pointe de la pipette, reversez le volume dans la plaque sur le support magnétique et attendez que le liquide redevienne clair (environ 2 minutes).

Flux de travail de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit

Le diagramme suivant illustre le flux de travail de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Les points d'arrêt de sécurité sont marqués entre les étapes. Les estimations de durée sont basées sur le traitement de 12 échantillons dans un enrichissement à 12 niveaux.



Mode d'emploi

Ce chapitre décrit le protocole du kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Vérifiez le flux de travail de séquençage complet que vous avez planifié, de l'échantillonnage à l'analyse, pour vous assurer de la compatibilité des produits et des paramètres de l'essai.
- Avant de poursuivre, vérifiez le contenu de la trousse et assurez-vous d'avoir à votre disposition les composants, l'équipement et le matériel requis.
 - Les sondes biotinylées de fournisseurs tiers doivent satisfaire à des exigences spécifiques. Reportez-vous à [Exigences relatives aux panels de sondes d'enrichissement, page 11](#) pour vous assurer que vos sondes tierces répondent aux exigences.
- Suivez le protocole dans l'ordre indiqué, en respectant les volumes et les paramètres d'incubation précisés.
- À moins qu'un point d'arrêt de sécurité ne soit stipulé dans le protocole, passez immédiatement à l'étape suivante.
- Des excédents sont inclus dans les volumes fournis lors de la création d'un mélange maître.
- Assurez-vous d'utiliser le support magnétique adapté à votre type de plaque.

Préparation du regroupement

Cette étape est requise pour garantir la réussite du séquençage des bibliothèques enrichies. Le regroupement des bibliothèques peut se produire avant l'enrichissement et avant le séquençage.

Avant l'enrichissement : les bibliothèques individuelles amplifiées et indexées sont regroupées pour l'enrichissement avec le panel de sondes sélectionné. Cela permet de créer un regroupement multiplexé de bibliothèques enrichies. Pour les entrées d'échantillons FFPE, le traitement a été testé et est exclusivement recommandé pour les réactions d'enrichissement simple. Pour l'ADNg de haute qualité, un enrichissement à 12 niveaux a été testé, mais les enrichissements de 2 à 11 niveaux sont possibles.

Avant le séquençage : les bibliothèques enrichies à 1 niveau et/ou les bibliothèques enrichies à plusieurs niveaux sont regroupées avant le séquençage. Le nombre de bibliothèques enrichies qui peut être séquençé dépend de la profondeur de lecture cible pour chaque échantillon sur votre système de séquençage.

Indexage double unique

L'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit utilise des index doubles uniques.

- Les bibliothèques à index double ajoutent les séquences d'index 1 (i7) et d'index 2 (i5) pour générer des bibliothèques uniquement étiquetées.
- Les index UD ont des séquences d'index non apparentées distinctes pour la lecture d'index i7 et i5. Les index ont une longueur de 10 bases.

La sélection d'adaptateurs d'index avec des séquences diverses pour les bibliothèques regroupées permet d'optimiser l'équilibre des couleurs pour une analyse des données et un séquençage réussi. Les regroupements de plexité ≥ 10 niveaux comportent une représentation inhérente équilibrée des couleurs. Par conséquent, vous pouvez utiliser n'importe quelle combinaison d'adaptateurs d'index. Durant l'analyse de séquençage, le module DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager propose des options pour les combinaisons d'index à équilibrage de couleurs et vous informe si la diversité n'est pas suffisante dans les combinaisons d'index sélectionnées.

Pour obtenir plus de renseignements sur les séquences d'adaptateurs d'index UD d'Illumina et la disposition des plaques, consultez la section [Annexe : Séquences d'adaptateurs d'index UD d'Illumina, page 64](#).

Plexités d'enrichissement prises en charge

Les réactifs de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sont configurés et testés à des plexités allant de l'enrichissement simple à l'enrichissement à 12 niveaux. Bien que d'autres plexités d'enrichissement soient possibles, certaines d'entre elles nécessitent des réactifs de panels de sondes d'enrichissement et de préparation de bibliothèques de pré-enrichissement supplémentaires.

Une optimisation supplémentaire peut être nécessaire pour obtenir un rendement d'enrichissement approprié pour une plexité d'enrichissement non standard. Des résultats optimaux ne sont pas garantis.

- **Plexité d'enrichissement** : le nombre de bibliothèques pré-enrichies (1–12) regroupées dans une réaction d'enrichissement pour l'hybridation avec les panels de sondes d'enrichissement. Par exemple, la combinaison de 12 bibliothèques pré-enrichies ensemble crée un regroupement d'enrichissement à 12 niveaux.
- **Réaction d'enrichissement** : le nombre de préparations de réactions d'enrichissement uniques, quel que soit le nombre de bibliothèques pré-enrichies regroupées par réaction. Par exemple, une seule réaction d'enrichissement peut préparer un regroupement d'enrichissement simple ou à 12 niveaux.

Pour calculer le nombre total de bibliothèques post-enrichies, multipliez la plexité d'enrichissement par réaction par le nombre de réactions d'enrichissement. Par exemple, une seule réaction d'enrichissement d'un regroupement d'enrichissement à 12 niveaux produit un regroupement de 12 bibliothèques post-enrichies.

Lors du regroupement des bibliothèques pré-enrichies, les réactifs de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit prennent en charge les plexités et les réactions d'enrichissement suivantes.

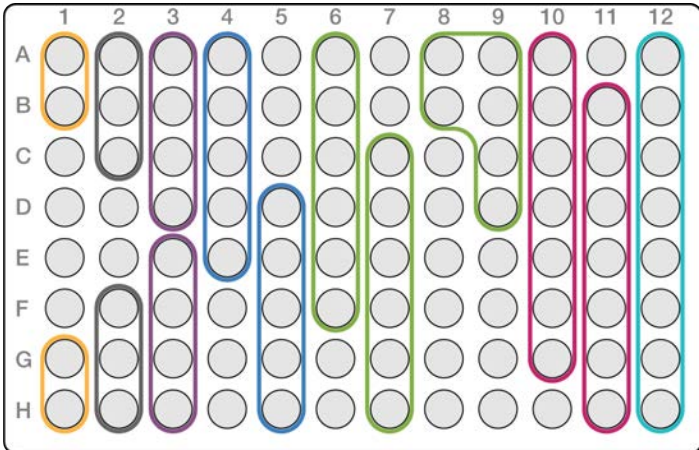
Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Reagents	Réactions d'enrichissement	Plexité d'enrichissement
Trousse de 16 échantillons	16 réactions	Simple
Trousse de 96 échantillons	8 réactions	12 niveaux

Stratégies de regroupement de 2 à 8 niveaux

Le tableau suivant montre les adaptateurs d'index (puits) qui peuvent être combinés dans un regroupement de 2 à 8 niveaux, tandis que la figure à code couleur illustre chaque combinaison.

Regroupement de toute plexité ≥ 2 à partir du haut ou du bas d'une colonne. N'effectuez pas de regroupement linéaire.

Plexité	Combinaisons	Couleur dans la figure
2	Les deux premiers ou les deux derniers puits dans une colonne : <ul style="list-style-type: none"> • A et B • G et H Les lignes C à F ne sont pas utilisées.	Orange
3	Les trois premiers ou les trois derniers puits dans une colonne : <ul style="list-style-type: none"> • A à C • F à H Les lignes D et E ne sont pas utilisées.	Gris
4	Les quatre premiers ou les quatre derniers puits dans une colonne : <ul style="list-style-type: none"> • A à D • E à H 	Mauve
5	Les cinq premiers ou les cinq derniers puits dans une colonne : <ul style="list-style-type: none"> • A à E • D à H 	Bleu
6	[Option 1] Les six premiers ou les six derniers puits dans une colonne : <ul style="list-style-type: none"> • A à F • C à H [Option 2] Les deux premiers puits (A et B) ou les deux derniers puits (G et H) dans une colonne et quatre puits dans une colonne adjacente.	Vert
7	Les sept premiers ou les sept derniers puits dans une colonne : <ul style="list-style-type: none"> • A à G • B à H 	Rose
8	Toute la colonne.	Bleu sarcelle

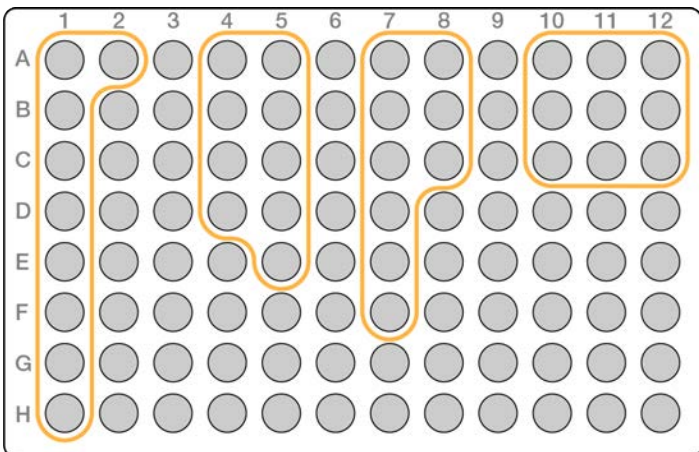


Stratégies de regroupement à neuf niveaux

Utilisez les adaptateurs d'index des puits qui optimisent l'équilibre des couleurs dans une analyse de séquençage, par exemple :

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

La figure suivante illustre les quatre exemples.



Tagmentation de l'ADN génomique

Cette étape utilise l'Enrichment BLT Small (EBLTS) pour la tagmentation de l'ADN. Ce processus fragmente et marque l'ADN avec des séquences d'adaptateurs.

Consommables

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (bouchon jaune)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Eau sans nucléase
- Plaque PCR à 96 puits
- Opercule adhésif
- Tubes de microcentrifugeuse de 1,7 ml
- Barrettes de 8 tubes
- Pointes de pipette
 - Pipettes multicanaux de 200 µl



ATTENTION

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire, adapté à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour plus de renseignements relatifs à la protection de l'environnement, à la santé et à la sécurité, consultez la fiche signalétique (SDS) à l'adresse support.illumina.com/sds.html.

À propos des réactifs

- Les eBLTS doivent être stockés à des températures comprises entre 2°C et 8°C. N'utilisez pas les eBLTS qui ont été stockés à une température inférieure à 2°C.
- Ne centrifugez pas l'EBLTS.

Préparation

1. Préparez les consommables suivants :

Élément	Stockage	Instructions
EBLTS (bouchon jaune)	2°C à 8°C	Amenez à température ambiante. Agitez immédiatement avant utilisation pour mélanger. Ne centrifugez pas avant le pipetage.
TB1	-25°C à -15°C	Amenez à température ambiante. Agitez pour mélanger.

2. Agitez l'ADN, puis centrifugez brièvement.

3. Enregistrez le programme TAG suivant sur le thermocycleur :
 - Choisissez l'option à couvercle préchauffé et réglez-la à 100°C
 - Réglez le volume de réaction à 50 µl
 - 55°C pendant 5 minutes
 - Maintenez à 10°C

Procédure

1. Ajoutez 2 à 30 µl d'ADN dans chaque puits d'une plaque PCR à 96 puits de sorte que le volume d'entrée total se situe dans la plage de 50 à 1 000 ng.
Si le volume d'ADN est inférieur à 30 µl, ajoutez de l'eau sans nucléase aux échantillons d'ADN pour porter le volume total à 30 µl.
2. Agitez vigoureusement l'EBLTS jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension.
3. Combinez les volumes suivants dans un tube pour préparer le mélange maître de tagmentation. Multipliez chaque volume par le nombre d'échantillons traités.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Un excédent de réactifs est inclus dans le volume.
4. Pipettez soigneusement le mélange maître de tagmentation pour mélanger.
5. Divisez à parts égales le volume du mélange maître de tagmentation dans une barrette de huit tubes.
6. À l'aide d'une pipette multicanal de 200 µl, transférez 20 µl de mélange maître de tagmentation à chaque puits de la plaque PCR contenant un échantillon. Utilisez des pointes neuves pour chaque ligne ou colonne d'échantillons.
7. Jetez la barrette de 8 tubes après avoir distribué le mélange maître de tagmentation.
8. À l'aide d'une pipette multicanal de 200 µl réglée sur 40 µl, pipettez chaque échantillon 10 fois pour mélanger. Utilisez des pointes neuves pour chaque colonne d'échantillons.
Vous pouvez aussi sceller la plaque PCR et utiliser un agitateur de plaques à 1600 tr/min pendant 1 minute.
9. Scellez la plaque, puis placez-la sur le thermocycleur préprogrammé et lancez le programme TAG.
10. Attendez que le programme TAG ait atteint la température de maintien de 10°C, puis retirez immédiatement la plaque.
11. Laissez la plaque PCR 96 puits reposer à température ambiante pendant 2 minutes, puis passez à l'étape suivante.

Purification post-tagmentation

Cette étape sert à purifier l'ADN marqué d'adaptateurs dans l'EBLTS avant l'amplification PCR.

Consommables

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- Support magnétique de plaque PCR à 96 puits
- Opercule adhésif
- Barrettes de 8 tubes
- Pointes de pipette
 - Pipettes multicanaux de 20 µl
 - Pipettes multicanaux de 200 µl
- Préparez pour la procédure ultérieure :
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Plaque d'adaptateur d'index

À propos des réactifs

- Assurez-vous d'utiliser le support magnétique adapté à votre plaque. L'utilisation d'un support magnétique de plaque MIDI sur une plaque PCR pourrait éviter que le TWB2 n'adhère aux billes.
- Pipettez lentement le TWB2 afin de réduire la création de mousse et éviter ainsi une mauvaise aspiration du volume et un mélange incomplet.

Préparation

1. Préparez les consommables suivants :

Élément	Stockage	Instructions
EPM	-25°C à -15°C	Décongelez sur de la glace pendant 1 heure. Retournez pour mélanger le contenu, puis centrifugez brièvement.
ST2	15°C à 30°C	En cas de présence de précipités, chauffez à 37°C pendant 10 minutes et agitez jusqu'à ce que les précipités soient dissous. Utilisez à température ambiante.
TWB2	15°C à 30°C	Utilisez à température ambiante.
Plaque d'adaptateur d'index	-25°C à -15°C	Décongelez à température ambiante pendant 30 minutes.

Procédure

1. Ajoutez 10 µl de ST2 à chaque réaction de tagmentation. Si vous utilisez une pipette multicanal, pipettez ST2 dans une barrette de 8 tubes, puis transférez les volumes appropriés vers la plaque PCR. Utilisez des pointes neuves pour chaque ligne ou colonne d'échantillons.
2. À l'aide d'une pipette de 200 µl réglée sur 50 µl, pipettez lentement chaque puits 10 fois pour remettre en suspension les billes.
Sinon, scellez la plaque et l'agitez à 1600 tr/min pendant 1 minute. Répétez autant de fois que nécessaire.
3. Scellez la plaque et centrifugez à 280 × g pendant 10 secondes.
4. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
5. Placez la plaque sur le support magnétique de plaque PCR et attendez que le liquide soit clair (3 minutes).
6. [≤ 48 échantillons] Lavez trois fois comme suit.
 - a. À l'aide d'une pipette multicanal de 200 µl réglée sur 60 µl, retirez et jetez le surnageant sans déranger le culot de billes.
 - b. Retirez du support magnétique.
 - c. Immédiatement après, ajoutez lentement 100 µl de TWB2 directement dans les billes.
 - d. Pipettez lentement jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension. Sinon, fermez la plaque et secouez-la à 1,600 rpm pendant 1 minute.
 - e. En cas d'éclaboussures, faites tourner à 280 × g pendant 10 secondes.
 - f. Placez la plaque sur le support magnétique de plaque PCR et attendez que le liquide soit clair (3 minutes).
Laissez la plaque sur le support magnétique et le tampon de lavage de tagmentation TWB2 dans les puits pour éviter une dessiccation excessive lors du troisième lavage. Retirez et jetez le surnageant après avoir préparé le mélange maître PCR.
 - g. À l'aide d'une pipette multicanal de 200 µl réglée sur 100 µl, retirez et jetez le surnageant.
 - h. Répétez les étapes c à f deux fois pour un total de trois lavages.
7. [> 48 échantillons] Lavez trois fois comme suit.
 - a. Effectuez les étapes b et c par incréments d'une à deux colonnes jusqu'à ce que toutes les colonnes aient été traitées pour éviter une dessiccation excessive.
 - b. À l'aide d'une pipette multicanal de 200 µl réglée sur 60 µl, retirez et jetez le surnageant.
 - c. Retirez du support magnétique.
 - d. Immédiatement après, distribuez lentement 100 µl de TWB2 directement dans les billes.
 - e. Pipettez lentement jusqu'à ce que les billes soient complètement remises en suspension. Sinon, fermez la plaque et secouez-la à 1,600 rpm pendant 1 minute.
 - f. En cas d'éclaboussures, faites tourner à 280 × g pendant 10 secondes.
 - g. Placez la plaque sur le support magnétique de plaque PCR et attendez que le liquide soit clair (3 minutes).

Laissez la plaque sur le support magnétique et le tampon de lavage de tagmentation TWB2 dans les puits pour éviter une dessiccation excessive lors du troisième lavage. Retirez et jetez le surnageant après avoir préparé le mélange maître PCR.

- h. À l'aide d'une pipette multicanal de 200 µl réglée sur 100 µl, retirez et jetez le surnageant.
 - i. Retirez la plaque du support magnétique et ajoutez lentement 100 µl de TWB2 directement dans les billes.
 - j. Répétez les étapes h et i par incréments d'une ou de deux colonnes jusqu'à ce que toutes les colonnes aient été traitées.
 - k. Répétez les étapes e à h deux fois pour un total de trois lavages.
8. Maintenez la plaque sur le support magnétique jusqu'à l'étape 4 de la section *Procédure de l'amplification de l'ADN tagmenté*.
Le TWB2 reste dans le puits pour empêcher que les billes ne soient trop sèches.

Amplification de l'ADN tagmenté

Au cours de cette étape, l'ADN tagmenté est amplifié au moyen d'un programme de PCR à cycle limité. L'étape de PCR ajoute les adaptateurs d'index 1 (i7), les adaptateurs d'index 2 (i5) et les séquences requises pour le séquençage d'une génération de grappes.

Consommables

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Plaque d'adaptateur d'index
- Plaque PCR à 96 puits
- Eau sans nucléase
- Opercule adhésif
- Tubes de microcentrifugeuse de 1,5 ml
- Pointes de pipette
 - Pipettes multicanaux de 20 µl
 - Pipettes multicanaux de 200 µl

À propos des réactifs

- Plaques d'adaptateurs d'index
 - Un puits peut contenir > 10 µl d'adaptateurs d'index.
 - N'ajoutez pas d'échantillons à la plaque d'adaptateur d'index.
 - Chaque puits de la plaque d'index est à usage unique.

Préparation

1. Préparez les consommables suivants :

Élément	Stockage	Instructions
EPM	-25°C à -15°C	Décongelez à une température de 4°C ou sur de la glace pendant une heure. Retournez pour mélanger le contenu, puis centrifugez brièvement.
Plaque d'adaptateur d'index	-25°C à -15°C	Décongelez à température ambiante pendant 30 minutes.

2. Enregistrez le programme eBLTS PCR suivant portant sur le thermocycleur en utilisant le nombre approprié de cycles PCR tel que spécifié dans le tableau ci-dessous.

- Choisissez l'option à couvercle préchauffé et réglez-la à 100°C.
- Réglez le volume de réaction à 50 µl.
- 72°C pendant 3 minutes
- 98°C pendant 3 minutes
- X cycles de :
 - 98°C pendant 20 secondes
 - 60°C pendant 30 secondes
 - 72°C pendant 1 minute
- 72°C pendant 3 minutes
- Maintenez à 10°C

La durée totale de l'analyse est de 38 minutes environ pour 9 cycles et de 46 minutes environ pour 12 cycles.

Type d'apport d'échantillons	Nombres de Cycles PCR (X)
10 à 49 ng d'ADNg	12
50 à 1 000 ng d'ADNg	9
50 à 1 000 ng d'ADNg extrait de tissu FFPE	12
ADNg extrait du sang	9

Procédure

1. Combinez les éléments suivants pour préparer le mélange réactionnel de la PCR. Multipliez chaque volume par le nombre d'échantillons traités.
 - EPM (23 µl)
 - Eau sans nucléase (23 µl)Un excédent de réactifs est inclus dans le volume.
2. Pipettez 10 fois le mélange maître PCR pour mélanger, puis centrifugez brièvement.
3. Avec la plaque sur le support magnétique, utilisez une pipette multicanal de 200 µl pour retirer et jeter le TWB2.
La présence de mousse sur les parois du puits n'a pas d'effets négatifs sur la librairie.
4. Retirez du support magnétique.
5. Ajoutez immédiatement 40 µl de mélange maître PCR directement dans les billes de chaque puits.
6. Pipettez immédiatement pour mélanger les billes jusqu'à ce qu'elles soient complètement remises en suspension. Sinon, fermez la plaque et secouez-la à 1 600 tr/m pendant 1 minute.
7. Scellez la plaque d'échantillon et centrifugez à 280 × g pendant 10 secondes.
8. Centrifugez la plaque d'adaptateur d'index à 1 000 × g pendant 1 minute.
9. Préparez la plaque d'adaptateur d'index.
 - [< 96 échantillons] Percez l'opercule en aluminium de la plaque d'adaptateur d'index avec une pointe de pipette neuve pour chaque puits, uniquement pour le nombre d'échantillons traités.
 - [96 échantillons] Alignez une nouvelle plaque PCR à demi-jupe au-dessus de la plaque d'adaptateur d'index et appuyez pour perforer l'opercule en aluminium. Jetez la plaque PCR utilisée pour perforer l'opercule en aluminium.
10. Avec une pointe de pipette neuve, ajoutez 10 µl d'adaptateurs d'index pré-appariés à chaque puits.
11. À l'aide d'une pipette réglée à 40 µl, pipettez 10 fois pour mélanger. Vous pouvez aussi sceller la plaque et agitez à 1 600 tr/min pendant 1 minute.
12. Scellez la plaque et centrifugez à 280 × g pendant 10 secondes.
13. Placez sur un thermocycleur et exécutez le programme EBLTS PCR.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, stockez les échantillons à une température se situant entre -25°C et -15°C pendant un maximum de 30 jours.

Purification des librairies

Cette étape utilise une procédure de purification des billes à double face pour purifier les librairies amplifiées.

Consommables

- CB (Billes de nettoyage)
- RSB (Tampon de Resuspension)
- Nouvelle préparation d'éthanol à 80 % (EtOH)
- Plaque de stockage à 96 puits profonds en polypropylène, 0,8 ml (plaque MIDI)
- Plaque PCR à 96 puits
- Support magnétique de plaque MIDI
- Support magnétique de plaque PCR
- Tubes de microcentrifugeuse de 1,5 ml
- Eau sans nucléase

À propos des réactifs

- Billes de nettoyage
 - Agitez avant chaque utilisation.
 - Agitez fréquemment pour vous assurer que les billes sont réparties uniformément.
 - Aspirez et distribuez lentement, car la solution est visqueuse.

Préparation

1. Préparez les consommables suivants :

Élément	Stockage	Instructions
CB	Température ambiante	Agitez et retournez pour mélanger jusqu'à obtenir une couleur de liquide homogène.
RSB	2°C à 8°C	Décongelez pendant 30 minutes à température ambiante. Agitez pour mélanger.

Procédure

1. Agitez la plaque PCR à 96 puits à 1 800 tr/min pendant 1 minute, puis centrifugez brièvement.
2. Placez la plaque sur le support magnétique de la plaque PCR et attendez que le liquide soit clair (1 minute).
3. Agitez le CB 3 fois pendant 10 secondes, puis inversez plusieurs fois pour remettre en suspension.
4. Pour l'ADNg de haute qualité, faites ce qui suit.
 - a. Ajoutez 77 µl d'eau sans nucléase à chaque puits d'une nouvelle plaque MIDI.
 - b. Ajoutez 88 µl de CB à chaque puits de la plaque MIDI.
 - c. Transférez 45 µl de surnageant de chaque puits de la plaque PCR au puits correspondant de la plaque MIDI.

- d. Jetez la plaque PCR.
 - e. Pipettez chaque puits 10 fois pour mélanger. Sinon, scellez la plaque et l'agitez à 1,800 rpm pendant 1 minute.
 - f. Scellez la plaque et incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
 - g. Vérifiez l'absence de bulles d'air. S'il y en a, faites tourner.
 - h. Placez la plaque sur le support magnétique de la plaque MIDI et attendez que le liquide soit clair (5 minutes).
 - i. Pendant l'incubation, agitez fermement les CB, puis ajoutez 20 µl à chaque puits d'une nouvelle plaque MIDI.
 - j. Transférez 200 µl de surnageant de chaque puits de la première plaque MIDI dans le puits correspondant de la nouvelle plaque MIDI (contenant 20 µl de CB).
 - k. Jetez la première plaque MIDI.
 - l. Pipettez chaque puits de la nouvelle plaque MIDI 10 fois pour mélanger. Sinon, scellez la plaque et l'agitez à 1 800 rpm pendant 1 minute.
5. Pour le tissu FFPE extrait, faites ce qui suit.
- a. Ajoutez 81 µl de CB dans chaque puits d'une nouvelle plaque MIDI.
 - b. Transférez 45 µl de surnageant de chaque puits de la plaque PCR au puits correspondant de la plaque MIDI.
 - c. Jetez la plaque PCR.
 - d. Pipettez chaque puits 10 fois pour mélanger. Sinon, scellez la plaque et l'agitez à 1 800 rpm pendant 1 minute.
6. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
7. Vérifiez l'absence de bulles d'air. S'il y en a, faites tourner.
8. Placez la plaque sur le support magnétique de la plaque MIDI et attendez que le liquide soit clair (5 minutes).
9. Retirez et jetez le surnageant sans déranger les billes.
10. Lavez les billes comme suit.
- a. Lorsque la plaque est sur le support magnétique, ajoutez 200 µl de nouvelle solution à l'éthanol à 80 % sans mélanger.
 - b. Incubez pendant 30 secondes.
 - c. Retirez et jetez le surnageant sans déranger les billes.
11. Lavez les billes une **deuxième** fois.
12. Séchez à l'air libre sur le support magnétique pendant 5 minutes.
13. Pendant le séchage à l'air, utilisez une pipette de 20 µl pour enlever et jeter l'EtOH résiduel.
14. Retirez du support magnétique.
15. Ajoutez 17 µl RSB aux billes.
16. Sceller la plaque et secouer à 1800 rpm pendant 2 minutes.
17. Incubez à température ambiante pendant 2 minutes.

18. Vérifiez l'absence de bulles d'air. S'il y en a, faites tourner.
19. Placez la plaque sur le support magnétique de la plaque MIDI et attendez que le liquide soit clair (2 minutes).
20. Transférez 15 µl de surnageant vers une nouvelle plaque PCR à 96 puits.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, scellez la plaque et stockez-la à une température se situant entre -25°C et -15°C pendant un maximum de 30 jours.

Regroupement des librairies préenrichies

Cette étape consiste à combiner des librairies d'ADN avec des index uniques dans un seul groupe contenant jusqu'à 12 librairies.

Méthodes de regroupement

Vous pouvez faire le regroupement par volume ou par masse. Utilisez le tableau suivant pour déterminer la méthode appropriée pour votre entrée.

Tableau 2 Méthodes de regroupement recommandées

Apport d'échantillon	Méthode de regroupement
10 à 49 ng d'ADNg	Masse
50 à 1 000 ng d'ADNg	Volume
ADNg extrait de tissu FFPE	Masse
ADNg extrait du sang	Volume

- L'enrichissement simple ne requiert pas le regroupement des librairies pré-enrichies. Cependant, l'ajout de RSB peut être nécessaire.
- Après la quantification des librairies pré-enrichies, tous les types d'entrée d'échantillons peuvent être regroupés par masse pour obtenir un équilibre d'index optimal.
- Le rendement final des librairies pré-enrichies dans des préparations expérimentales distinctes peut varier. Par conséquent, le regroupement par masse est recommandé pour obtenir un équilibre d'index optimal.
- Utilisez l'enrichissement simple dans les situations suivantes :
 - 10 à 49 ng d'ADNg
 - 50 à 1000 ng d'ADNg extrait de tissu FFPE
 - Détection de faible fréquence d'allèle mineur pour l'appel de variants somatiques.

Regroupement par masse

Dans les situations suivantes, quantifiez vos librairies pour utiliser une masse d'ADN par librairie pour l'enrichissement spécifié à la section [Regroupement des librairies pré-enrichies à concentration égale](#), page 37.

- Entrée d'échantillon d'ADNg allant de 10 à 49 ng
- Entrée d'échantillon d'ADNg extrait de FFPE allant de 50 à 1 000 ng
- Détection de faible fréquence d'allèle mineur pour l'appel de variants somatiques
- ADNg extrait du sang pour un équilibre d'index optimal

Quantification des bibliothèques pré-enrichies

1. Analysez 1 µl de bibliothèques pré-enrichies au moyen de la méthode de quantification fluorescente de votre choix utilisant un marqueur intercalaire d'ADN double brin.
 - Pour l'ADNg de haute qualité allant de 50 à 1 000 ng, le rendement prévu des bibliothèques pré-enrichies sera \geq 500 ng.
 - Pour l'ADNg extrait de tissu FFPE allant de 50 à 1 000 ng, le rendement prévu des bibliothèques pré-enrichies sera compris entre 500 et 6 000 ng selon la qualité de l'échantillon initial.

REMARQUE Pour les méthodes de quantification avec différents biais, qualifiez la méthode de quantification pour ce flux de travail. Les résultats de la concentration peuvent varier selon la méthode utilisée.

Regroupement des bibliothèques pré-enrichies à concentration égale

Utilisez le tableau suivant pour déterminer la masse d'ADN requise par bibliothèque pour l'enrichissement, en conformité avec le type d'échantillon et la plexité d'enrichissement. Des rendements d'enrichissement optimaux et la performance du test ne sont pas garantis lorsque vous utilisez des rendements de bibliothèques pré-enrichies inférieurs à ceux qui sont recommandés.

La masse d'ADN totale dans la réaction d'enrichissement ne doit pas dépasser 6 000 ng.

Apport d'échantillon	Plexité d'enrichissement	Masse d'ADN par bibliothèque (ng)	Masse totale de bibliothèque d'ADN (ng)
ADNg de haute qualité	12	250 à 500	3 000 à 6 000
ADNg extrait de tissu FFPE	1	200	200

1. Enregistrez les index des bibliothèques que vous envisagez de regrouper à cette étape.
2. Selon la concentration de chaque bibliothèque, calculez le volume qui doit être ajouté à la réaction d'enrichissement pour atteindre la masse d'ADN requise.
 - ADNg de haute qualité : calculez le volume de bibliothèque requis pour l'entrée 250 à 500 ng.
 - ADNg extrait de tissu FFPE : calculez le volume de bibliothèque requis pour l'entrée 200 ng.
3. Ajoutez le volume calculé pour chaque bibliothèque dans le même puits de la plaque PCR.

4. Si vous utilisez de l'ADNg de haute qualité, effectuez l'une des opérations suivantes selon le volume total des librairies pré-enrichies regroupées :
 - Si le volume des librairies pré-enrichies est égal à 30 µl, passez à l'étape [Hybridation des sondes](#), page 39.
 - Si le volume des librairies pré-enrichies est inférieur à 30 µl, ajoutez le RSB de manière à atteindre un volume total de 30 µl.
 - Si le volume des librairies pré-enrichies est supérieur à 30 µl, utilisez une méthode basée sur des billes ou un concentrateur à vide pour concentrer l'échantillon regroupé. Ajoutez le RSB à l'échantillon regroupé concentré de manière à atteindre un volume total de 30 µl.
5. Si vous utilisez de l'ADNg extrait de tissu FFPE, effectuez l'une des opérations suivantes selon le volume total des librairies pré-enrichies regroupées :
 - Si le volume des librairies pré-enrichies est égal à 7,5 µl, passez à l'étape [Hybridation des sondes](#), page 39.
 - Si le volume des librairies pré-enrichies est inférieur à 7,5 µl, ajoutez le RSB de manière à atteindre un volume total de 7,5 µl.

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque et stockez-la à une température se situant entre -25°C et -15°C pendant un maximum de 30 jours.

Regroupement par volume

Pour l'entrée d'ADNg allant de 50 à 1 000 ng, la quantification et la normalisation des librairies individuelles générées lors du même essai ne sont pas requises.

Pour une performance optimale, regroupez uniquement les échantillons de librairies pré-enrichies préparés par le même utilisateur, le même lot de réactifs et la même plaque d'adaptateur d'index.

1. Enregistrez les index des librairies que vous envisagez de regrouper à cette étape.
2. Combinez les volumes de RSB et de librairies pré-enrichies suivants pour votre plexité d'enrichissement dans le même puits d'une nouvelle plaque PCR.

Il en résulte un volume de 30 µl.

Plexité d'enrichissement *	Volume de librairie pré-enrichie unitaire (µl)	Volume de la solution RSB (µl)
Simple	14	16
2 niveaux	14	2
3 niveaux	10	0
4 niveaux	7,5	0
5 niveaux	6	0

Plexité d'enrichissement *	Volume de librairie pré-enrichie unitaire (µl)	Volume de la solution RSB (µl)
6 niveaux	5	0
7 niveaux	4,2	0,6
8 niveaux	3,7	0,4
9 niveaux	3,3	0,3
10 niveaux	3	0
11 niveaux	2,7	0,3
12 niveaux	2,5	0

*Pour plus d'informations sur les plexités non standard (de 2-plex à 11-plex), voir [Limites de la procédure, page 2](#).

POINT D'ARRÊT DE SÉCURITÉ

Si vous arrêtez, scellez la plaque et stockez-la à une température se situant entre -25°C et -15°C pendant un maximum de 30 jours.

[Facultatif] Qualification des librairies pré-enrichies

Si le regroupement se fait par volume, employez une méthode fluorescente utilisant un marqueur intercalaire d'ADN double brin pour quantifier les librairies pré-enrichies. Pour la qualification des librairies pré-enrichies, utilisez un analyseur de fragments d'ADN avec la trousse d'analyse de fragments appropriée.

Utilisez un volume total $\leq 1 \mu\text{l}$ pour la qualification des librairies. Les librairies pré-enrichies sont suffisamment concentrées pour avoir de petites dilutions pour la quantification ou l'analyse des fragments.

Hybridation des sondes

Cette étape permet de fixer les régions ciblées de l'ADN. avec des sondes de capture.

Les réactifs de l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit sont compatibles aussi bien avec les panels d'oligonucléotides d'ADN d'enrichissement de fournisseurs tiers qu'avec ceux d'Illumina. Pour plus d'informations sur les spécifications requises pour les panneaux tiers, reportez-vous [Exigences relatives aux panels de sondes d'enrichissement, page 11](#).

Consommables

- EHB2 (tampon d'enrichissement 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (capuchon bleu)
- Panel de sondes d'enrichissement
- Plaque PCR à 96 puits
- Opercule adhésif

- Préparez pour la procédure ultérieure :
 - SMB3 (Billes magnétiques à la streptavidine)
 - EEW (Tampon de lavage d'enrichissement amélioré) (bouchon d'ambre)

À propos des réactifs

- Le NHB2 se précipite et se sépare durant le stockage.
- Le panel de sondes d'enrichissement fait référence au panel d'oligonucléotides d'enrichissement choisi auprès du vendeur Illumina.

Préparation

1. Préparez les consommables suivants :

Élément	Stockage	Instructions
EHB2	De 2 à 8°C	Amenez à température ambiante. Agitez pour mélanger. Si vous observez des cristaux et une turbidité, agitez de nouveau ou pipettez de haut en bas pour mélanger jusqu'à ce que la solution soit claire.
Panel de sondes d'enrichissement	De -25°C à -15°C (Illumina)	Pour les panels de fournisseurs tiers et d'Illumina, amenez à température ambiante. Agitez pour mélanger.
NHB2 (capuchon bleu)	De -25°C à -15°C	Décongelez à température ambiante. Lorsqu'il est à température ambiante, préchauffez-le sur un incubateur de micro-échantillons à la même température que la sonde que vous utilisez pendant 5 minutes. Agitez 3 fois à vitesse maximale pendant 10 secondes chacun pour remettre en suspension. Centrifugez brièvement. Pipettez de haut en bas depuis le fond du tube. Si vous observez des cristaux et une turbidité, agitez de nouveau ou pipettez de haut en bas pour mélanger jusqu'à ce que la solution soit claire. Utilisez pendant qu'il est chaud pour éviter une nouvelle formation de précipités.
SMB3*	De 2 à 8°C	Si vous passez à la procédure suivante juste après le maintien de 90 minutes sur le programme HYB, amenez à température ambiante pendant au moins deux heures avant de lancer le programme HYB.

Élément	Stockage	Instructions
EEW* (tube ambré)	De -25°C à -15°C	Si vous passez à la procédure suivante juste après le maintien de 90 minutes sur le programme HYB, amenez à température ambiante pendant au moins deux heures avant de lancer le programme HYB. Une fois à température ambiante, préchauffez sur un incubateur de microéchantillons à la température de capture et d'hybridation applicable pendant 30 minutes avant que le programme HYB prenne fin.

* Si vous arrêtez avant la procédure suivante, retardez la préparation de ce réactif et faites-le que lorsque vous serez prêt à réaliser cette procédure.

2. Enregistrez le programme HYB suivant sur le thermocycleur en utilisant le nombre approprié de cycles, lesquels sont spécifiés dans le [Tableau 3](#).
 - Choisissez l'option à couvercle préchauffé et réglez-la à 100°C.
 - Définissez le volume de réaction.
 - [ADNg de haute qualité] 100 µl
 - [ADNg extrait de tissu FFPE] 25 µl
 - 98°C pendant 5 minutes
 - X cycles d'une minute chacun, en commençant à 98°C pour le premier cycle, puis en diminuant de 2°C par cycle
 - Maintenez pendant 90 minutes à la température spécifiée :
 - [ADNg extrait de tissu FFPE] 58°C
 - [Panels de sondes 80 mer] 58°C
 - [Appel des variants somatiques] 58°C
 - [Tous les autres] 62°C

La durée totale de l'analyse est d'environ 115 minutes.

Tableau 3 Nombre de cycle par échantillon ou panel

Type de panel et d'échantillon	Nombre de cycles (X)
ADNg extrait de tissu FFPE (quel que soit le type de panel)	20
Panels de sondes 80 mer (quel que soit le type d'échantillon)	20
Appel des variants somatiques	20
Tous les autres échantillons et panels	18

Procédure

1. **[ADNg de haute qualité]** Ajouter les réactifs suivants *dans l'ordre indiqué* à chaque bibliothèque groupée dans la plaque PCR.
Ne créez pas de mélange maître. La création d'un mélange maître de NHB2 et EHB2 influe négativement sur la performance d'enrichissement.
 - NHB2 (bouchon bleu) (50 µl)
 - Panel de sondes d'enrichissement (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. **[ADNg de haute qualité]** À l'aide d'une pipette réglée à 90 µl, pipetez chaque puits 10 fois pour le mélanger.
3. **[ADNg extrait de tissu FFPE]** Ajoutez les réactifs suivants *dans l'ordre indiqué* pour chaque librairie regroupée dans la plaque PCR.
Ne créez pas de mélange maître. La création d'un mélange maître de NHB2 et EHB2 influe négativement sur la performance d'enrichissement.
 - NHB2 (bouchon bleu) (12,5 µl)
 - Panel de sondes d'enrichissement (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[ADNg extrait de tissu FFPE]** À l'aide d'une pipette réglée sur 20 µl, pipetez chaque puits 10 fois pour mélanger.
5. Scellez la plaque et centrifugez à 280 × g pendant 10 secondes.
6. Placez la plaque d'échantillons sur le thermocycleur préprogrammé et lancez le programme HYB.
7. Effectuez immédiatement la procédure suivante lorsque le délai de température de maintien du programme HYB a expiré.



ATTENTION

La chute de la température de la réaction d'hybridation en dessous de la température ambiante entraîne la précipitation.

Capture des sondes hybridées

Cette étape utilise les Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) pour capturer les sondes hybridées aux régions d'intérêt ciblées.

Consommables

- EEW (Tampon de lavage d'enrichissement amélioré) (bouchon d'ambre)
- EE1 (Tampon d'élution d'enrichissement 1)
- ET2 (Tampon Cible d'Élution 2)
- HP3 (2N NaOH)

- SMB3 (Billes magnétiques à la streptavidine)
- Tube de microcentrifugation de 1,5 ml
- Plaques MIDI à 96 puits
- Plaque PCR à 96 puits
- Opercule adhésif
- Support magnétique de plaque MIDI
- Préparez pour la procédure ultérieure :
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

À propos des réactifs

- EEW
 - Assurez-vous que l'EEW a été décongelé à température ambiante pendant au moins deux heures avant de le préchauffer sur un incubateur de microéchantillons.
 - Assurez-vous que l'EEW a été chauffé dans un incubateur de microéchantillons pendant 30 minutes avant la fin du programme HYB.
 - Laissez l'EEW dans l'incubateur de microéchantillons lorsque vous ne l'utilisez pas. L'EEW doit rester chaud tout au long du protocole.
 - Il peut être trouble après avoir atteint la température ambiante.
 - Il peut être d'apparence jaune.
- SMB3
 - Les SMB3 doivent être à température ambiante avant utilisation.

Préparation

1. Préparez les consommables suivants :

Élément	Stockage	Instructions
SMB3	De 2 à 8°C	Laissez reposer pendant 2 heures pour amener à la température ambiante. Retournez puis agitez jusqu'à la remise en suspension complète.
EEW (tube ambre)	De -25°C à -15°C	Au bout de 2 heures d'incubation à température ambiante, préchauffez sur un incubateur de microéchantillons à la température de capture et d'hybridation applicable pendant 30 minutes avant que le programme HYB prenne fin.
EE1	De -25°C à -15°C	Décongelez à température ambiante, puis agitez.
HP3	De -25°C à -15°C	Décongelez à température ambiante, puis agitez.

Élément	Stockage	Instructions
ET2	De 2 à 8°C	Amenez à température ambiante. Agitez pour mélanger.
EPM	De -25°C à -15°C	Décongelez sur de la glace pendant une heure. Retournez pour mélanger le contenu, puis centrifugez brièvement. Réservez sur de la glace.
PPC	De -25°C à -15°C	Décongelez sur de la glace pendant une heure. Procédez par un tourbillon de mélange du contenu, puis centrifugez brièvement. Réservez sur de la glace.

- Préchauffer un incubateur de microéchantillons avec un insert de bloc thermique MIDI pour incuber la plaque d'échantillons à l'une des températures suivantes. Il est possible d'utiliser un deuxième incubateur de microéchantillons pour préchauffer l'EEW. Laissez reposer l'EEW sur le haut de l'insert de bloc chauffant MIDI.
 - [FFPE] 58°C
 - [Panels de sondes 80 mer] 58°C
 - [Appel des variants somatiques] 58°C
 - [Tous les autres] 62°C

Procédure

Capture

- Ajoutez le SMB3 dans le puits correspondant d'une nouvelle plaque MIDI comme suit.
 - [ADNg de haute qualité] Ajoutez 250 µl de SMB3.
 - [ADNg extrait de FFPE] Ajouter 62,5 µl de SMB3.
- À l'aide d'une pipette réglée sur 100 µl pour l'ADNg de haute qualité ou 25 µl pour le FFPE, transférez chaque bibliothèque groupée de la plaque PCR de 96 puits dans le puits correspondant de la nouvelle plaque MIDI.
- Sceller la plaque et secouer à 1200 tr/m pendant 4 minutes.
- En cas d'éclaboussures, centrifuger brièvement la plaque.
- Placez la plaque des bibliothèques regroupées sur le bloc thermique MIDI de l'incubateur de microéchantillons, sous le tube EEW, fermez le couvercle, puis incubez pendant 15 minutes à la température applicable :
 - [FFPE] 58°C
 - [Panel de sondes 80 mer] 58°C
 - [Appel des variants somatiques] 58°C
 - [Tous les autres] 62°C
- Retirer la plaque de bibliothèques regroupées et centrifuger à 280 × g pendant 30 secondes.

- Placez immédiatement sur le support magnétique de plaque MIDI et attendez que le liquide soit clair (2 minutes).
- [ADNg de haute qualité]** À l'aide d'une pipette réglée sur 200 µl, retirez et jetez le surnageant de chaque puits sans déranger le culot de billes.
- [ADNg extrait d'un FFPE]** À l'aide d'une pipette réglée à 90 µl, retirez et jetez tout le surnageant de chaque puits sans déranger le culot de billes.
- Retirez le surnageant résiduel et jetez-le.

Lavage

- Retirez du support magnétique.
- [ADNg de haute qualité]** Retirez rapidement l'EEW de l'incubateur de microéchantillons et ajoutez 200 µl à chaque puits.
- [ADNg extrait de tissu FFPE]** Retirez rapidement l'EEW de l'incubateur de microéchantillons et ajoutez 50 µl à chaque puits.
- Remplacez l'EEW inutilisé dans l'incubateur de microéchantillons et maintenez-le au chaud.
- Scellez et agitez à 1800 rpm pendant 4 minutes.
- Placez la plaque d'échantillons sur l'insert de bloc chauffant MIDI dans l'incubateur de microéchantillons, sous le tube d'EEW, fermez le couvercle, puis incubez pendant 5 minutes à la température spécifiée :
 - [FFPE] 58°C
 - [Panels de sondes 80 mer] 58°C
 - [Appel des variants somatiques] 58°C
 - [Tous les autres panels] 62°C
- Placez immédiatement la plaque sur le support magnétique de plaque MIDI et attendez que le liquide soit clair (2 minutes).
- À l'aide d'une pipette réglée sur 200 µl pour l'ADNg de haute qualité ou sur 50 µl pour FFPE, retirez le surnageant de chaque puits et jetez-le.
- Répétez les étapes 1 à 8 deux fois pour un total de trois lavages.

Transfert du lavage

- Retirez du support magnétique.
- [ADNg de haute qualité]** Retirez rapidement l'EEW de l'incubateur de microéchantillons et ajoutez 200 µl à chaque puits.
- [ADNg extrait de tissu FFPE]** Retirez rapidement l'EEW de l'incubateur de microéchantillons et ajoutez 50 µl à chaque puits.
- Scellez et agitez à 1800 rpm pendant 4 minutes. En cas d'éclaboussures, réduisez la vitesse à 1 600 tr/min.

5. Transférez la solution de billes remises en suspension vers une nouvelle plaque MIDI.
Une partie des échantillons peut rester dans les puits.



ATTENTION

Le transfert de réactif limite le transfert des réactifs résiduels inhibant la PCR en aval.

6. Placez la plaque d'échantillons sur l'insert de bloc chauffant MIDI dans l'incubateur de microéchantillons, fermez le couvercle, puis incubez pendant 5 minutes à la température spécifiée :
 - [FFPE] 58°C
 - [Panels de sondes 80 mer] 58°C
 - [Appel des variants somatiques] 58°C
 - [Tous les autres] 62°C
7. Placez immédiatement la plaque sur le support magnétique de plaque MIDI et attendez que le liquide soit clair (2 minutes).
8. À l'aide d'une pipette réglée sur 200 µl pour l'ADNg de haute qualité ou sur 50 µl pour FFPE, retirez le surnageant de chaque puits et jetez-le.
9. Centrifugez la plaque à 280 × g pendant 30 secondes.
10. Placez sur un support magnétique de plaque MIDI pendant 10 secondes.
11. Utilisez une pipette de 20 µl pour retirer et jeter le liquide résiduel de chaque puits.
12. Passez immédiatement à l'étape [Élution, page 46](#) pour éviter que les billes ne sèchent trop et empêcher une diminution du rendement des librairies.

Élution

1. Combinez les volumes suivants pour préparer un mélange d'élution. Multipliez chaque volume par le nombre de librairies regroupées traitées.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Un excédent de réactifs supplémentaire est inclus dans le volume.
2. Agitez, puis centrifugez brièvement.
3. Retirez la plaque MIDI du support magnétique.
4. Ajoutez 23 µl du mélange d'élution à chaque puits.
5. Scellez la plaque et secouez à 1800 tr/m pendant 2 minutes.
6. Incubez la plaque à température ambiante pendant 2 minutes.
7. Centrifugez à 280 × g pendant 30 secondes.
8. Placez la plaque sur le support magnétique de plaque MIDI et attendez que le liquide soit clair (2 minutes).
9. Transférez 21 µl de surnageant de la plaque MIDI au puits correspondant d'une nouvelle plaque PCR à 96 puits.

10. Jetez la plaque MIDI.
11. Ajoutez 4 µl d'ET2 à chaque puits contenant 21 µl de surnageant.
12. Réglez la pipette à 20 µl et pipetez lentement chaque puits 10 fois pour mélanger.
13. Scellez la plaque et centrifugez à 280 × g pendant 10 secondes.
14. Incubez la plaque à température ambiante pendant 1 minute.

Amplification de la librairie enrichie

Cette étape utilise la PCR pour amplifier les librairies enrichies.

Consommables

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (Cocktail d'amorces PCR)
- Opercule adhésif

Préparation

1. Préparez les consommables suivants :

Élément	Stockage	Instructions
EPM	De -25°C à -15°C	Décongelez à une température de 4°C ou sur de la glace pendant une heure. Retournez pour mélanger le contenu, puis centrifugez brièvement. Réservez sur de la glace.
PPC	De -25°C à -15°C	Décongelez à une température de 4°C sur de la glace pendant une heure. Procédez par un tourbillon de mélange du contenu, puis centrifugez brièvement. Réservez sur de la glace.

2. Enregistrez le programme AMP suivant sur le thermocycleur, en utilisant le nombre approprié de cycles PCR, qui sont énumérés dans le tableau suivant.
 - Choisissez l'option à couvercle préchauffé et réglez-la à 100°C.
 - Définissez le volume de réaction à 50 µl.
 - 98°C pendant 45 secondes
 - X cycles de :
 - 98°C pendant 30 secondes
 - 60°C pendant 30 secondes
 - 72°C pendant 30 secondes
 - 72°C pendant 5 minutes
 - Maintenez à 10°C

La durée totale de l'analyse est d'environ 35 minutes.

Type de panel et d'échantillon	(X) cycles
FPPE	14
Panel d'exomes d'Illumina (CEX) pour l'ADNg de haute qualité	10
Panel d'exomes d'Illumina (CEX) pour le tissu FFPE	12
Tous les autres échantillons et panels	12 ¹²³⁴

¹ Possibilité de régler jusqu'à 15 cycles pour les petits panels de fournisseurs tiers lors de l'optimisation ultérieure. En cas d'utilisation de tissu FFPE, il est possible de régler jusqu'à 17 cycles.

² Possibilité de régler jusqu'à 17 cycles pour les panels de fournisseurs tiers ne contenant que 500 sondes. En cas d'utilisation de tissu FFPE, il est possible de régler jusqu'à 19 cycles.

³ Possibilité de régler jusqu'à 14 cycles pour les échantillons FFPE.

⁴ L'augmentation du nombre de cycles PCR pourrait entraîner un taux de duplicats plus élevé et des tailles de fragment plus petites pour les échantillons FFPE.

Procédure

1. Ajoutez 5 µl de PPC à chaque puits.
2. Ajoutez 20 µl d'EPM à chaque puits.
3. Scellez la plaque et agitez à 1200 t/min pendant 1 minute.
4. Centrifugez la plaque à 280 × g pendant 10 secondes.
5. Placez sur le thermocycleur préprogrammé et lancez le programme AMP.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, stockez les échantillons à une température se situant entre 2°C et 8°C pendant un maximum de deux jours. Vous pouvez également laisser le thermocycleur fonctionner pendant une durée maximale de 24 heures.

Nettoyage de la librairie enrichie amplifiée

Ce processus utilise des billes de nettoyage pour purifier la librairie enrichie et éliminer les produits indésirables.

Consommables

- CB (Billes de nettoyage)
- RSB (Tampon de Resuspension)
- Nouvelle préparation d'éthanol à 80 % (EtOH)
- Opercules adhésifs
- Plaques MIDI à 96 puits
- Plaque PCR à 96 puits
- Support magnétique de plaque MIDI

À propos des réactifs

- Billes de nettoyage
 - Agitez avant chaque utilisation.
 - Agitez fréquemment pour vous assurer que les billes sont réparties uniformément.
 - Aspirez et distribuez lentement, car la solution est visqueuse.

Préparation

1. Préparez les consommables suivants :

Élément	Stockage	Instructions
CB	Température ambiante	Agitez et retournez pour mélanger jusqu'à obtenir une couleur de liquide homogène.
RSB	2°C à 8°C	Amenez à température ambiante. Agitez pour mélanger.

2. Préparez une nouvelle solution d'EtOH à 80 % à partir d'éthanol absolu.

Procédure

1. Centrifugez la plaque PCR à 280 × g pendant 10 secondes.
2. Agitez les CB 3 fois pendant 10 secondes et retournez-les.
3. Ajoutez 40,5 µl de CB dans chaque puits d'une nouvelle **plaque MIDI**.
4. Transférez 45 µl de chaque puits de la plaque PCR aux puits correspondants de la plaque MIDI.
5. Scellez la plaque et secouez à 1800 tr/m pendant 1 minute.
6. Incubez la plaque MIDI à température ambiante pendant 5 minutes.

7. Centrifugez à $280 \times g$ pendant 10 secondes.
8. Placez la plaque sur le support magnétique de plaque MIDI et attendez que le liquide soit clair (5 minutes).
9. À l'aide d'une pipette réglée à $95 \mu\text{l}$, retirez et jetez tout le surnageant de chaque puits.
10. Lavez deux fois comme suit.
 - a. Lorsque la plaque est sur le support magnétique, ajoutez $200 \mu\text{l}$ de nouvelle solution à l'éthanol à 80 % sans mélanger.
 - b. Incubez pendant 30 secondes.
 - c. Retirez et jetez le surnageant sans déranger les billes.
11. Séchez à l'air libre sur le support magnétique pendant 5 minutes.
12. Pendant le séchage à l'air, utilisez une pipette de $20 \mu\text{l}$ pour enlever et jeter l'EtOH résiduel depuis chaque puits.
13. Retirez du support magnétique et ajoutez $32 \mu\text{l}$ de RSB à chaque puits.
14. Scellez la plaque et secouez à 1800 tr/m pendant 1 minute.
15. Incubez la plaque à température ambiante pendant 5 minutes.
16. Centrifugez à $280 \times g$ pendant 10 secondes.
17. Placez la plaque sur le support magnétique de plaque MIDI et attendez que le liquide soit clair (2 minutes).
18. Transférez $30 \mu\text{l}$ de surnageant de la plaque MIDI à 96 puits au puits correspondant d'une nouvelle plaque PCR.
19. Jetez la plaque MIDI.

POINT D'ARRÊT SÛR

Si vous arrêtez, scellez la plaque et stockez-la à une température se situant entre -25°C et -15°C pendant un maximum de 7 jours.

Vérification des librairies enrichies

Pour quantifier l'entrée d'ADNg double brin, employez une méthode fluorescente utilisant un marqueur intercalaire. Évitez les méthodes servant à mesurer la concentration totale d'acide nucléique comme NanoDrop ou toute autre méthode d'absorbance d'UV.

1. Analysez $1 \mu\text{l}$ de librairies enrichies en utilisant votre méthode de quantification.

REMARQUE La concentration molaire totale des sondes influe proportionnellement sur le rendement des librairies post-enrichissement.

Une taille des fragments moyenne de 125 à 235 pb et une distribution des fragments d'ADN avec une taille allant de $\sim 200 \text{ pb}$ à $\sim 1\,000 \text{ pb}$ sont attendues.

Dilution des bibliothèques à la concentration de départ

Ce processus dilue les bibliothèques à la concentration de départ pour votre système de séquençage et constitue la première étape d'une dilution en série. Après la dilution à la concentration de départ, les bibliothèques sont prêtes à être dénaturées et diluées à la concentration de chargement finale.

Pour le séquençage, Illumina recommande de configurer une analyse à lecture appariée de 151 cycles par lecture (2 × 151) et 10 cycles par lecture d'index, indépendamment du panel de sondes d'enrichissement que vous utilisez. Si vous souhaitez moins de lectures se chevauchant ou une plus petite couverture brute, vous pouvez réaliser le séquençage à 2 × 126 ou 2 × 101.

1. Calculez la valeur molaire de la bibliothèque ou des bibliothèques regroupées à l'aide de la formule suivante.
 - Pour les bibliothèques quantifiées sur un analyseur de fragments d'ADN, utilisez la taille moyenne obtenue pour la bibliothèque.
 - Pour toutes les autres méthodes de qualification, utilisez 350 pb comme taille moyenne de bibliothèque.

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{taille moyenne des bibliothèques (pb)}} = \text{Molarité (nM)}$$

Par exemple, si la concentration de votre bibliothèque est de 20 ng/μl et la taille moyenne est de 350 pb, alors la concentration molaire qui en résulte est de 86,58 nM.

$$\frac{20 ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times 350 (bp)} = 86.58(nM)$$

2. Avec la valeur de la concentration molaire, calculez les volumes nécessaires de RSB et de bibliothèques pour diluer les bibliothèques à la concentration de départ pour votre système.

Système de séquençage	Volume minimum requis de bibliothèques (μl)	Concentration de départ (nM)	Concentration de chargement finale (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) ou 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM est la concentration de départ pour une concentration de chargement finale de 350 pM. Si nécessaire, ajustez la concentration finale de chargement en utilisant le tableau suivant.

Concentration de chargement finale (pM)	Concentration des bibliothèques regroupées (nmol)
100	0,50
150	0,75
200	1

Concentration de chargement finale (pM)	Concentration des librairies regroupées (nmol)
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

- Diluer les librairies avec le RSB :
 - Librairies quantifiées en tant que regroupement de librairies multiplexées** : diluez le regroupement à la concentration de départ pour votre système.
 - Librairies quantifiées individuellement** : diluez chaque librairie à la concentration de départ pour votre système. Ajoutez 10 µl de chaque librairie diluée dans un tube pour créer un regroupement de librairies multiplexées.
- Suivez les instructions de dénaturation et de dilution pour votre système pour diluer à la concentration de chargement finale.
 - Pour le système NextSeq 550Dx, reportez-vous à [Préparation du séquençage avec l'instrument NextSeq 550Dx, page 52](#).
 - Pour le système MiSeqDx, reportez-vous à [Préparation du séquençage avec l'instrument MiSeqDx, page 54](#).
 - Pour le système NovaSeq 6000Dx, reportez-vous à [Préparation du séquençage avec l'instrument NextSeq 6000Dx, page 56](#).

Les concentrations de chargement finales sont un point de départ et une consigne générale. Optimisez les concentrations pour votre flux de travail et méthode de quantification au fil des analyses de séquençage ou par titrage de Flow Cell.

Préparation du séquençage avec l'instrument NextSeq 550Dx

Consultez les instructions suivantes pour dénaturer et diluer les librairies pour le séquençage sur le système de séquençage NextSeq 550Dx.

Consommables

- HT1 (tampon d'hybridation)
- NaOH 1N
- Tris-HCl 200 mM, pH 7,0

Préparation

Préparez une *nouvelle* dilution de NaOH 0,2 N pour dénaturer les bibliothèques aux fins du séquençage. Pour éviter que de petites erreurs de pipetage modifient la concentration finale du NaOH, un volume supplémentaire est préparé.



ATTENTION

Le NaOH 0,2 N nouvellement dilué est essentiel au processus de dénaturation. Une mauvaise dénaturation peut faire diminuer le rendement.

1. Combinez les volumes suivants dans un microtube à centrifuger pour diluer le NaOH 0 N en NaOH 0,2 N :
1. Préparez les consommables suivants :

Élément	Stockage	Instructions
HT1	De -25°C à -15°C	Décongelez à température ambiante. Entreposez à une température située entre 2°C et 8°C jusqu'à ce que vous soyez prêt à diluer les bibliothèques dénaturées.

2. Combinez les volumes suivants dans un tube de microcentrifugeuse pour préparer une nouvelle dilution de NaOH :
 - Eau de laboratoire (800 µl)
 - NaOH 1N (200 µl)
 Le résultat est 1 ml de NaOH 0,2 N.
3. Retournez le tube plusieurs fois pour mélanger.
4. Combinez les volumes suivants dans un tube de microcentrifugeuse pour préparer du Tris-HCl 200 mM, pH 7,0.
 - Eau de laboratoire (800 µl)
 - Tris-HCl 1M, pH 7,0 (200 µl)
 Le résultat est 1 ml de Tris-HCl 200 mM, pH 7,0.

REMARQUE Gardez le tube bouché. Utilisez la nouvelle dilution dans les **12 heures**.

Dénaturer des bibliothèques

1. Combinez les volumes suivants de bibliothèque et de NaOH 0,2 N nouvellement dilué dans un tube de microcentrifugeuse.
 - Bibliothèque 10 µl
 - NaOH 0,2 N 10 µl
2. Agitez brièvement, puis centrifugez à 280 × g pendant 1 minute.
3. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.

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

Diluer des bibliothèques dénaturées à 20 pM

1. Ajoutez 970 µl de HT1 préalablement réfrigéré au tube des bibliothèques dénaturées.
Le résultat est une bibliothèque dénaturée de 20 pM.
2. Agitez brièvement, puis centrifugez à 280 × g pendant 1 minute.
3. Placez les bibliothèques 20 pM sur de la glace jusqu'à ce que vous soyez prêt à réaliser la dilution finale.

Diluer des bibliothèques à la concentration de chargement

1. Ajoutez les volumes suivants pour diluer la solution de la bibliothèque dénaturée de 20 pM à 1,2 pM.
 - Solution de la bibliothèque dénaturée (78 µl)
 - HT1 préalablement réfrigéré (1 222 µl)Le volume total est de 1,3 ml à 1,2 pM.
2. Retournez pour mélanger, puis passez à la centrifugeuse à impulsions.
3. Passez au séquençage. Pour obtenir des instructions, consultez le *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document # 1000000009513)*.

Préparation du séquençage avec l'instrument MiSeqDx

Consultez les instructions suivantes pour dénaturer et diluer les bibliothèques pour le séquençage sur le système de séquençage MiSeqDx.

Consommables

- HT1 (tampon d'hybridation)
- NaOH 1N

Préparation

Préparez une *nouvelle* dilution de NaOH 0,2 N pour dénaturer les bibliothèques aux fins du séquençage. Pour éviter que de petites erreurs de pipetage modifient la concentration finale du NaOH, un volume supplémentaire est préparé.



ATTENTION

Le NaOH 0,2 N nouvellement dilué est essentiel au processus de dénaturation. Une mauvaise dénaturation peut faire diminuer le rendement.

1. Combinez les volumes suivants dans un microtube à centrifuger pour diluer le NaOH 0 N en NaOH 0,2 N :

1. Préparez les consommables suivants :

Élément	Stockage	Instructions
HT1	De -25°C à -15°C	Décongelez à température ambiante. Entreposez à une température située entre 2°C et 8°C jusqu'à ce que vous soyez prêt à diluer les librairies dénaturées.

2. Combinez les volumes suivants dans un tube de microcentrifugeuse pour préparer une nouvelle dilution de NaOH :

- Eau de laboratoire (800 µl)
- NaOH 1N (200 µl)

Le résultat est 1 ml de NaOH 0,2 N.

REMARQUE Gardez le tube bouché. Utilisez la nouvelle dilution dans les **12 heures**.

Dénaturer une librairie 4 nM

1. Combinez les volumes suivants dans un tube de microcentrifugeuse.
 - Librairie 4 nM (5 µl)
 - NaOH 0,2 N (5 µl)
2. Agitez brièvement, puis centrifugez à 280 × g pendant 1 minute.
3. Incubez à température ambiante pendant 5 minutes.
4. Ajoutez 990 µl préalablement réfrigéré au tube contenant la librairie dénaturée.
Il en résulte 1 ml de librairie dénaturée 20 pM.

Diluer une librairie dénaturée 20 pM

1. Diluez à la concentration souhaitée en utilisant les volumes suivants :

Concentration	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Librairie 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
HT1 préalablement réfrigéré	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Retournez pour mélanger, puis passez à la centrifugeuse à impulsions.
3. Passez au séquençage. Pour obtenir des instructions, consultez le *guide de référence de l'instrument MiSeqDx pour MOS v4 (document n° 1000000157953)*.

Préparation du séquençage avec l'instrument NextSeq 6000Dx

Consultez les instructions suivantes pour dénaturer et diluer les bibliothèques pour le séquençage sur le système de séquençage NextSeq 6000Dx.

Consommables

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (Tampon de Resuspension)
- NaOH 1N
- Tris-HCl 10 mmol, pH 8,5
- Tris-HCl 400 mM, pH 8,0
- Tube de bibliothèques pour NovaSeq 6000Dx

Préparation

Préparez une *nouvelle* dilution de NaOH 0,2 N pour dénaturer les bibliothèques aux fins du séquençage. Pour éviter que de petites erreurs de pipetage modifient la concentration finale du NaOH, un volume supplémentaire est préparé.



ATTENTION

Le NaOH 0,2 N nouvellement dilué est essentiel au processus de dénaturation. Une mauvaise dénaturation peut faire diminuer le rendement.

1. Combinez les volumes suivants dans un microtube à centrifuger pour diluer le NaOH 0 N en NaOH 0,2 N :

Tableau 4 Mode S2

Réactif	Volume pour une Flow Cell (en µl)	Volume pour deux Flow Cell (en µl)
Eau de laboratoire	40	80
Stock 1N NaOH	10	20

Ces volumes donneront 50 µl de NaOH 0,2 N pour une Flow Cell ou 100 µl de NaOH 0,2 N pour deux Flow Cell.

Tableau 5 Mode S4

Réactif	Volume pour une Flow Cell (en µl)	Volume pour deux Flow Cell (en µl)
Eau de laboratoire	80	160
Stock 1N NaOH	20	40

Ces volumes donneront 100 µl de NaOH 0,2 N pour une Flow Cell ou 200 µl de NaOH 0,2 N pour deux Flow Cells.

2. Retournez plusieurs fois pour mélanger ou agitez soigneusement.

REMARQUE Gardez le tube bouché. Utilisez la nouvelle dilution dans les **12 heures**.

Créer un regroupement de bibliothèques normalisé

La concentration de chargement peut varier selon les méthodes de préparation, de quantification et de normalisation des bibliothèques.

Suivez les instructions ci-dessous pour normaliser les bibliothèques à la bonne concentration et les regrouper ensuite. Les bibliothèques séquencées sur la même Flow Cell doivent être combinées dans un regroupement normalisé.

REMARQUE Le nombre maximal d'échantillons pouvant être analysés par ligne avec le kit Illumina DNA Prep with Enrichment Dx est de 192. Cette limite est due au nombre total d'index UD dans les ensembles A et B.

Normaliser les bibliothèques aux fins du regroupement

1. Déterminez la concentration du regroupement des bibliothèques requise en fonction de la concentration de chargement finale souhaitée.
 - Pour une concentration de chargement finale de 350 pM, la concentration requise de la bibliothèque groupée est de 1,75 nM.
 - Pour déterminer la concentration de la bibliothèque groupée pour une concentration de chargement finale différente, reportez-vous à [Dilution des bibliothèques à la concentration de départ, page 51](#).
2. Normalisez les bibliothèques à la concentration des bibliothèques regroupées voulue en utilisant 10 mM de Tris-HCl, pH 8,5.

Pour obtenir de l'aide afin de diluer les bibliothèques à la concentration appropriée, consultez le [Pooling Calculator sur le site Web d'Illumina](#).

Concentrations de chargement recommandées

La concentration de chargement optimale de l'ADN dépend du type de bibliothèque et de la taille des inserts. Pour les bibliothèques > 450 pb, une concentration de chargement plus grande pourrait être requise.

Regrouper les bibliothèques normalisées et ajouter un contrôle PhiX facultatif

1. Combinez le volume approprié de chaque bibliothèque normalisée dans un nouveau tube de microcentrifugeuse pour obtenir un des volumes finaux suivants :

Local Run Manager	Volume final (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Facultatif]** Ajoutez 1 % de substance de contrôle PhiX non dénaturée comme suit.
 - a. Diluez du contrôle PhiX 10 nmol à 2,5 nmol à l'aide de Tris-HCl 10 mmol, pH 8,5.
 - b. Ajoutez le volume approprié de 2,5 nmol de PhiX non dénaturé au tube de regroupement de bibliothèques non dénaturées.

Local Run Manager	2,5 nmol de PhiX (µl) non dénaturé	Regroupement de bibliothèques non dénaturées (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Il est recommandé d'ajouter la substance de contrôle PhiX dans un rapport de 1 % pour que les bibliothèques soient bien équilibrées. Les bibliothèques à faible diversité peuvent en nécessiter davantage. Pour utiliser un contrôle PhiX avec des bibliothèques à faible diversité, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina pour obtenir de l'aide.

Dénaturer un regroupement de bibliothèques et un contrôle PhiX facultatif

1. Ajoutez le NaOH 0,2 N au tube de regroupement de bibliothèques non dénaturées et de contrôle PhiX facultatif, en procédant comme suit.

Flow Cell	0.2N NaOH	Regroupement de bibliothèques non dénaturées (µl)	Volume obtenu
S2	37	150	187 µl, ou 187,9 µl avec PhiX
S4	77	310	387 µl, ou 388,9 µl avec PhiX

2. Mettez le bouchon et agitez brièvement.
3. Centrifugez à 280 x g pendant 1 minute.
4. Incubez à température ambiante pendant 8 minutes pour dénaturer.
5. Ajoutez 400 mM de Tris-HCl, pH 8,0 conformément aux indications suivantes, pour neutraliser.

Local Run Manager	400 mmol de Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Volume obtenu
S2	38	225 µl, ou 225,9 µl avec PhiX
S4	78	465 µl, ou 466,9 µl avec PhiX

6. Mettez le bouchon et agitez brièvement.
7. Centrifugez à 280 x g pendant 1 minute.
8. Transférez le volume entier de la bibliothèque dénaturée ou de la bibliothèque dénaturée et de PhiX dans le tube de la bibliothèque NovaSeq 6000Dx.
9. Passez au séquençage. Pour obtenir des instructions, consultez la documentation relative à l'instrument *NovaSeq 6000Dx* (document n° 200010105).

Dépannage

Utilisez le tableau suivant pour résoudre les problèmes survenant dans le flux de travail. Si une analyse de séquençage ou une préparation d'échantillon échoue deux fois, un dépannage supplémentaire pourrait être nécessaire. Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.

Observation	Cause possible	Action recommandée
L'analyse de séquençage échoue aux spécifications du contrôle de qualité.	Erreur d'utilisation ou d'équipement de laboratoire dans le flux de travail du test	<p>Qualifiez les librairies enrichies pour vous assurer que la distribution de la taille des fragments et le rendement des librairies sont appropriés. Répétez la préparation de librairie à partir de l'une des étapes suivantes, en fonction du point auquel l'erreur d'utilisation ou d'équipement est survenue. Si cela est inconnu, ou que d'autres erreurs sont survenues, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina pour dépanner votre analyse.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Procédez à un nouveau séquençage des librairies. Se référer à Préparation du séquençage avec l'instrument NextSeq 550Dx, page 52, Préparation du séquençage avec l'instrument MiSeqDx, page 54, ou Préparation du séquençage avec l'instrument NextSeq 6000Dx, page 56. • Enrichissez à nouveau les librairies. Se référer à Hybridation des sondes, page 39. • Commencez la préparation de librairie à partir du début du flux de travail. Se référer à Mode d'emploi, page 23.
	Problème d'instrument	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Erreur de génération des fichiers FASTQ ou erreur générale du système de séquençage (par exemple, erreur de réseau, erreur de chargement/déchargement des réactifs, etc.)	Problème de logiciel ou d'instrument	<p>Se référer à <i>Local Run Manager Software Guide (document # 100000002702)</i> pour obtenir de l'aide sur la génération de FASTQ ou consultez <i>NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (document # 1000000009513)</i>, <i>MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4 (document # 1000000157953)</i>, ou <i>NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation (document # 200010105)</i>.</p> <p>Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina pour obtenir une aide supplémentaire.</p>

Observation	Cause possible	Action recommandée
La librairie d'ADN ne génère pas un rendement suffisant pour le chargement du séquençage.	Les exigences d'entrée d'échantillon n'ont pas été remplies	Assurez-vous de l'entrée adéquate d'échantillons et répétez la préparation de librairies. Se référer à Recommandations concernant l'apport d'échantillons , page 20.
	Erreur d'utilisation ou d'équipement dans le flux de travail du test	Répétez la préparation de librairie à partir de l'une des étapes suivantes, en fonction du point auquel l'erreur d'utilisation ou d'équipement est survenue. Si cela est inconnu, ou que d'autres erreurs sont survenues, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina pour dépanner votre analyse. <ul style="list-style-type: none"> • Procédez à un nouveau séquençage des librairies. Se référer à Préparation du séquençage avec l'instrument NextSeq 550Dx, page 52, Préparation du séquençage avec l'instrument MiSeqDx, page 54, ou Préparation du séquençage avec l'instrument NextSeq 6000Dx, page 56. • Enrichissez à nouveau les librairies. Se référer à Hybridation des sondes, page 39. • Commencez la préparation de librairie à partir du début du flux de travail. Se référer à Mode d'emploi, page 23.
	Les exigences relatives aux panels de sondes d'enrichissement n'ont pas été remplies	Assurez-vous que le panel de sondes d'enrichissement est correct et répétez la préparation de librairies. Se référer à Exigences relatives aux panels de sondes d'enrichissement , page 11.

Caractéristiques de performance

Pour connaître les limites de l'application DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx lorsqu'elle est utilisée avec le NovaSeq 6000Dx, consultez la notice de l'instrument NovaSeq 6000Dx (document n° 200025276).

Performance avec des panels d'exomes entiers

La performance des panels d'exomes a été testée en utilisant la valeur la plus basse (50 ng) et la valeur la plus élevée (1 000 ng) recommandées pour l'entrée d'ADNg de lignées cellulaires Coriell NA12878, avec un ensemble représentatif de la réalité connu pour la détection de variants germinaux (Platinum Genome de Coriell). Le panel d'exome 1 (45 Mb) et le panel d'exome 2 (36,8 Mb) ont été utilisés comme panels représentatifs. 24 répliques techniques ont été testées par l'essai Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en utilisant le panel d'exome 1 (45 Mb) dans deux réactions d'enrichissement 12-plex. 12 répliques techniques ont été testées par l'essai Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en utilisant le panel d'exome 2 (36.8 Mb) dans deux réactions d'enrichissement 12-plex. Les bibliothèques enrichies ont été séquencées sur le système de séquençage NextSeq 550Dx avec le module DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

Le tableau suivant montre les valeurs moyennes des indicateurs de performance de l'appel des variants et du séquençage secondaire pour les répliques techniques testés avec chaque panel.

Tableau 6 Performance du test avec deux panels d'exomes entiers

Panel	Enrichissement par lectures élargies uniques	Uniformité de la couverture	Longueur moyenne des fragments	Rappel SNV ¹	Précision SNV ²	Rappel indel ¹	Précision indel ²
Panel d'exomes 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 pb	96 %	99 %	90 %	89 %
Panel d'exomes 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 pb	96 %	99 %	92 %	93 %

¹ Rappel = Positifs/(vrais positifs + faux négatifs)

² Précision = Vrais positifs/(vrais positifs + faux positifs)

Limite de détection

La norme de référence ADN Horizon HD799 a été utilisée pour tester la limite de détection. L'échantillon HD799 se compose d'ADN traité au formol modérément altéré avec des SNV connus dans des fréquences d'allèles allant de 1 à 24,5 %. L'entrée d'ADN la plus faible recommandée (50 ng) a été utilisée et le taux de détection des SNV avec une fréquence d'allèles variants (VAF) $\geq 5,0\%$ a été évalué. 16 répliques techniques ont été testés par substance interférente via le test Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, enrichis par un panel d'enrichissement pantumoral (1.94 Mb) dans des enrichissements simples, puis séquencés sur un instrument NextSeq 550Dx à l'aide du module DNA GenerateFASTQ Dx.

Tous les échantillons ont satisfait aux exigences de performance des échantillons spécifiques au panel tel qu'illustré dans le tableau suivant.

Tableau 7 Performance de l'échantillon pour la limite de détection

Panel	Taux de détection des variants de SNV avec une FAV \geq 5,0%	Moyenne Uniformité de la couverture
Panel d'enrichissement pantumoral (1,94 Mb, 523 gènes)	100 %	99 %

Substances interférentes

L'impact des substances potentiellement interférentes a été mesuré avec l'Illumina DNA Prep with Enrichment Dx en évaluant la performance du test en présence de telles substances.

Interférence dans le sang entier

L'acétaminophène (médicament, composé exogène), la créatinine et les triglycérides (métabolites endogènes) ont été testés en les intégrant à des échantillons de sang humain entier avant l'extraction d'ADN. Pour évaluer l'interférence résultant du prélèvement sanguin (petit volume), de l'EDTA a été également intégré dans des échantillons de sang entier. En outre, pour évaluer l'interférence résultant de la préparation des échantillons, de l'éthanol de qualité moléculaire a été intégré dans l'ADN extrait du sang entier.

Le tableau suivant montre les concentrations de test par substance interférente.

Tableau 8 Substances potentiellement interférentes et concentrations testées dans le sang entier

Substance de test	Concentration de test
Acétaminophène	15,6 mg/dl* Trois fois la concentration la plus élevée attendue suivant une dose médicamenteuse thérapeutique.
Créatinine	15 mg/dl* Concentration la plus élevée observée dans la population.
Triglycérides	1,5 g/dl* Concentration la plus élevée observée dans la population.
EDTA	6 mg/ml Trois fois la concentration attendue dans le sang, recueillis dans des tubes d'EDTA.
Éthanol de qualité moléculaire	15 % v/v Dans l'éluat après extraction d'ADN.

* Conformément à la norme CLSI EP37-ED1:2018

Douze réplicats techniques ont été testés par substance interférente via le test Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, enrichis par le panel d'exomes 1 (45 Mb) dans un enrichissement unique (à 12 niveaux), puis séquencés sur un instrument NextSeq 550Dx à l'aide du module DNA GenerateFASTQ Dx.

Pour les substances testées, les 12 échantillons ont satisfait les exigences de performance des échantillons et aucune interférence n'a été observée dans les performances du test.

Interférence dans le tissu FFPE

Deux échantillons FFPE colorectaux ont été testés en présence et en l'absence d'hémoglobine à 0,1 mg par section de tissu FFPE de 10 µm pour représenter le pire scénario de contamination de l'échantillon de tissu FFPE à 50 % par du sang présentant un taux élevé d'hémoglobine. Les échantillons ont été testés via le test Illumina DNA Prep with Enrichment Dx avec le panel d'enrichissement pantumoral 1 (1,94 Mb) utilisé comme panel représentatif dans des enrichissements simples. Les bibliothèques enrichies ont été alors séquencées sur un instrument NextSeq 550Dx avec le module DNA GenerateFASTQ Dx. Tous les échantillons ont satisfait aux exigences de performance des échantillons et il a été démontré que l'hémoglobine n'interférait pas avec la performance du test.

Pour évaluer l'interférence résultant de la préparation des échantillons, deux composés exogènes ont été ajoutés à l'ADN extrait d'un échantillon de tissu FFPE cancéreux de la vessie. Les substances exogènes testées sont des solutions d'extraction couramment employées dans les processus d'extraction d'ADN et sont énumérées dans le tableau suivant avec les quantités testées.

Les solutions de substance de test sont disponibles dans le commerce sous forme de trousse d'extraction d'ADN à colonnes.

Tableau 9 Substances exogènes potentiellement interférentes et concentrations testées dans le tissu FFPE

Substance de test	Concentration du test (éluat µl/30 µl)
Solution de déparaffinage	113 x 10 ⁻⁶
Wash Buffer AW2	0,417

Huit réplicats techniques ont été testés par substance interférente via le test Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, enrichis par un panel d'enrichissement pantumoral (1,94 Mb) dans des enrichissements simples, puis séquencés sur un instrument NextSeq 550Dx à l'aide du module DNA GenerateFASTQ Dx.

Pour les deux substances testées, les 8 échantillons ont satisfait les exigences de performance des échantillons et aucune interférence n'a été observée dans les performances du test.

Contamination croisée

L'ADNg de lignées cellulaires Coriell NA12878 (sujets féminins, 10 échantillons), l'ADNg de lignées cellulaires Coriell NA12877 (sujets masculins, 12 échantillons) et des contrôles négatifs (NTC, 2 échantillons) ont été testés via le test Illumina DNA Prep with Enrichment Dx dans une disposition de plaque en échiquier. Tous les échantillons ont utilisé la plus haute entrée d'ADNg recommandée (1 000 ng), qui est la condition la plus stricte pour évaluer la contamination croisée des échantillons. Le test a été réalisé deux fois par deux opérateurs différents. Le panel d'exomes 1 (45 Mb) a été utilisé dans des réactions d'enrichissement à 12 niveaux. Les bibliothèques enrichies ont été séquencées sur l'instrument NextSeq 550Dx avec le module

DNA GenerateFASTQ Dx. L'essai a porté sur l'évaluation de la couverture du chromosome Y spécifique à l'homme dans des échantillons féminins par rapport aux niveaux de base d'une plaque entièrement composée d'échantillons féminins et à la représentation d'index des échantillons NTC.

Tableau 10 Résultats de la contamination croisée

Échantillons féminins avec une couverture du chromosome Y dans < 3x le bruit de référence	Représentation d'index dans NTC
100 %	< 0,0005 %

Annexe : Séquences d'adaptateurs d'index UD d'Illumina

Ces adaptateurs d'index doubles uniques (UD) sont disposés sur la plaque de manière à renforcer la stratégie d'appariement recommandée. Les adaptateurs d'index ont une longueur de 10 bases et non la longueur de base type de 8 bases.

Adaptateurs d'index 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Adaptateurs d'index 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

La séquence suivante est utilisée pour le retranchement des adaptateurs des lectures 1 et 2.

CTGTCTCTTATACACATCT

Adaptateurs d'index Plaque A/Ensemble 1

Nom de l'index	Bases i7 dans l'adaptateur	Bases i5 dans l'adaptateur
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG

Nom de l'index	Bases i7 dans l'adaptateur	Bases i5 dans l'adaptateur
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
UDP0018	GGTTGCCTCT	CTAATGATGG
UDP0019	CTAATGATGG	GGTTGCCTCT
UDP0020	TCGGCCTATC	CGCACATGGC
UDP0021	AGTCAACCAT	GGCCTGTCCT
UDP0022	GAGCGCAATA	CTGTGTTAGG
UDP0023	AACAAGGCGT	TAAGGAACGT
UDP0024	GTATGTAGAA	CTAACTGTAA
UDP0025	TTCTATGGTT	GGCGAGATGG
UDP0026	CCTCGCAACC	AATAGAGCAA
UDP0027	TGGATGCTTA	TCAATCCATT
UDP0028	ATGTTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTCAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA

Nom de l'index	Bases i7 dans l'adaptateur	Bases i5 dans l'adaptateur
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAAC TGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA

Nom de l'index	Bases i7 dans l'adaptateur	Bases i5 dans l'adaptateur
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGCACTAATG	TGACTACATA
UDP0079	TCCTGACCGT	CGGCCTCGTT
UDP0080	CTGGCTTGCC	CAAGCATCCG
UDP0081	ACCAGCGACA	TCGTCTGACT
UDP0082	TTGTAACGGT	CTCATAGCGA
UDP0083	GTAAGGCATA	AGACACATTA
UDP0084	GTCCACTTGT	GCGCGATGTT
UDP0085	TTAGGTACCA	CATGAGTACT
UDP0086	GGAATTCCAA	ACGTCAATAC
UDP0087	CATGTAGAGG	GATACCTCCT
UDP0088	TACACGCTCC	ATCCGTAAGT
UDP0089	GCTTACGGAC	CGTGTATCTT
UDP0090	CGCTTGAAGT	GAACCATGAA
UDP0091	CGCCTTCTGA	GGCCATCATA
UDP0092	ATACCAACGC	ACATACTTCC
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGAAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Adaptateurs d'index Plaque B/Ensemble 2

Nom de l'index	Bases i7 dans l'adaptateur	Bases i5 dans l'adaptateur
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACC
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	ACGCTAATTA	TGGTTAAGAA
UDP0111	CCTTGTTAAT	TGTTGTTCGT
UDP0112	GTAGCCATCA	CCAACAACAT
UDP0113	CTTGTAATTC	ACCGGCTCAG
UDP0114	TCCAATTCTA	GTTAATCTGA
UDP0115	AGAGCTGCCT	CGGCTAACGT
UDP0116	CTTCGCCGAT	TCCAAGAATT
UDP0117	TCGGTCACGG	CCGAACGTTG
UDP0118	GAACAAGTAT	TAACCGCCGA
UDP0119	AATTGGCGGA	CTCCGTGCTG
UDP0120	GGCCTGTCCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Nom de l'index	Bases i7 dans l'adaptateur	Bases i5 dans l'adaptateur
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGC GTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCCTAGA	CGAAGGTTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTCCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA

Nom de l'index	Bases i7 dans l'adaptateur	Bases i5 dans l'adaptateur
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGCGCCAATT
UDP0157	CGCAATCTAG	AGATATGGCG
UDP0158	AACCGCATCG	CCTGCTTGGT
UDP0159	CTAGTCCGGA	GACGAACAAT
UDP0160	GCTCCGTCAC	TGGCGGTCCA
UDP0161	AGATGGAATT	CTTCAGTTAC
UDP0162	ACACCGTTAA	TCCTGACCGT
UDP0163	GATAACAAGT	CGCGCCTAGA
UDP0164	CTGGTACACG	AGGATAAGTT
UDP0165	CGAAGGTTAA	AGGCCAGACA
UDP0166	ATCGCATATG	CCTTGAACGG
UDP0167	ATCATAGGCT	CACCACCTAC
UDP0168	GATTGTCATA	TTGCTTGTAT
UDP0169	CCAACAACAT	CAATCTATGA
UDP0170	TTGGTGGTGC	TGGTACTGAT
UDP0171	GCGAACGCCT	TTCATCCAAC
UDP0172	CAACCGGAGG	CATAACACCA
UDP0173	AGCGGTGGAC	TCCTATTAGC
UDP0174	GACGAACAAT	TCTCTAGATT
UDP0175	CCACTGGTCC	CGCGAGCCTA
UDP0176	TGTTAGAAGG	GATAAGCTCT
UDP0177	TATATTCGAG	GAGATGTCGA
UDP0178	CGCGACGATC	CTGGATATGT
UDP0179	GCCTCGGATA	GGCCAATAAG
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC

Nom de l'index	Bases i7 dans l'adaptateur	Bases i5 dans l'adaptateur
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Historique des révisions

Document	Date	Description des modifications
Document # 200019584 v02	Septembre 2022	Ajout de contenu pour prendre en charge le séquençage sur l'instrument NovaSeq 6000Dx.
Document n° 200019584 v01	Mai 2022	Ajout du nom des systèmes de séquençage et des numéros de référence. Retrait des renseignements sur l'indexage double unique pour les bibliothèques à index simple.
Document n° 200019584 v00	Mai 2022	Publication originale.

Brevets et marques de commerce

Ce document et son contenu sont exclusifs à Illumina, Inc. et à ses sociétés affiliées (« Illumina »); ils sont exclusivement destinés à l'usage contractuel de son client dans le cadre de l'utilisation du ou des produits décrits dans les présentes et ne peuvent servir à aucune autre fin. Ce document et son contenu ne seront utilisés ou distribués à aucune autre fin ni communiqués, divulgués ou reproduits d'aucune façon sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Illumina ne cède aucune licence en vertu de son brevet, de sa marque de commerce, de ses droits d'auteur ou de ses droits traditionnels ni des droits similaires d'un tiers quelconque par ce document.

Les instructions contenues dans ce document doivent être suivies strictement et explicitement par un personnel qualifié et adéquatement formé de façon à assurer l'utilisation correcte et sûre du ou des produits décrits dans les présentes. Le contenu intégral de ce document doit être lu et compris avant l'utilisation de ce ou ces produits.

SI UN UTILISATEUR NE LIT PAS COMPLÈTEMENT ET NE SUIT PAS EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LES PRÉSENTES, IL RISQUE DE CAUSER DES DOMMAGES AU(X) PRODUIT(S), DES BLESSURES, NOTAMMENT AUX UTILISATEURS ET À D'AUTRES PERSONNES, AINSI QUE D'AUTRES DOMMAGES MATÉRIELS, ANNULANT AUSSI TOUTE GARANTIE S'APPLIQUANT AU(X) PRODUIT(S).

ILLUMINA DÉCLINE TOUTE RESPONSABILITÉ DÉCOULANT DE L'UTILISATION INAPPROPRIÉE DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LES PRÉSENTES (Y COMPRIS LEURS COMPOSANTES ET LE LOGICIEL).

© 2022 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.

Coordonnées



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Californie 92122 États-Unis
+ (1) 800 809 ILMN (4566)
+ (1) 858 202 4566
(en dehors de l'Amérique du Nord)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Pays-Bas

Commanditaire australien

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

Étiquette du produit

Pour voir la liste complète des symboles qui figurent sur l'emballage et l'étiquetage du produit, reportez-vous à la légende des symboles sur le site support.illumina.com, à l'onglet *Documentation* propre à votre trousse.