

Inserito della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO
SOLO PER L'ESTERO

Uso previsto

Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina® è un set di reagenti e materiali di consumo utilizzato per preparare le librerie di campioni ottenute da DNA genomico proveniente da cellule e tessuti umani. Per la preparazione delle librerie mirate a determinate regioni di interesse genomico è necessario l'uso di pannelli di sonde forniti dall'utente. Le librerie di campioni generate sono destinate all'uso sui sistemi di sequenziamento di Illumina.

Principi della procedura

Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è destinato alla preparazione di librerie per il sequenziamento del DNA arricchite per regioni target dal DNA genomico proveniente da cellule e tessuti umani.

Per l'arricchimento target, l'utente deve fornire pannelli oligonucleotidi marcati con biotina. Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è compatibile con diverse dimensioni di pannello, dai pannelli piccoli (< 20.000 sonde) a quelli grandi (> 200.000 sonde). Le librerie arricchite generate sono destinate al sequenziamento sui sistemi di sequenziamento di Illumina.

La procedura del DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina comprende i seguenti passaggi:

- **Tagmentazione di DNA genomico:** utilizzo di Enrichment BLT Small (eBLTS) per tagmentare l'input del DNA. Durante la tagmentazione, il gDNA viene frammentato e marcato con adattatori in un unico passaggio. Per saturare l'eBLTS nella reazione di tagmentazione, è richiesto un input di DNA minimo di 50 ng. Una volta saturato, eBLTS frammenta un numero impostato di molecole di DNA per generare librerie normalizzate di distribuzione coerente delle dimensioni del frammento.
- **Pulizia in seguito alla tagmentazione:** pulizia del DNA marcato con adattatori su eBLTS per usarlo nell'amplificazione.
- **Amplificazione di DNA sottoposto a tagmentazione:** amplificazione del DNA sottoposto a tagmentazione mediante un programma di PCR a ciclo limitato. Alle estremità del frammento di DNA vengono aggiunti indici doppi univoci (UD, Unique Dual) che consentono la doppia marcatura univoca delle librerie di DNA e di cluster in fase di sequenziamento.
- **Pulizia delle librerie:** procedura di purificazione delle microsfere per purificare e selezionare la dimensione delle librerie di DNA amplificate.
- **Raggruppamento in pool delle librerie:** combinazione delle librerie di DNA con indici univoci in pool che raggruppano fino a 12 librerie. Le librerie possono essere raggruppate in pool per volume o per massa.
- **Ibridazione delle sonde:** reazione di ibridazione nella quale le librerie di DNA a doppio filamento vengono denaturate e un pannello di sonde di DNA biotinilate viene ibridato su regioni genomiche mirate.

Inserito della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è compatibile con diversi pannelli. Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina non include un pannello di arricchimento. I pannelli sonda sono forniti dall'utente e devono essere conformi alle specifiche richieste. I reagenti di DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina sono compatibili sia con i pannelli oligonucleotidi DNA di arricchimento di Illumina che con quelli di terze parti, purché conformi alle specifiche richieste. Per informazioni sulle specifiche richieste per pannelli di terze parti, fare riferimento a [Requisiti del pannello sonda di arricchimento a pagina 10](#).
- **Cattura delle sonde ibridate:** uso di Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) per catturare le sonde biotinilate ibridate sulle regioni target di interesse.
- **Amplificazione delle librerie arricchite:** uso di PCR per amplificare le librerie arricchite.
- **Pulizia delle librerie arricchite e amplificate:** procedura di purificazione delle microsfele per purificare le librerie arricchite e prepararle al sequenziamento.
- **Sequenziamento:** il sequenziamento delle librerie arricchite viene eseguito sui sistemi di sequenziamento MiSeqDx, NextSeq 550Dx o NovaSeq 6000Dx. Per MiSeqDx e NextSeq 550Dx, il DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module integrato viene usato per impostare la corsa di sequenziamento, eseguire il monitoraggio e l'analisi primaria (generazione di FASTQ partendo dalla generazione delle basi). Per NovaSeq 6000Dx, DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application è utilizzata per impostare la corsa e per l'analisi secondaria; sono disponibili diversi flussi di lavoro.

Limiti della procedura

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è compatibile con DNA genomico proveniente da cellule e tessuti umani.
- Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è compatibile con input di gDNA a doppio filamento tra i 50 e i 1.000 ng. In presenza di input fuori da tali soglie, la prestazione non è assicurata.
- Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina non include reagenti per l'estrazione del DNA. I risultati dei test analitici, compresi quelli per valutare le interferenze, illustrati in [Caratteristiche delle prestazioni a pagina 59](#) sono ottenuti usando sangue intero e FFPE come tipi di campioni rappresentativi e con kit di estrazione del DNA rappresentativi. Per tutti i test diagnostici sviluppati per essere eseguiti con i reagenti del DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è richiesta la piena convalida rispetto a ogni aspetto della prestazione con il kit di estrazione del DNA di propria scelta.
- DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina non è raccomandato per campioni FFPE di qualità scarsa con $\Delta Cq > 5$. L'utilizzo di campioni con $\Delta Cq > 5$ potrebbe aumentare la possibilità di preparazioni delle librerie errate e diminuire le prestazioni del saggio.
- I reagenti del DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina sono stati configurati e analizzati secondo l'input campione, le reazioni di arricchimento e il numero di plex indicati nella tabella seguente.

Inserito della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina	Input di campione	Reazioni di arricchimento	Numero di plex di arricchimento
Kit da 16 campioni	Qualità scarsa (FFPE)	16 reazioni	1 plex
Kit da 96 campioni	Qualità elevata (ad es. sangue intero)	8 reazioni	12 plex

- L'elaborazione di input di FFPE è stata testata ed è consigliata esclusivamente per reazioni di arricchimento a 1 plex con kit a 16 campioni.
- In caso di kit a 96 campioni, sono possibili numeri di plex non standard (da 2 a 11 plex), ma con i seguenti limiti:
 - L'elaborazione di campioni con reazioni di arricchimento in plex da 2 a 11 riduce il rendimento del kit.
 - Non sono assicurati risultati ottimali. Ottenere una resa di arricchimento adeguata con numeri di plex non standard potrebbe richiedere un'ottimizzazione ulteriore.
 - In caso di strategie di raggruppamento in pool con un basso numero di plex (da 2 a 8 plex), è necessario selezionare adattatori di indice con sequenze diverse per ottimizzare il bilanciamento del colore e ottenere un sequenziamento e un'analisi dei dati soddisfacenti. DNA GenerateFASTQ Dx Module su MiSeqDx e NextSeq 550Dx permette di scegliere diverse combinazioni di indici bilanciati per colore in fase di impostazione della corsa. Per maggiori informazioni sull'utilizzo del raggruppamento in pool, fare riferimento a [Metodi di raggruppamento in pool a pagina 34](#).
- Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina genera esclusivamente le librerie arricchite sequenziate su MiSeqDx, NextSeq 550Dx e NovaSeq 6000Dx. Per l'uso di altri sistemi di sequenziamento è richiesta la convalida di tutti gli aspetti della prestazione.
- I pannelli di arricchimento non sono inclusi in questo prodotto. I risultati dei test analitici illustrati in [Caratteristiche delle prestazioni a pagina 59](#) sono ottenuti con pannelli di arricchimento rappresentativi e vengono forniti esclusivamente a scopo informativo. Le caratteristiche analitiche delle prestazioni costituiscono un esempio delle capacità generali del saggio e non rappresentano le capacità o l'idoneità di eventuali dichiarazioni specifiche sul saggio. Per tutti i test diagnostici sviluppati per essere utilizzati con questi reagenti è richiesta la convalida di ogni aspetto della prestazione.
- Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è compatibile sia con i pannelli di arricchimento di Illumina che con quelli di terze parti. Tuttavia, per l'uso di pannelli di arricchimento di terze parti che non rispettano i requisiti del pannello non sono garantite le prestazioni. Per maggiori informazioni sui requisiti del pannello, fare riferimento a [Requisiti del pannello sonda di arricchimento a pagina 10](#).
- Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina utilizza un tempo di ibridazione di 2 ore. Un tempo di ibridazione più lungo potrebbe danneggiare la metrica delle prestazioni.
- I DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module per MiSeqDx e NextSeq 550Dx forniscono solo file FASTQ. Quando si utilizzano questi moduli è necessario convalidare l'analisi secondaria.

Insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- DRAGEN per DNA Prep with Enrichment Dx Application di Illumina è disponibile sul NovaSeq 6000Dx. L'applicazione supporta diversi flussi di lavoro di analisi secondaria, inclusi generazione di file FASTQ, generazione di file FASTQ e VCF per il rilevamento di varianti della linea germinale e la generazione di file FASTQ e VCF per il rilevamento di varianti somatiche. Quando si utilizza l'applicazione per la generazione di file VCF è necessario convalidare dell'analisi secondaria.
- Per informazioni su DRAGEN per DNA Prep with Enrichment Dx Application di Illumina utilizzato con NovaSeq 6000Dx, fare riferimento all'*Insero della confezione di NovaSeq 6000Dx Instrument (documento n. 200025276)*.

Componenti del prodotto

Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è costituito dai seguenti componenti.

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A, n. di catalogo 20051354 (16 campioni) o n. di catalogo 20051352 (96 campioni)
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, n. di catalogo 20051355 (16 campioni) o n. di catalogo 20051353 (96 campioni)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module per NextSeq 550Dx, n. di catalogo 20063024
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Module per MiSeqDx, n. di catalogo 20063022
- DRAGEN per Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application per NovaSeq 6000Dx, n. di catalogo 20074609

Reagenti forniti

Per completare il DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina, è necessario il DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set A o il DNA Prep with Enrichment Dx with UD Indexes Set B, entrambi di Illumina. Il seguente numero di reazioni di arricchimento e preparazione della libreria può essere eseguito usando kit da 16 o 96 campioni.

DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina	Input di campione	Reazioni di arricchimento	Numero di plex di arricchimento
Kit da 16 campioni	Qualità scarsa (FFPE)	16 reazioni	1 plex
Kit da 96 campioni	Qualità elevata (ad es. sangue intero)	8 reazioni	12 plex

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

Prep Dx Tagmentation Reagents 1 di Illumina, conservazione da 15 °C a 30 °C

I seguenti reagenti vengono inviati a temperatura ambiente. Conservare subito i reagenti alla temperatura indicata per assicurare prestazioni adeguate.

Nome reagente	Quantità provette		Colore tappo	Volume di riempimento	Ingredienti attivi
	16 campioni (n. 20050020)	96 campioni (n. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Rosso	350 µl	Soluzione detergente in acqua.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Verde	41 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente detergente e sale.
Cleanup Beads (CB)	1	N/A*	Rosso	10 ml	Microsfere paramagnetiche in fase solida in soluzione acquosa tamponata.

* Le Cleanup Beads per 96 campioni sono incluse nel Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples di Illumina (n. 20050030).

Prep Dx Cleanup Beads di Illumina (96 campioni), conservazione da 15 °C a 30 °C

Le Cleanup Beads sono incluse nel Prep Dx Cleanup Beads di Illumina (n. di catalogo 20050030) per kit da 96 campioni. Il seguente reagente viene inviato a temperatura ambiente. Conservare subito i reagenti alla temperatura indicata per assicurare prestazioni adeguate. Le Cleanup Beads sono incluse nel Prep Dx Tagmentation Reagents 1 di Illumina (n. di catalogo 20050020) per 16 kit campione.

Nome reagente	Quantità	Colore tappo	Volume di riempimento	Ingredienti attivi
Cleanup Beads (CB)	4	Rosso	10 ml	Microsfere paramagnetiche in fase solida in soluzione acquosa tamponata.

DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2 di Illumina, conservazione da 2 °C a 8 °C

I reagenti seguenti vengono spediti refrigerati. Conservare subito i reagenti alla temperatura indicata per assicurare prestazioni adeguate. Conservare la provetta di conservazione di eBLTS in posizione verticale affinché le microsfere siano sempre immerse nel tampone.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Nome reagente	Quantità provette		Colore tappo	Volume di riempimento		Ingredienti attivi
	16 campioni (n. 20050021)	96 campioni (n. 20050026)		16 campioni	96 campioni	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Giallo	200 µl	290 µl	Streptavidin Magnetic Beads collegate a trasposoni in soluzione acquosa tamponata contenente glicerolo, EDTA, ditiotreitolo, sale e detergente.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Trasparente	1,8 ml	1,8 ml	Soluzione acquosa tamponata.

Prep Dx Tagmentation Reagents 3 di Illumina, conservazione da -25 °C a -15 °C

I reagenti seguenti vengono spediti congelati. Conservare subito i reagenti alla temperatura indicata per assicurare prestazioni adeguate.

Nome reagente	Quantità provette		Colore tappo	Volume di riempimento		Ingredienti attivi
	16 campioni (n. 20050022)	96 campioni (n. 20050027)		16 campioni	96 campioni	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Trasparente	290 µl	290 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente sale di magnesio e dimetilformam- mide.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Nome reagente	Quantità provette		Colore tappo	Volume di riempimento		Ingredienti attivi
	16 campioni (n. 20050022)	96 campioni (n. 20050027)		16 campioni	96 campioni	
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	4	Trasparente	200 µl	610 µl	DNA polimerasi e dNTP in soluzione acquosa tamponata.

DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 samples) di Illumina, conservazione da 2°C a 8°C

I reagenti seguenti sono inclusi nel DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 di Illumina (n. di catalogo 20050023) per i kit a 16 campioni. I reagenti sono inclusi nel Prep Dx Enrichment Reagents 1 di Illumina (n. di catalogo 20050028) per i kit a 96 campioni.

I reagenti seguenti vengono spediti refrigerati. Conservare subito i reagenti alla temperatura indicata per assicurare prestazioni adeguate.

Nome reagente	Quantità provette	Colore tappo	Volume di riempimento	Ingredienti attivi
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Trasparente	1,2 ml	Microsfere magnetiche coniugate con la streptavidina in soluzione acquosa tamponata contenente formammide, detergente e sale.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Trasparente	1,8 ml	Soluzione acquosa tamponata.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Trasparente	200 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente detergente e sale.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Trasparente	200 µl	Soluzione acquosa tamponata.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 samples) di Illumina, conservazione da 2 °C a 8 °C

I reagenti seguenti sono inclusi nel Prep Dx Enrichment Reagents 1 di Illumina (n. di catalogo 20050028) per i kit a 96 campioni. I reagenti sono inclusi nel DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 di Illumina (n. di catalogo 20050023) per i kit a 16 campioni.

I reagenti seguenti vengono spediti refrigerati. Conservare subito i reagenti alla temperatura indicata per assicurare prestazioni adeguate.

Nome reagente	Quantità provette	Colore tappo	Volume di riempimento	Ingredienti attivi
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Trasparente	1,2 ml	Microsfere magnetiche coniugate con la streptavidina in soluzione acquosa tamponata contenente formammide, detergente e sale.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Trasparente	1,8 ml	Soluzione acquosa tamponata.
Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Trasparente	200 µl	Soluzione acquosa tamponata contenente detergente e sale.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Trasparente	200 µl	Soluzione acquosa tamponata.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2 di Illumina, conservazione da -25 °C a -15 °C

I reagenti seguenti vengono spediti congelati. Conservare subito i reagenti alla temperatura indicata per assicurare prestazioni adeguate.

Nome reagente	Quantità provette		Colore tappo	Volume di riempimento	Ingredienti attivi
	16 campioni (n. 20050024)	96 campioni (n. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Trasparente	580 µl	Soluzione detergente in acqua.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Ambra	4,1 ml	Soluzione acquosa tamponata contenente sale e detergente.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Trasparente	320 µl	Miscela primer PCR (oligonucleotidi).
2N NaOH (HP3)	1	1	Trasparente	200 µl	Soluzione di idrossido di sodio 2N (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Blu	480 µl	Soluzione acquosa tamponata con DNA Cot-1, agente di affollamento e formammide.
Enhanced PCR Mix (EPM)	2	1	Trasparente	200 µl	DNA polimerasi e dNTP in soluzione acquosa tamponata.

Unique Dual Index Dx Set A/B di Illumina, conservazione da -25°C a -15°C

I reagenti seguenti vengono spediti congelati. Conservare subito i reagenti alla temperatura indicata per assicurare prestazioni adeguate. Per le sequenze adattatore dell'indice, fare riferimento all'[Appendice: Sequenze adattatore indici UD di Illumina a pagina 62](#).

Componente	Quantità
Unique Dual Index Dx Set A (96 Indexes) di Illumina, n. 20050038	1
Unique Dual Index Dx Set B (96 Indexes) di Illumina, n. 20050039	1

Reagenti non forniti

Reagenti richiesti, non forniti

- Reagenti di estrazione e purificazione di DNA
- Reagenti di quantificazione DNA
- Etanolo (200 proof per biologia molecolare)
- Acqua priva di nucleasi
- 1M di Tris-HCl, pH 7,0
- 10 mM di Tris-HCl, pH 7,5-8,5
- 1N di soluzione NaOH, per biologia molecolare
- Se si usa il sistema di sequenziamento NextSeq 550Dx:
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (n. di catalogo 20028871)
- Se si usa il sistema di sequenziamento MiSeqDx:
 - MiSeqDx Reagent Kit v3 (n. di catalogo 20037124)
- Se si usa il sistema di sequenziamento NovaSeq 6000Dx:
 - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cycles) (n. di catalogo 20046931)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cycles) (n. di catalogo 20046933)
 - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (n. di catalogo 20062292)
 - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (n. di catalogo 20062293)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube (n. di catalogo 20062290)
 - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (n. di catalogo 20062291)

Requisiti del pannello sonda di arricchimento

I reagenti del DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina sono compatibili sia con i pannelli oligonucleotidi DNA di arricchimento di Illumina che con quelli di terze parti. In caso si utilizzino sonde DNA marcate con biotina di terze parti (pannelli fissi o personalizzati), assicurarsi che siano conformi alle specifiche richieste.

Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è stato ottimizzato e convalidato secondo le seguenti specifiche del pannello di terze parti. In caso di utilizzo di pannelli di terze parti non rispondenti alle specifiche, non sono garantite prestazioni paragonabili.

- Sonda lunga 80 bp o 120 bp
- Tra le 500 e le 675.000 sonde
- DNA a filamento singolo o doppio
- Input totale della sonda ≥ 3 pmol per arricchimenti con un numero di plex da 1 a 12

Conservazione e manipolazione

- Per temperatura ambiente si intende la temperatura compresa tra 15 °C e 30 °C.
- I reagenti sono stabili se conservati come indicato fino alla data di scadenza indicata sulle etichette dei kit. Per informazioni sulle temperature di conservazione, fare riferimento a [Reagenti forniti a pagina 4](#).
- I reagenti congelati sono stabili per un massimo di quattro cicli di congelamento-scongelo eseguiti prima della data di scadenza indicata.
- La procedura DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina contiene i seguenti punti di arresto sicuro:
 - Dopo [Amplificazione di DNA sottoposto a tagmentazione a pagina 29](#), le librerie amplificate sono stabili per un massimo di 30 giorni se conservate a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.
 - Dopo [Pulizia delle librerie a pagina 31](#), le librerie amplificate pulite sono stabili per un massimo di 30 giorni se conservate a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.
 - Dopo [Pool di librerie pre-arricchimento a pagina 33](#), le librerie raggruppate sono stabili per un massimo di 30 giorni se conservate a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C.
 - Dopo [Amplificazione della libreria arricchita a pagina 45](#), la piastra delle librerie arricchite e amplificate può restare sul ciclatore termico per un massimo di 24 ore. In alternativa, la piastra può essere conservata a 2-8 °C per un massimo di 48 ore.
 - Le librerie arricchite pulite finali sono stabili per un massimo di 7 giorni se conservate a una temperatura compresa tra -25 e -15 °C.
- Se la confezione o i contenuti di DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina sono danneggiati o compromessi, contattare l'Assistenza clienti Illumina.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) può formare precipitati o cristalli visibili. Se si osservano precipitati, riscaldare a 37 °C per 10 minuti, quindi agitare con il vortex fino alla dissoluzione dei precipitati.
- Hybridization Oligos (HYB) ed Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) devono essere preriscaldati alla stessa temperatura della temperatura di mantenimento dell'ibridazione applicabile in base al tipo di campione e al pannello di sonde. Per maggiori informazioni sulla manipolazione di NHB2 ed EEW, fare riferimento a [Note sulla procedura a pagina 16](#).
- Enrichment Hyb Buffer 2 (EHB2) ed HYB Buffer+IDT NXT Blockers (NHB2) possono sviluppare cristalli e torbidità. Se si osservano cristalli o un aspetto torbido, agitare con il vortex o pipettare su e giù per miscelare fino a che la soluzione non diventi trasparente. Assicurarsi di preriscaldare NHB2 prima di pipettare.
- Quando si manipolano le Cleanup Beads (CB), adottare le seguenti migliori pratiche:
 - Non congelare mai le microsfere.
 - Immediatamente prima dell'uso, agitare bene le microsfere con un vortex fino ad ottenere una corretta risospensione e il colore appare omogeneo.
- Quando si manipola Enrichment BLT Small (eBLTS), adottare le seguenti migliori pratiche:

- Conservare la provetta di eBLTS in posizione verticale affinché le microsfere siano sempre immerse nel tampone.
- Agitare accuratamente la provetta di eBLTS fino a risospendere le microsfere. Per evitare la risedimentazione delle microsfere, si sconsiglia la centrifugazione prima del pipettaggio.
- Se le microsfere aderiscono al lato o alla parte superiore di una piastra a 96 pozzetti, centrifugare a 280 × g per 3 secondi, quindi pipettare per risospendere.
- Quando si manipola gli adattatori portacelle dell'indice, adottare le seguenti migliori pratiche:
 - Non aggiungere campioni all'adattatore portacelle dell'indice.
 - Ciascun pozzetto della piastra dell'indice è esclusivamente monouso.

Apparecchiature e materiali richiesti, non forniti

Prima di avviare il protocollo, verificare di disporre dell'attrezzatura e dei materiali richiesti, oltre al DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina.

Apparecchiature

Prima di avviare il protocollo, verificare di disporre dell'apparecchiatura richiesta.

Il protocollo è stato ottimizzato e convalidato utilizzando gli elementi con le specifiche elencate. In caso di utilizzo di apparecchiature non rispondenti alle specifiche, non sono garantite prestazioni paragonabili.

Alcuni elementi sono richiesti solo per specifici flussi di lavoro. Tali elementi sono specificati in tabelle separate.

- Ciclatore termico dotato delle seguenti specifiche:
 - Coperchio riscaldato
 - Intervallo di controllo della temperatura minima da 10 °C a 98 °C
 - Accuratezza della temperatura minima di $\pm 0,25$ °C
 - Volume di reazione massimo di 100 μ l
 - Compatibile con piastre PCR a 96 pozzetti fully skirted
- Incubatore per microcampioni con le seguenti specifiche:
 - Intervallo di temperatura ambiente da +5,0 °C a 99,0 °C
 - Compatibile con le piastre MIDI a 96 pozzetti
- Inserti dell'incubatore per microcampioni compatibili con le piastre MIDI a 96 pozzetti
- Shaker per micropiastre ad alta velocità con un intervallo di velocità di miscelazione tra i 200 e i 3.000 giri/min
- Supporto magnetico compatibile con le piastre PCR a 96 pozzetti
- Supporto magnetico compatibile con le piastre MIDI a 96 pozzetti
- Fluorimetro compatibile con il proprio sistema di quantificazione

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- Analizzatore di frammenti di DNA
- Pipette di precisione:
 - Pipette monocanale o multicanale da 10 µl
 - Pipette monocanale o multicanale da 20 µl
 - Pipette monocanale o multicanale da 200 µl
 - Pipette monocanale da 1.000 µl
 - Pipette di precisione che assicurano l'erogazione corretta di reagente e campione. È possibile utilizzare sia pipette monocanale che multicanale se calibrate regolarmente e precise entro un margine del 5% del volume stabilito.
- Centrifuga per micropiastre
- Microcentrifuga
- Uno dei seguenti sistemi di sequenziamento Illumina:
 - MiSeqDx Instrument, n. di catalogo DX-410-1001
 - NextSeq 550Dx Instrument, n. di catalogo 20005715
 - NovaSeq 6000Dx Instrument, n. di catalogo 20068232
- **[Facoltativo]** Concentratore di vuoto
- **[FFPE]** Sistema di rilevamento PCR in tempo reale

Materiali

Prima di avviare il protocollo, verificare di disporre dei materiali richiesti.

Alcuni elementi sono richiesti solo per specifici flussi di lavoro. Tali elementi sono specificati in tabelle separate.

Il protocollo è stato ottimizzato e convalidato utilizzando i materiali elencati. Se si utilizzano materiali differenti, non sono garantite prestazioni confrontabili.

- Punte di pipette filtrate
- Provette per centrifuga coniche da 15 o da 50 ml
- Provette per microcentrifuga da 1,5 ml
- Serbatoi dei reagenti monouso privi di RNasi/DNasi
- Striscia a otto provette e tappi privi di RNasi/DNasi
- Pipette sierologiche
- Polypropylene Deepwell Storage Plate a 96 pozzetti da 0,8 ml (piastra MIDI)
- Piastre PCR Hard-Shell a 96 pozzetti fully skirted
- **[FFPE]** Piastre qPCR compatibili con il qPCR Instrument
- Sigilli adesivi per piastre a 96 pozzetti con le seguenti specifiche:
 - Poliestere rimovibile otticamente trasparente

Inserito della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- Adatti per piastre PCR skirted
- Adesivo forte in grado di resistere a più sbalzi di temperatura da -40 °C a 110 °C
- Privo di DNasi/RNasi
- Materiali di consumo in plastica compatibili con il sistema di qualificazione di propria scelta.
- Kit di quantificazione dsDNA fluorometrica compatibile con il sistema di quantificazione di propria scelta:
 - Per la quantificazione delle librerie amplificate pre-arricchite, è possibile usare un kit di quantificazione ad ampia gamma.
 - Per la quantificazione delle librerie arricchite, la gamma del kit di quantificazione dipende dal pannello sonda usato.
- Kit di analisi dei frammenti per la qualificazione della libreria con il sistema di qualificazione di propria scelta:
 - Per la qualificazione delle librerie amplificate pre-arricchite, è possibile usare un kit ad ampia gamma.
 - Per la qualificazione delle librerie arricchite, la gamma del kit di qualificazione dipende dal pannello sonda usato.
- [Facoltativo] Kit per estrarre il DNA dalle cellule e dai tessuti umani. Può essere utilizzato qualunque sistema di estrazione convalidato.

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni



ATTENZIONE

Manipolare tutti i campioni come agenti potenzialmente infettivi.

- Questo saggio è compatibile con DNA genomico proveniente da cellule e tessuti umani.
- In caso di gDNA purificato disponibile in commercio, assicurarsi che i campioni siano stati trasportati in condizioni adeguate e conservati in conformità con le istruzioni del produttore. Seguire le migliori pratiche di conservazione e congelamento/scongelo del gDNA.
- In caso di input di sangue intero, rispettare i requisiti di raccolta, trasporto e conservazione specifici per il metodo di estrazione del DNA scelto. È possibile utilizzare qualsiasi metodo di estrazione convalidato. Il trasporto di sangue intero deve essere conforme alle regolamentazioni nazionali, federali e statali per il trasporto di agenti eziologici.
- Per l'estrazione di DNA da tessuto FFPE, è possibile usare qualunque metodo di estrazione convalidato. Seguire le istruzioni e le raccomandazioni specifiche per il metodo di estrazione scelto nelle seguenti pratiche:
 - Fissaggio in formalina e inclusione in paraffina per garantire una migliore qualità del DNA estratto.
 - Conservazione dei campioni FFPE.
 - Requisiti del materiale iniziale, come il numero e lo spessore delle sezioni FFPE. La maggior parte dei sistemi di purificazione consigliati per l'uso con sezioni appena tagliate.

Avvertenze e precauzioni

- I reagenti di DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina contengono composti chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni sulle considerazioni ambientali, sulla sicurezza e sulla salute, fare riferimento alle schede dei dati di sicurezza (SDS, Safety Data Sheet) alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.
- Manipolare tutti i campioni di sangue come se fossero contagiosi per il virus dell'immunodeficienza umana (HIV, Human Immunodeficiency Virus), virus dell'epatite B (HBV, Human Hepatitis B Virus) o altri agenti patogeni a trasmissione ematica (precauzioni universali).
- Adottare le normali precauzioni di laboratorio. Non pipettare con la bocca. Non mangiare, bere o fumare nelle aree designate per il lavoro. Manipolare i campioni e i reagenti del kit indossando guanti e indumenti da laboratorio monouso. Dopo aver maneggiato i campioni e i reagenti del kit lavarsi bene le mani.
- Per impedire la degradazione del campione o del reagente, assicurarsi che tutti i vapori di ipoclorito di sodio prodotti dalla pulizia siano stati dissipati completamente prima di avviare il protocollo.
- La contaminazione dei campioni con altri prodotti/ampliconi della PCR può causare risultati imprecisi e inaffidabili. Per evitare la contaminazione, utilizzare le seguenti migliori pratiche:
 - Adottare le corrette pratiche di laboratorio e di igiene di laboratorio.
 - Eseguire le fasi del flusso di lavoro nelle aree di pre-amplificazione o post-amplificazione designate.
 - Conservare i reagenti usati prima di pulire le librerie in un'area di pre-amplificazione.
 - Separare i reagenti di pre-amplificazione da quelli di post-amplificazione.
 - Accertarsi che le aree di pre-amplificazione e di post-amplificazione siano dotate di apparecchiatura dedicata (ad es. pipette, punte per pipette, agitatori e centrifughe).
- Evitare la contaminazione incrociata. Utilizzare punte per pipette nuove fra un campione e l'altro e fra le erogazioni di reagenti. L'utilizzo di punte filtrate riduce il rischio di contaminazione incrociata da carry-over di ampliconi o da campione a campione.
 - Quando si aggiungono o si trasferiscono campioni o miscele master di reagenti, cambiare i puntali tra un campione e l'altro.
 - Quando si aggiungono adattatori indice con una pipetta multicanale, cambiare i puntali ad ogni riga o ad ogni colonna. Se si utilizza una pipetta a singolo canale, cambiare i puntali tra un campione e l'altro.
 - Rimuovere gli adattatori portacelle dell'indice inutilizzati dall'area di lavoro.
- Adottare le seguenti migliori pratiche per le fasi di lavaggio dell'etanolo:
 - Preparare sempre al momento etanolo all'80%. L'etanolo può assorbire acqua dall'aria; questo può influire sui risultati.

Insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- Assicurarsi che tutto l'etanolo venga rimosso dal fondo dei pozzetti durante le fasi di lavaggio. Eventuale etanolo residuo potrebbe influire sui risultati.
- Rispettare il tempo di asciugatura indicato per le fasi del supporto magnetico al fine di garantire che l'evaporazione sia completa. L'etanolo residuo può influire sulle prestazioni delle reazioni successive.
- Preparare sempre le miscele master prima dell'uso e non conservare mai le soluzioni di lavoro combinate.
- Le prestazioni di DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina non sono garantite se non ci si attiene alle procedure indicate nell'insero della confezione.
- Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta del kit.
- Non scambiare i componenti di più kit DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina diversi. I kit sono identificati sull'etichetta del kit.

Note sulla procedura

Raccomandazioni in merito agli input di DNA

Il protocollo del DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è compatibile con input di DNA genomico (gDNA) di qualità elevata, a doppio filamento tra i 50 e i 1.000 ng.

Assicurarsi che il campione di gDNA iniziale non contenga più di 1 mM di EDTA e che sia privo di agenti contaminanti organici, come il fenolo e l'etanolo. Queste sostanze possono influenzare la reazione di tagmentazione e invalidare il saggio.

Input di gDNA \geq 50 ng

Per input di gDNA tra i 50 e i 1.000 ng, non è richiesta la quantificazione e la normalizzazione del campione di gDNA iniziale.

Input di gDNA < 50 ng

Gli input di DNA tra i 10 e i 50 ng possono essere usati con le seguenti modifiche:

- Con input di gDNA tra i 10 e i 49 ng, è consigliabile quantificare il campione di gDNA iniziale per poter stabilire il numero di cicli PCR richiesti dopo la tagmentazione. Usare un sistema con fluorimetro per quantificare gli input di gDNA a doppio filamento. Evitare i sistemi che misurano l'acido nucleico totale, come NanoDrop e altri sistemi di assorbimento dei raggi UV.
- Questo protocollo non normalizza le rese delle librerie pre-arricchite finali tra i 10 e i 49 ng di gDNA, di conseguenza è richiesta la quantificazione e la normalizzazione delle librerie prima e dopo l'arricchimento.
- Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è stato caratterizzato e verificato per input di DNA tra i 50 e i 1.000 ng. Per input di gDNA superiori a 50 ng non sono assicurate prestazioni prodotte equivalenti.

Raccomandazioni in merito agli input di sangue

Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è compatibile con gDNA estratto da sangue intero periferico. È possibile utilizzare qualsiasi metodo di estrazione convalidato. In fase di estrazione di gDNA dal sangue intero, non è richiesta la quantificazione iniziale dell'input di DNA e il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina genera rese della libreria prearricchite normalizzate.

La quantità di DNA ottenuta dai campioni di sangue intero e di conseguenza la normalizzazione della libreria possono essere influenzate negativamente dai seguenti fattori:

- Età del campione di sangue
- Condizioni di conservazione
- Condizioni mediche di base che influenzano la conta dei globuli bianchi

Raccomandazioni in merito all'input di campioni di tessuto

FFPE

Per stabilire l'input adeguato per una buona preparazione delle librerie, usare i seguenti criteri di qualità del DNA da FFPE.

- L'input di DNA consigliato per i campioni di FFPE con un valore $\Delta Cq \leq 5$ è tra i 50 e i 1.000 ng.
- DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina non è raccomandato per campioni FFPE di qualità scarsa con $\Delta Cq > 5$. È possibile utilizzare campioni con $\Delta Cq > 5$, ma potrebbe aumentare la possibilità di preparazioni delle librerie errate e diminuire le prestazioni del saggio.

Estrazione da FFPE

Usare un sistema di isolamento dell'acido nucleico che genera rese ad alto recupero, minimizza il consumo del campione e ne salvaguarda l'integrità. Può essere utilizzato qualunque sistema di estrazione del DNA da campioni di FFPE convalidato. Per l'estrazione di gDNA dal tessuto FFPE, non è richiesta la quantificazione iniziale del DNA input e il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina non genera rese della libreria prearricchite normalizzate.

Qualificazione del DNA da FFPE

Prima dell'uso, il gDNA estratto dal tessuto FFPE deve essere qualificato. Per ottenere prestazioni ottimali, valutare la qualità del campione di DNA con un sistema di estrazione convalidato che esegua la qualificazione del DNA estratto dai campioni FFPE. Il protocollo DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è compatibile con campioni di DNA FFPE con valore ΔCq di ≤ 5 . Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina non è raccomandato per campioni FFPE di qualità scarsa con $\Delta Cq > 5$. È possibile utilizzare campioni con $\Delta Cq > 5$, ma potrebbe aumentare la possibilità di preparazioni delle librerie errate e diminuire le prestazioni del saggio.

Insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

[Facoltativo] Campioni di riferimento FFPE

Durante l'esecuzione del protocollo, utilizzare materiali di riferimento caratterizzati come Horizon HD799 (DNA) come controllo positivo. Possono essere usati come campioni di riferimento anche materiali FFPE qualificati provenienti da xenografie, ottenute dalle linee cellulari. Per quantificare i materiali di riferimento prima dell'uso, usare un sistema con fluorimetro.

NOTA L'esecuzione di un campione di controllo positivo come riferimento o di un controllo senza template provocano un consumo dei reagenti e la riduzione del numero totale di campioni sconosciuti che possono essere elaborati.

Raccomandazioni in merito all'input di campioni

Le raccomandazioni relative all'input di campioni per il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina sono riassunte nella seguente tabella.

Tabella 1 Raccomandazioni in merito all'input di campioni

Tipo di input campione	Quantità di input campione	Quantificazione di input di DNA richiesto	Qualità di input di DNA richiesto	Resa della libreria pre-arricchita normalizzata
gDNA	10-49 ng	Sì	260/280 rapporto di 1,8-2,0	No
gDNA	50-1.000 ng	No	260/280 rapporto di 1,8-2,0	Sì
gDNA dal sangue	50-1.000 ng	No	260/280 rapporto di 1,8-2,0	Sì
gDNA da FFPE	50-1.000 ng	Sì	Valore $\Delta Cq \leq 5$	No

I cicli PCR consigliati per il programma PCR eBLTS vengono regolati a seconda della concentrazione e della qualità dell'input campione. Per maggiori informazioni fare riferimento a [Amplificazione di DNA sottoposto a tagmentazione a pagina 29](#).

Suggerimenti e tecniche

Evitare la contaminazione incrociata

- Quando si aggiungono o si trasferiscono campioni, cambiare i puntali tra *un campione e l'altro*.
- Quando si aggiungono adattatori indice con una pipetta multicanale, cambiare i puntali ad *ogni riga* o ad *ogni colonna*. Se si utilizza una pipetta a singolo canale, cambiare i puntali tra un campione e l'altro.

Sigillatura dalla piastra

- Sigillare sempre la piastra a 96 pozzetti con un nuovo sigillo adesivo utilizzando un rullo di gomma per coprire la piastra prima di passare alle fasi successive del protocollo.
 - Fasi di agitazione
 - Fasi di incubazione. Un'errata o mancata sigillatura della piastra può causare l'evaporazione durante l'incubazione.
 - Fasi della centrifuga
 - Fasi di ibridazione
- Assicurarsi che i bordi e i pozzetti siano completamente sigillati per ridurre il rischio di contaminazione incrociata e di evaporazione.
 - Se si nota la presenza di fluido o condensa sul sigillo o sulle pareti laterali dei pozzetti della piastra, centrifugare secondo esigenza prima di togliere la sigillatura.
- Posizionare la piastra su una superficie piatta prima di rimuovere lentamente la sigillatura.

Manipolazione di Enrichment BLT Small (eBLTS)

- Conservare la provetta di conservazione di eBLTS in posizione verticale in frigorifero, affinché le microsfere siano sempre immerse nel tampone.
- Immediatamente prima dell'uso, agitare accuratamente la provetta di conservazione di eBLTS fino a risospendere le microsfere. Per evitare la risedimentazione delle microsfere, si sconsiglia la centrifugazione prima del pipettaggio.
- Se le microsfere aderiscono al lato o alla parte superiore di una piastra a 96 pozzetti, centrifugare a 280 × g per 3 secondi, quindi pipettare per risospendere.
- Durante il lavaggio di eBLTS:
 - Utilizzare il supporto magnetico adeguato per la piastra.
 - Tenere la piastra sul supporto magnetico finché le istruzioni non specificano di rimuoverla.
 - Se le microsfere vengono aspirate nei puntali delle pipette, erogarle nuovamente sulla piastra collocata sul supporto magnetico e attendere che il liquido diventi chiaro (circa 2 minuti).

Flusso di lavoro di DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina

Il seguente diagramma illustra il flusso di lavoro di DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina. Fra i vari passaggi sono contrassegnati i punti di arresto sicuri. Le stime dei tempi si basano sull'elaborazione di 12 campioni con arricchimento di 12 plex.



Istruzioni per l'uso

Questo capitolo descrive il protocollo del DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina.

- Esaminare il flusso di lavoro di sequenziamento completo previsto, dal campione all'analisi, per assicurare la compatibilità dei prodotti e dei parametri dell'esperimento.
- Prima di procedere, verificare il contenuto del kit e assicurarsi di disporre dei componenti, delle attrezzature e dei materiali necessari.
 - Le sonde biotinilate di terzi devono soddisfare requisiti specifici. Fare riferimento a [Requisiti del pannello sonda di arricchimento a pagina 10](#) per assicurarsi che le sonde di terze parti soddisfino i requisiti.
- Attenersi al protocollo nell'ordine indicato, utilizzando i volumi e i parametri di incubazione specificati.
- Se il protocollo non specifica un punto di arresto sicuro, passare immediatamente al passaggio successivo.
- Quando si crea una miscela master, il volume in eccesso è incluso nei volumi forniti.
- Assicurarsi di utilizzare il supporto magnetico adeguato al tipo di piastra.

Preparazione al raggruppamento in pool

Questo passaggio è necessario per garantire un sequenziamento adeguato delle librerie arricchite. Le librerie possono essere raggruppate in pool prima dell'arricchimento e del sequenziamento.

Prima dell'arricchimento: le librerie singole amplificate e indicizzate vengono raggruppate in pool per essere arricchite con il pannello sonda selezionato. In questo modo si crea un raggruppamento in multiplex di librerie arricchite. L'elaborazione di input di campioni FFPE è stata testata ed è consigliata esclusivamente per reazioni di arricchimento a 1 plex. Con gDNA di qualità elevata, il test è stato eseguito per 12 plex, ma è possibile anche con plex da 2 a 11.

Prima del sequenziamento: le librerie arricchite a 1 plex e/o multiplex vengono raggruppate in pool prima di eseguire il sequenziamento. Il numero di librerie arricchite che possono essere sequenziate dipende dalla profondità di lettura target per ciascun campione nel sistema di sequenziamento.

Doppia indicizzazione univoca

Il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina utilizza indici doppi univoci.

- Le librerie con doppia indicizzazione aggiungono sequenze Index 1 (i7) e Index 2 (i5) per generare librerie marcate univocamente.
- Gli indici univoci doppi (UD) hanno sequenze d'indice distinte e non correlate per la lettura indici i7 e i5. Gli indici hanno una lunghezza di 10 basi.

Selezionando gli adattatori di indice con sequenze diverse per i pool di librerie si ottimizza il bilanciamento del colore per un sequenziamento e un'analisi dei dati soddisfacenti. I pool con numero di plex ≥ 10 plex sono intrinsecamente bilanciati dal punto di vista cromatico, quindi è possibile utilizzare qualsiasi combinazione di

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

adattatori indice. Durante la corsa di sequenziamento, il DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module fornisce opzioni per combinazioni di indici bilanciate in base al colore e avvisa l'utente se la diversità delle combinazioni di indici selezionate è insufficiente.

Per informazioni sulle sequenze adattatori indici UD di Illumina e sui layout delle piastre, fare riferimento all'[Appendice: Sequenze adattatore indici UD di Illumina a pagina 62](#).

Numero di plex di arricchimento supportati

I reagenti di DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina sono configurati e analizzati con plex di arricchimento da 1 e da 12. Sebbene siano possibili altri plex di arricchimento, alcuni richiedono ulteriore preparazione delle librerie pre-arricchimento e reagenti per il pannello sonda di arricchimento.

Ottenere una resa di arricchimento adeguata per un numero di plex di arricchimento non standard potrebbe richiedere un'ottimizzazione ulteriore. Non sono assicurati risultati ottimali.

- **Numero di plex di arricchimento:** il numero di librerie pre-arricchite (da 1 a 12) raggruppate in pool in una reazione di arricchimento per l'ibridazione con i pannelli sonda di arricchimento. Per esempio, la combinazione di 12 librerie pre-arricchite genera un pool di arricchimento a 12 plex.
- **Reazione di arricchimento:** il numero di preparazioni per reazioni di arricchimento uniche, indipendentemente dal numero di librerie pre-arricchite raggruppate in pool per reazione. Per esempio, una singola reazione di arricchimento può generare un pool di arricchimento a 1 o 12 plex.

Per calcolare il numero totale di librerie post-arricchimento, moltiplicare il numero di plex di arricchimento a reazione per il numero di reazioni di arricchimento. Per esempio, una singola reazione di arricchimento di un pool di arricchimento a 12 plex genera un pool da 12 librerie post-arricchimento.

In fase di raggruppamento in pool delle librerie pre-arricchite, i reagenti di DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina forniscono le seguenti reazioni di arricchimento e numero di plex.

Reagenti di DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina	Reazioni di arricchimento	Numero di plex di arricchimento
Kit da 16 campioni	16 reazioni	1 plex
Kit da 96 campioni	8 reazioni	12 plex

Strategie di raggruppamento in pool con sequenziamento da due a otto plex

La tabella seguente mostra gli adattatori indice (pozzetti) che possono essere combinati in un pool da 2 a 8 plex, mentre lo schema a colori illustra ciascuna combinazione secondo un codice.

Raggruppare in pool qualunque numero di plex ≥ 2 dall'alto o dal basso di una colonna. Non raggruppare in pool in modo trasversale a una riga.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Numero di plex	Combinazioni	Colore nello schema
2	I primi due o gli ultimi due pozzetti di una colonna: <ul style="list-style-type: none"> • A e B • G e H Le righe da C a F non vengono usate.	Arancione
3	I primi tre o gli ultimi tre pozzetti di una colonna: <ul style="list-style-type: none"> • A-C • F-H Le righe D e E non vengono usate.	Grigio
4	I primi quattro o gli ultimi quattro pozzetti di una colonna: <ul style="list-style-type: none"> • A-D • E-H 	Viola
5	I primi cinque o gli ultimi cinque pozzetti di una colonna: <ul style="list-style-type: none"> • A-E • D-H 	Blu
6	[Opzione 1] I primi sei o gli ultimi sei pozzetti di una colonna: <ul style="list-style-type: none"> • A-F • C-H [Opzione 2] I primi due pozzetti (A e B) o gli ultimi due pozzetti (G e H) di una colonna e quattro pozzetti qualunque di una colonna adiacente.	Verde
7	I primi sette o gli ultimi sette pozzetti di una colonna: <ul style="list-style-type: none"> • A-G • B-H 	Rosa
8	Tutta la colonna.	Azzurro

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Materiali di consumo

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (tappo giallo)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Acqua priva di nucleasi
- Piastra PCR a 96 pozzetti
- Sigillo adesivo
- Provette per microcentrifuga da 1,7 ml
- Striscia a 8 provette
- Punte per pipette
 - Pipette multicanale da 200 µl



ATTENZIONE

Questo set di reagenti contiene materiali chimici potenzialmente pericolosi. L'inalazione, l'ingestione, il contatto con la pelle o con gli occhi possono causare lesioni personali. Indossare l'attrezzatura protettiva, inclusi protezione per gli occhi, guanti e indumento da laboratorio appropriato per evitare i rischi di esposizione. Manipolare i reagenti usati come rifiuti chimici e smaltirli in base alle leggi e alle regolamentazioni applicabili a livello regionale, nazionale e locale. Per ulteriori informazioni sulle considerazioni ambientali, sulla sicurezza e sulla salute, fare riferimento alle schede dei dati di sicurezza (SDS) alla pagina Web support.illumina.com/sds.html.

Informazioni sui reagenti

- eBLTS deve essere conservato a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C. Non utilizzare l'eBLTS se è stato conservato a una temperatura inferiore a 2 °C.
- Non centrifugare l'eBLTS.

Preparazione

1. Preparare i seguenti materiali di consumo:

Item	Conservazione	Istruzioni
eBLTS (tappo giallo)	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente. Miscelare con un vortex appena prima dell'uso. Non centrifugare prima del pipettamento.
TB1	Tra -25 °C e -15 °C	Portare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare.

2. Utilizzare un vortex o pipettare il DNA, quindi centrifugare brevemente.
3. Salvare il seguente programma TAG sul ciclatore termico:
 - Scegliere l'opzione con coperchio pre-riscaldato e impostare la temperatura su 100 °C

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- Impostare il volume di reazione a 50 µl
- 55 °C per 5 minuti
- Mantenere la temperatura a 10 °C

Procedura

1. Aggiungere 2-30 µl di DNA a ciascun pozzetto di una piastra PCR a 96 pozzetti, in modo da ottenere una quantità di input totale tra i 50 e i 1.000 ng.
Se il volume del DNA è inferiore a 30 µl, aggiungere acqua priva di nucleasi ai campioni di DNA per ottenere un volume totale di 30 µl.
2. Agitare accuratamente la provetta di eBLTS fino a risospendere completamente le microsferi.
3. Combinare i seguenti volumi in una provetta per preparare il Tagmentation Master Mix. Moltiplicare ciascun volume per il numero di campioni elaborati.
 - eBLTS (11,5 µl)
 - TB1 (11,5 µl)Nel volume è compreso il reagente in eccesso.
4. Pipettare accuratamente il Tagmentation Master Mix per miscelarlo.
5. Dividere il volume del Tagmentation Master Mix in una striscia a 8 provette in egual misura.
6. Utilizzando una pipetta multicanale da 200 µl, trasferire 20 µl di Tagmentation Master Mix in ogni pozzetto della piastra PCR contenente un campione. Usare punte pulite per ogni colonna o riga del campione.
7. Dopo aver erogato il Tagmentation Master Mix, eliminare la striscia a 8 provette.
8. Usando una pipetta impostata da 200 µl su 40 µl, miscelare ogni campione 10 volte. Usare punte pulite per ogni colonna del campione.
In alternativa, sigillare la piastra PCR e usare uno shaker per piastra a 1.600 giri/min per 1 minuto.
9. Sigillare la piastra, quindi posizionarla su un ciclatore termico pre-programmato ed eseguire il programma TAG.
10. Attendere che il programma TAG abbia raggiunto la temperatura di mantenimento di 10 °C, quindi rimuovere immediatamente la piastra.
11. Lasciare la piastra PCR a 96 pozzetti a temperatura ambiente per 2 minuti, quindi passare alla fase successiva.

Pulizia in seguito alla tagmentazione

Questo passaggio lava il DNA marcato con adattatori su eBLTS prima dell'amplificazione mediante PCR.

Materiali di consumo

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- Supporto magnetico per piastra PCR a 96 pozzetti
- Sigillo adesivo
- Striscia a 8 provette
- Punte per pipette
 - Pipette multicanale da 20 µl
 - Pipette multicanale da 200 µl
- Preparazione per procedure successive:
 - EPM (Enhanced PCR Mix)
 - Adattatore portacelle dell'indice

Informazioni sui reagenti

- Assicurarsi di utilizzare il supporto magnetico adeguato alla propria piastra. L'uso di un supporto magnetico per piastra MIDI su una piastra PCR potrebbe evitare l'adesione del TWB2 alle microsfere.
- Pipettare TWB2 lentamente per ridurre al minimo la formazione di schiuma, per evitare l'aspirazione di volumi errati e una miscelazione incompleta.

Preparazione

1. Preparare i seguenti materiali di consumo:

Item	Conservazione	Istruzioni
EPM	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare sul ghiaccio per 1 ora. Capovolgere per miscelare, quindi centrifugare brevemente.
ST2	Tra 15 °C e 30 °C	Se si osservano precipitati, riscaldare a 37 °C per 10 minuti, quindi agitare con il vortex fino alla dissoluzione dei precipitati. Utilizzare a temperatura ambiente.
TWB2	Tra 15 °C e 30 °C	Utilizzare a temperatura ambiente.
Adattatore portacelle dell'indice	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente per 30 minuti.

Procedura

1. Aggiungere 10 µl di ST2 a ciascuna reazione di tagmentazione. Se si usa una pipetta multicanale, pipettare la ST2 un una striscia a 8 provette, quindi trasferire i volumi adeguati alla piastra PCR. Usare punte pulite per ogni colonna o riga del campione.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

2. Per risospendere le microsfere, con una pipetta da 200 µl impostata su 50 µl pipettare lentamente ogni pozzetto 10 volte.
In alternativa, sigillare la piastra e agitare a 1.600 giri/min per 1 minuto. Ripetere se necessario.
3. Sigillare la piastra, quindi centrifugare a 280 × g per 10 secondi.
4. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
5. Posizionare sul supporto magnetico della piastra PCR e attendere che il liquido diventi trasparente (3 minuti).
6. [≤ 48 campioni] Lavare tre volte come indicato di seguito.
 - a. Con una pipetta multicanale da 200 µl impostata su 60 µl, rimuovere ed eliminare il surnatante senza alterare il pellet di microsfere.
 - b. Rimuovere dal supporto magnetico.
 - c. Subito dopo, aggiungere lentamente 100 µl di TWB2 direttamente sulle microsfere.
 - d. Pipettare lentamente fino a completa risospensione delle microsfere. In alternativa, sigillare la piastra e agitare a 1.600 giri/min per 1 minuto.
 - e. In caso di spruzzi, ridurre la velocità a 280 × g per 10 secondi.
 - f. Posizionare sul supporto magnetico della piastra PCR e attendere che il liquido diventi trasparente (3 minuti).
Lasciare la piastra sul supporto magnetico e il TWB2 nei pozzetti per evitare un'eccessiva asciugatura durante il terzo lavaggio. Una volta preparato il PCR Master Mix, rimuovere ed eliminare il surnatante.
 - g. Con una pipetta multicanale da 200 µl impostata su 100 µl, rimuovere ed eliminare il surnatante.
 - h. Ripetere i passaggi da c a f due volte, fino a un totale di tre lavaggi.
7. [> 48 campioni] Lavare tre volte come indicato di seguito.
 - a. Per evitare un'asciugatura eccessiva, eseguire i passaggi b e c con incrementi da una colonna a due colonne fino ad eseguire tutte le colonne.
 - b. Con una pipetta multicanale da 200 µl impostata su 60 µl, rimuovere ed eliminare il surnatante.
 - c. Rimuovere dal supporto magnetico.
 - d. Subito dopo, dispensare lentamente 100 µl di TWB2 direttamente sulle microsfere.
 - e. Pipettare lentamente fino a completa risospensione delle microsfere. In alternativa, sigillare la piastra e agitare a 1.600 giri/min per 1 minuto.
 - f. In caso di spruzzi, ridurre la velocità a 280 × g per 10 secondi.
 - g. Posizionare sul supporto magnetico della piastra PCR e attendere che il liquido diventi trasparente (3 minuti).
Lasciare la piastra sul supporto magnetico e il TWB2 nei pozzetti per evitare un'eccessiva asciugatura durante il terzo lavaggio. Una volta preparato il PCR Master Mix, rimuovere ed eliminare il surnatante.
 - h. Con una pipetta multicanale da 200 µl impostata su 100 µl, rimuovere ed eliminare il surnatante.
 - i. Rimuovere dal supporto magnetico e aggiungere lentamente 100 µl di TWB2 direttamente sulle microsfere.

- j. Ripetere i passaggi h e i con incrementi da una o due colonne fino a eseguire tutte le colonne.
 - k. Ripetere i passaggi da e ad h due volte, fino a un totale di tre lavaggi.
8. Mantenere sul supporto magnetico fino ad arrivare al passaggio 4 della sezione *Procedura in Amplificazione di DNA sottoposto a tagmentazione*.
- Il TWB2 rimane nei pozzetti per evitare che le microsfere si asciughino troppo.

Amplificazione di DNA sottoposto a tagmentazione

Questa fase amplifica il DNA sottoposto a tagmentazione mediante un programma di PCR a ciclo limitato. La fase della PCR aggiunge gli adattatori Index 1 (i7) (Indice 1 - i7), gli adattatori Index 2 (i5) (Indice 2 - i5) e le sequenze richieste per la generazione di cluster per il sequenziamento.

Materiali di consumo

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- Adattatore portacelle dell'indice
- Piastra PCR a 96 pozzetti
- Acqua priva di nucleasi
- Sigillo adesivo
- Provette per microcentrifuga da 1,5 ml
- Punte per pipette
 - Pipette multicanale da 20 µl
 - Pipette multicanale da 200 µl

Informazioni sui reagenti

- Adattatori portacelle dell'indice
 - Un pozzetto può contenere adattatori dell'indice per più di 10 µl.
 - Non aggiungere campioni all'adattatore portacelle dell'indice.
 - Ciascun pozzetto della piastra dell'indice è esclusivamente monouso.

Preparazione

1. Preparare i seguenti materiali di consumo:

Item	Conservazione	Istruzioni
EPM	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a 4 °C o su ghiaccio per 1 ora. Capovolgere per miscelare, quindi centrifugare brevemente.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Item	Conservazione	Istruzioni
Adattatore portacelle dell'indice	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente per 30 minuti.

2. Salvare il seguente programma PCR eBLTS su un ciclatore termico usando il numero adeguato di cicli PCR indicati nella tabella sottostante.
 - Scegliere l'opzione con coperchio pre-riscaldato e impostare la temperatura su 100 °C
 - Impostare il volume di reazione a 50 µl
 - 72 °C per 3 minuti
 - 98 °C per 3 minuti
 - X cicli di:
 - 98 °C per 20 secondi
 - 60 °C per 30 secondi
 - 72 °C per 1 minuto
 - 72 °C per 3 minuti
 - Mantenere la temperatura a 10 °C

La durata totale della corsa è approssimativamente 38 minuti per 9 cicli e approssimativamente 46 minuti per 12 cicli.

Tipo di input campione	Numero di cicli di PCR (X)
10-49 ng di gDNA	12
50-1.000 ng di gDNA	9
50-1.000 ng di gDNA estratto da tessuto FFPE	12
gDNA estratto dal sangue	9

Procedura

1. Combinare quanto segue per preparare il PCR Master Mix. Moltiplicare ciascun volume per il numero di campioni elaborati.
 - EPM (23 µl)
 - Acqua priva di nucleasi (23 µl)Nel volume è compreso il reagente in eccesso.
2. Pipettare il PCR Master Mix 10 volte per miscelare, quindi centrifugare brevemente.
3. Mantenendo la piastra sul supporto magnetico, usare una pipetta multicanale da 200 µl per rimuovere ed eliminare TWB2.

La presenza di schiuma sulle pareti dei pozzetti non incide negativamente sulla libreria.
4. Rimuovere dal supporto magnetico.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

5. Aggiungere immediatamente 40 µl di PCR Master Mix direttamente nelle microsfere in ciascun pozzetto.
6. Miscelare immediatamente con la pipetta fino a completa risospensione delle microsfere. In alternativa, sigillare la piastra e agitare a 1.600 giri/min per 1 minuto.
7. Sigillare la piastra campioni e centrifugare a 280 × g per 10 secondi.
8. Centrifugare l'adattatore portacelle dell'indice a 1.000 × g per 1 minuto.
9. Preparare l'adattatore portacelle dell'indice
 - [Meno di 96 campioni] Per ciascun pozzetto, forare il sigillo in alluminio sull'adattatore portacelle dell'indice con la punta di una nuova pipetta solo per il numero di campioni analizzati.
 - [96 campioni] Allineare una piastra PCR semiskirted nuova sull'adattatore portacelle dell'indice e premere fino a forare il sigillo in alluminio. Eliminare la piastra PCR usata per forare il sigillo in alluminio.
10. Con l'aiuto della punta di una pipetta nuova, aggiungere 10 µl di adattatori indice preaccoppiati a ciascun pozzetto.
11. Usando una pipetta impostata su 40 µl, miscelare 10 volte. In alternativa, sigillare la piastra e agitare a 1.600 giri/min per 1 minuto.
12. Sigillare la piastra, quindi centrifugare a 280 × g per 10 secondi.
13. Posizionare sul ciclatore termico ed eseguire il programma PCR eBLTS.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

Pulizia delle librerie

In questa fase, per purificare le librerie amplificate viene eseguita la doppia purificazione delle microsfere.

Materiali di consumo

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Etanolo all'80% preparato al momento (EtOH)
- Piastra di conservazione con 96 pozzetti profondi in polipropilene da 0,8 ml (piastra MIDI)
- Piastra PCR a 96 pozzetti
- Supporto magnetico per piastra MIDI
- Supporto magnetico per piastra PCR
- Provette per microcentrifuga da 1,5 ml
- Acqua priva di nucleasi

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Informazioni sui reagenti

- Cleanup Beads
 - Agitare con un vortex prima di ogni utilizzo.
 - Agitare frequentemente con un vortex per assicurarsi che le microsfere si distribuiscano in modo regolare.
 - Aspirare e dispensare lentamente poiché la soluzione è viscosa.

Preparazione

1. Preparare i seguenti materiali di consumo:

Item	Conservazione	Istruzioni
CB	Temperatura ambiente	Utilizzare un vortex e capovolgere per mescolare fino a quando il colore del liquido diventi omogeneo.
RSB	Tra 2 °C a 8 °C	Scongelare a temperatura ambiente per 30 minuti. Utilizzare un vortex per miscelare.

Procedura

1. Agitare la piastra PCR a 96 pozzetti a 1.800 giri/min per 1 minuto, quindi centrifugare brevemente.
2. Posizionare sul supporto magnetico per piastra PCR e attendere che il liquido diventi trasparente (1 minuto).
3. Agitare il CB con un vortex tre volte per 10 secondi, quindi capovolgere più volte per risospendere.
4. Con gDNA di qualità elevata, seguire i passaggi illustrati.
 - a. Aggiungere 77 µl di acqua priva di nucleasi a ciascun pozzetto di una nuova piastra MIDI.
 - b. Aggiungere 88 µl di CB a ciascun pozzetto della piastra MIDI.
 - c. Trasferire 45 µl di surnatante da ciascun pozzetto della piastra PCR al pozzetto corrispondente della piastra MIDI.
 - d. Eliminare la piastra PCR.
 - e. Pipettare ogni pozzetto 10 volte per miscelare. In alternativa, sigillare la piastra e agitare a 1.800 giri/min per 1 minuto.
 - f. Sigillare la piastra e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
 - g. Verificare la presenza bolle d'aria. Se presenti, diminuire la velocità.
 - h. Posizionare sul supporto magnetico per piastra MIDI e attendere che il liquido diventi trasparente (5 minuti).
 - i. Durante l'incubazione, agitare in modo energico il CB con un vortex, quindi aggiungere 20 µl a ciascun pozzetto di una nuova piastra MIDI.
 - j. Trasferire 200 µl di surnatante da ciascun pozzetto della prima piastra MIDI al pozzetto corrispondente della nuova piastra MIDI (contenente 20 µl di CB).
 - k. Eliminare la prima piastra MIDI.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- I. Pipettare ogni pozzetto della nuova piastra MIDI 10 volte per miscelare. In alternativa, sigillare la piastra e agitare a 1.800 giri/min per 1 minuto.
5. Con il tessuto FFPE, seguire i passaggi illustrati.
 - a. Aggiungere 81 µl di CB a ciascun pozzetto di una nuova piastra MIDI.
 - b. Trasferire 45 µl di surnatante da ciascun pozzetto dalla piastra PCR al pozzetto corrispondente della piastra MIDI.
 - c. Eliminare la piastra PCR.
 - d. Pipettare ogni pozzetto 10 volte per miscelare. In alternativa, sigillare la piastra e agitare a 1.800 giri/min per 1 minuto.
6. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
7. Verificare la presenza bolle d'aria. Se presenti, diminuire la velocità.
8. Posizionare sul supporto magnetico per piastra MIDI e attendere che il liquido diventi trasparente (5 minuti).
9. Rimuovere ed eliminare il surnatante senza alterare le microsfere.
10. Lavare le microsfere come descritto di seguito.
 - a. Mantenendo la piastra sul supporto magnetico, aggiungere 200 µl di etanolo all'80% preparato al momento senza mescolare.
 - b. Incubare per 30 secondi.
 - c. Rimuovere ed eliminare il surnatante senza alterare le microsfere.
11. Lavare le microsfere una **seconda** volta.
12. Asciugare all'aria sul supporto magnetico per 5 minuti.
13. Durante la fase di asciugatura ad aria, con una pipetta da 20 µl, rimuovere ed eliminare l'etanolo residuo.
14. Rimuovere dal supporto magnetico.
15. Aggiungere 17 µl di RSB alle microsfere.
16. Sigillare la piastra e agitare a 1.800 giri/min per 2 minuti.
17. Incubare a temperatura ambiente per 2 minuti.
18. Verificare la presenza bolle d'aria. Se presenti, diminuire la velocità.
19. Posizionare sul supporto magnetico per piastra MIDI e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).
20. Trasferire 15 µl di surnatante in una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra e conservare a una temperatura compresa tra -25 °C e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

Pool di librerie pre-arricchimento

Questa fase combina le librerie di DNA con indici univoci in un pool di 12 librerie al massimo.

Inserito della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Metodi di raggruppamento in pool

È possibile raggruppare in pool per volume o massa. Per stabilire il metodo appropriato per il proprio input, usare la tabella seguente.

Tabella 2 Metodi di raggruppamento in pool consigliati

Input di campione	Metodo di raggruppamento in pool
10-49 ng di gDNA	Massa
50-1.000 ng di gDNA	Volume
gDNA estratto da FFPE	Massa
gDNA estratto dal sangue	Volume

- Per l'arricchimento a un plex non è richiesto il raggruppamento in pool di librerie pre-arricchite. Tuttavia, può essere necessario aggiungere RSB.
- Dopo la quantificazione delle librerie pre-arricchite, è possibile raggruppare in pool tutti i tipi di input di campione per massa, al fine di ottenere un ottimo bilanciamento dell'indice.
- La resa finale delle librerie pre-arricchite generata in preparazioni sperimentali diverse può variare. Per questo, per ottenere un bilanciamento dell'indice ottimale è consigliabile raggruppare in pool per massa.
- Usare un arricchimento a un plex nelle seguenti situazioni.
 - 10-49 ng di gDNA
 - 50-1.000 ng di gDNA estratto da tessuto FFPE
 - Rilevamento di una bassa frequenza dell'allele minore per identificazioni di varianti somatiche.

Raggruppamento in pool per massa

Nelle seguenti situazioni, quantificare le librerie per usare una massa di DNA per libreria da arricchire come specificato in [Librerie raggruppate in pool pre-arricchimento a concentrazioni pari a pagina 35](#).

- 10-49 ng di input campione di gDNA
- 50-1.000 ng di gDNA estratto da input campione FFPE
- Rilevamento di una bassa frequenza dell'allele minore per identificazioni di varianti somatiche
- gDNA estratto dal sangue per un bilanciamento dell'indice ottimale

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Quantificazione delle librerie pre-arricchite

1. Eseguire 1 µl delle librerie pre-arricchite secondo il proprio metodo di quantificazione a base fluorescente con un colorante intercalante dsDNA.
 - Con gDNA di qualità elevata da 50 a 1.000 ng, è prevista una resa della libreria pre-arricchita ≥ 500 ng.
 - Con gDNA estratto da FFPE da 50 a 1.000 ng, è prevista una resa della libreria pre-arricchita tra i 500 e i 6.000 ng, a seconda della qualità del campione iniziale.

NOTA Per sistemi di quantificazione con distorsioni diverse, qualificare il sistema di quantificazione per questo flusso di lavoro. I risultati della concentrazione possono essere diversi a seconda del metodo utilizzato.

Librerie raggruppate in pool pre-arricchimento a concentrazioni pari

Usare la tabella seguente per stabilire la massa del DNA per le librerie da arricchire, a seconda del tipo di campione e del numero di plex di arricchimento. Se si usano rese di librerie pre-arricchite inferiori rispetto a quelle consigliate, non sono assicurate delle rese di arricchimento e delle prestazioni del saggio ottimali.

La massa totale del DNA nella reazione di arricchimento non dovrebbe superare i 6.000 ng.

Input di campione	Numero di plex di arricchimento	Massa del DNA per libreria (ng)	Massa totale della libreria di DNA (ng)
gDNA di qualità elevata	12	250-500	3.000-6.000
gDNA estratto da FFPE	1	200	200

1. Registrare gli indici delle librerie che si intende raggruppare in pool in questa fase.
2. Basandosi sulla concentrazione di ciascuna libreria, calcolare il volume che è necessario aggiungere alla reazione di arricchimento per ottenere la massa di DNA richiesta.
 - gDNA di qualità elevata: calcolare il volume della libreria necessaria per input da 250-500 ng.
 - gDNA estratto da FFPE: calcolare il volume della libreria richiesto per 200 ng di input.
3. Aggiungere il volume calcolato per ciascuna libreria nello stesso pozzetto della piastra PCR.
4. Se si usa gDNA di qualità elevata, eseguire una delle seguenti operazioni a seconda del volume totale delle librerie pre-arricchite raggruppate in pool.
 - Se il volume delle librerie pre-arricchite è pari a 30 µl, passare all'[Ibridazione delle sonde a pagina 37](#).
 - Se il volume delle librerie pre-arricchite è inferiore a 30 µl, aggiungere RSB per arrivare a un volume totale di 30 µl.
 - Se il volume delle librerie pre-arricchite è maggiore di 30 µl, usare un metodo basato sulle microsfere o un concentratore di vuoto per concentrare il campione raggruppato in pool. Per ottenere un volume totale di 30 µl, aggiungere RSB al campione concentrato raggruppato in pool.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

5. Se si usa gDNA estratto da FFPE, eseguire una delle seguenti operazioni a seconda del volume totale delle librerie pre-arricchite raggruppate in pool.
- Se in volume delle librerie pre-arricchite è pari a 7,5 µl, passare all'[Ibridazione delle sonde a pagina 37](#).
 - Se il volume delle librerie pre-arricchite è inferiore a 7,5 µl, aggiungere RSB per arrivare a un volume totale di 7,5 µl.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra e conservare a una temperatura compresa tra -25 e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

Raggruppamento in pool per volume

Quando l'input è tra i 50 e i 1.000 ng di gDNA, non viene richiesta la quantificazione e la normalizzazione delle singole librerie generate nello stesso esperimento.

Per ottenere una prestazione ottimale, raggruppare in pool esclusivamente campioni di librerie pre-arricchite provenienti dallo stesso utente, lotto di reagente e adattatore portacelle dell'indice.

1. Registrare gli indici delle librerie che si intende raggruppare in pool in questa fase.
2. Combinare i seguenti volumi libreria pre-arricchita e RSB per il proprio numero di plex di arricchimento nello stesso pozzetto di una piastra PCR nuova.
Il volume risultante è 30 µl.

Numero di plex di arricchimento*	Ciascun volume libreria pre-arricchita (µl)	Volume di RSB (µl)
1 plex	14	16
2 plex	14	2
3 plex	10	0
4 plex	7,5	0
5 plex	6	0
6 plex	5	0
7 plex	4,2	0,6
8 plex	3,7	0,4
9 plex	3,3	0,3
10 plex	3	0
11 plex	2,7	0,3
12 plex	2,5	0

* Per informazioni su plex non standard (da 2 a 11 plex), vedere [Limiti della procedura a pagina 2](#).

Insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra e conservare a una temperatura compresa tra -25 e -15 °C per un massimo di 30 giorni.

[Facoltativo] Qualificazione delle librerie pre-arricchite

Se si esegue un raggruppamento in pool per volume, per quantificare le librerie pre-arricchite usare un metodo con fluorimetro con colorante intercalante dsDNA. Per la qualificazione delle librerie pre-arricchite, usare un analizzatore di frammenti di DNA con il kit di analisi dei frammenti adeguato.

Per la qualificazione della libreria, usare in totale 1 µl. Le librerie pre-arricchite sono abbastanza concentrate da permettere di eseguire piccole diluizioni per la quantificazione o l'analisi dei frammenti.

Ibridazione delle sonde

Questa fase lega le regioni target del DNA con sonde di cattura.

I reagenti del DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina sono compatibili sia con i pannelli oligonucleotidi DNA di arricchimento di Illumina che con quelli di terze parti. Per informazioni sulle specifiche richieste per pannelli di terze parti, vedere [Requisiti del pannello sonda di arricchimento a pagina 10](#).

Materiali di consumo

- EHB2 (Enrichment Hyb Buffer 2)
- NHB2 (HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers) (tappo blu)
- Pannello sonda di arricchimento
- Piastra PCR a 96 pozzetti
- Sigillo adesivo
- Preparazione per procedure successive:
 - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
 - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (tappo ambra)

Informazioni sui reagenti

- Il reagente NHB2 precipita e si separa durante la conservazione.
- Il pannello sonda di arricchimento si riferisce al pannello oligonucleotide di arricchimento di Illumina o di un fornitore terzo.

Preparazione

1. Preparare i seguenti materiali di consumo:

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Item	Conservazione	Istruzioni
EHB2	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare. Se si osservano cristalli o un aspetto torbido, agitare nuovamente con il vortex o pipettare su e giù per miscelare fino a che la soluzione non diventi trasparente.
Pannello sonda di arricchimento	Da -25 °C a -15 °C (Illumina)	Per pannelli Illumina e di terze parti, portare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare.
NHB2 (tappo blu)	Tra -25 °C e -15 °C	Scongelare a temperatura ambiente. Raggiunta la temperatura ambiente, preriscaldare in un incubatore per microcampioni alla stessa temperatura della sonda in uso per 5 minuti. Per ottenere la risospensione, agitare con un vortex alla massima velocità tre volte, ciascuna per 10 secondi. Centrifugare brevemente. Pipettare su e giù dal fondo della provetta. Se si osservano cristalli o un aspetto torbido, agitare nuovamente con il vortex o pipettare su e giù per miscelare fino a che la soluzione non diventi trasparente. Usare quando è caldo per evitare che le precipitazioni si riformino.
SMB3*	Tra 2 °C e 8 °C	Se si passa alla procedura successiva subito dopo l'attesa di 90 minuti nel programma HYB, raggiungere la temperatura ambiente almeno 2 ore prima di avviare il programma HYB.
EEW* (provetta ambra)	Tra -25 °C e -15 °C	Se si passa alla procedura successiva subito dopo l'attesa di 90 minuti nel programma HYB, raggiungere la temperatura ambiente almeno 2 ore prima di avviare il programma HYB. Raggiunta la temperatura ambiente, preriscaldare in un incubatore per microcampioni alla temperatura di ibridazione e cattura richiesta per 30 minuti prima della fine del programma HYB.

* Nel caso si esegua un arresto prima della procedura successiva, rimandare la preparazione di questo reagente fino a quando non venga raggiunta tale procedura.

Insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

2. Salvare il seguente programma HYB sul ciclatore termico usando il numero adeguato di cicli, elencati nella [Tabella 3](#).
 - Scegliere l'opzione con coperchio pre-riscaldato e impostare la temperatura su 100 °C
 - Impostare il volume di reazione
 - [gDNA di qualità elevata] 100 µl
 - [gDNA estratto da FFPE] 25 µl
 - 98 °C per 5 minuti
 - X cicli di 1 minuto ciascuno, temperatura di inizio di 98 °C per il primo ciclo che poi diminuisce di 2 °C per ciclo
 - Attendere per 90 minuti alla temperatura richiesta:
 - [gDNA estratto da FFPE] 58 °C
 - [Pannelli sonda da 80 mer] 58 °C
 - [Identificazioni di varianti somatiche] 58 °C
 - [Tutti gli altri] 62 °C

Il tempo di esecuzione totale è approssimativamente di 115 minuti.

Tabella 3 Numero di cicli per campione o pannello

Tipo di campione e pannello	Numero di cicli (X)
gDNA estratto da FFPE (qualunque sia il tipo di pannello)	20
Pannelli sonda da 80 mer (qualunque sia il tipo di campione)	20
Identificazioni di varianti somatiche	20
Tutti gli altri campioni e pannelli	18

Procedura

1. [gDNA di qualità elevata] Aggiungere i seguenti reagenti *nell'ordine elencato* a ogni libreria raggruppata in pool nella piastra PCR.

Non creare una miscela master. La creazione di una miscela master di NHB2 e EHB2 ha effetti negativi sull'arricchimento.

 - NHB2 (tappo blu) (50 µl)
 - Pannello sonda di arricchimento (10 µl)
 - EHB2 (10 µl)
2. [gDNA di qualità elevata] Con una pipetta impostata su 90 µl, pipettare ciascun pozzetto 10 volte per miscelare.
3. [gDNA estratto da FFPE] Aggiungere i seguenti reagenti *nell'ordine elencato* a ogni libreria raggruppata in pool nella piastra PCR.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Non creare una miscela master. La creazione di una miscela master di NHB2 e EHB2 ha effetti negativi sull'arricchimento.

- NHB2 (tappo blu) (12,5 µl)
 - Pannello sonda di arricchimento (2,5 µl)
 - EHB2 (2,5 µl)
4. **[gDNA estratto da FFPE]** Con una pipetta impostata su 20 µl, pipettare ciascun pozzetto 10 volte per miscelare.
 5. Sigillare la piastra e centrifugare a 280 × g per 10 secondi.
 6. Posizionare la piastra campioni sul ciclatore termico preprogrammato ed eseguire il programma HYB.
 7. Quando termina l'intervallo di mantenimento della temperatura del programma HYB, passare subito alla procedura successiva.



ATTENZIONE

Se la temperatura della reazione di ibridazione scende al di sotto della temperatura ambiente, si verifica la precipitazione.

Cattura delle sonde ibridate

Questa fase utilizza Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) per catturare le sonde ibridate sulle regioni di interesse target.

Materiali di consumo

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (tappo ambra)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- Provetta per microcentrifuga da 1,5 ml
- Piastra MIDI a 96 pozzetti
- Piastra PCR a 96 pozzetti
- Sigillo adesivo
- Supporto magnetico per piastra MIDI
- Preparazione per procedure successive:
 - Enhanced PCR Mix (EPM)
 - PCR Primer Cocktail (PPC)

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Informazioni sui reagenti

- EEW
 - Assicurarsi che il reagente EEW sia stato scongelato a temperatura ambiente per almeno 2 ore prima di preriscaldarlo in un incubatore per microcampioni.
 - Assicurarsi che il reagente EEW sia stato preriscaldato in un incubatore per microcampioni per 30 minuti prima della fine del programma HYB.
 - Se non in uso, lasciare il reagente EEW nell'incubatore per microcampioni. Il reagente EEW dovrebbe rimanere riscaldato per tutta la durata del protocollo.
 - Dopo aver raggiunto la temperatura ambiente potrebbe presentarsi torbido.
 - Potrebbe presentarsi giallo.
- SMB3
 - Prema dell'uso, il reagente SMB3 deve essere a temperatura ambiente.

Preparazione

1. Preparare i seguenti materiali di consumo.

Item	Conservazione	Istruzioni
SMB3	Tra 2 °C e 8 °C	Lasciare riposare per 2 ore perché raggiunga la temperatura ambiente. Capovolgere e agitare con un vortex fino a completa risospensione.
EEW (provetta ambra)	Tra -25 °C e -15 °C	Dopo un'incubazione a temperatura ambiente di 2 ore, preriscaldare in un incubatore per microcampioni alla temperatura di ibridazione e cattura richiesta per 30 minuti prima della fine del programma HYB.
EE1	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente, quindi agitare con un vortex.
HP3	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente, quindi agitare con un vortex.
ET2	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare.
EPM	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare sul ghiaccio per 1 ora. Capovolgere per miscelare, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte su ghiaccio.
PPC	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare sul ghiaccio per 1 ora. Utilizzare un vortex per miscelare, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte su ghiaccio.

2. Preriscaldare un incubatore per microcampioni con un inserto blocco di riscaldamento MIDI per incubare la piastra campioni e una delle temperature seguenti. Per preriscaldare il reagente EEW, è possibile utilizzare un secondo incubatore per microcampioni. Far riposare il reagente EEW sopra l'inserto blocco di riscaldamento MIDI.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- [FFPE] 58 °C
- [80 mer per pannelli sonda] 58 °C
- [Identificazioni di varianti somatiche] 58 °C
- [Tutti gli altri] 62 °C

Procedura

Cattura

1. Aggiungere SMB3 al pozzetto corrispondente di una nuova piastra MIDI come indicato di seguito.
 - **[gDNA di qualità elevata]** Aggiungere 250 µl di SMB3.
 - **[gDNA estratto da FFPE]** Aggiungere 62,5 µl di SMB3.
2. Con una pipetta impostata a 100 µl per gDNA di qualità elevata o a 25 µl per FFPE, trasferire ciascuna libreria raggruppata in pool dalla piastra PCR a 96 pozzetti al pozzetto corrispondente della nuova piastra MIDI.
3. Sigillare la piastra e agitare a 1.200 giri/min per 4 minuti.
4. In caso di spruzzi, centrifugare brevemente la piastra.
5. Posizionare la piastra delle librerie raggruppate in pool sull'inserto blocco di riscaldamento MIDI nell'incubatore per microcampioni, sotto alla provetta EEW, chiudere il coperchio, quindi incubare per 15 minuti alla temperatura richiesta:
 - [FFPE] 58 °C
 - [Pannello sonda da 80 mer] 58 °C
 - [Identificazioni di varianti somatiche] 58 °C
 - [Tutti gli altri] 62 °C
6. Rimuovere la piastra librerie raggruppate in pool e centrifugare a 280 × g per 30 secondi.
7. Posizionare immediatamente su un supporto magnetico per piastra MIDI e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).
8. **[gDNA di qualità elevata]** Usare una pipetta impostata su 200 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto senza alterare il pellet di microsferi.
9. **[gDNA estratto da FFPE]** Usare una pipetta impostata su 90 µl per rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto senza alterare il pellet di microsferi.
10. Rimuovere e smaltire tutto il surnatante residuo.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Lavaggio

1. Rimuovere dal supporto magnetico.
2. **[gDNA di qualità elevata]** Rimuovere rapidamente il reagente EEW dall'incubatore di microcampioni e aggiungere 200 µl a ciascun pozzetto.
3. **[gDNA estratto da FFPE]** Rimuovere rapidamente il reagente EEW dall'incubatore di microcampioni e aggiungere 50 µl a ciascun pozzetto.
4. Conservare il reagente EEW non utilizzato nell'incubatore di microcampioni e mantenerlo riscaldato.
5. Sigillare e agitare a 1.800 giri/min. per 4 minuti.
6. Posizionare la piastra campioni sull'inserto blocco di riscaldamento MIDI nell'incubatore per microcampioni, sotto alla provetta EEW, chiudere il coperchio, quindi incubare per 5 minuti alla temperatura richiesta:
 - [FFPE] 58 °C
 - [Pannelli sonda da 80 mer] 58 °C
 - [Identificazioni di varianti somatiche] 58 °C
 - [Tutti gli altri pannelli] 62 °C
7. Posizionare immediatamente su un supporto magnetico per piastra MIDI e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).
8. Con una pipetta impostata a 200 µl per gDNA di qualità elevata o a 50 µl per FFPE, rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto.
9. Ripetere i passaggi da 1 a 8 due volte per un numero totale di tre lavaggi.

Lavaggio con trasferimento

1. Rimuovere dal supporto magnetico.
2. **[gDNA di qualità elevata]** Rimuovere rapidamente il reagente EEW dall'incubatore di microcampioni e aggiungere 200 µl a ciascun pozzetto.
3. **[gDNA estratto da FFPE]** Rimuovere rapidamente il reagente EEW dall'incubatore di microcampioni e aggiungere 50 µl a ciascun pozzetto.
4. Sigillare e agitare a 1.800 giri/min. per 4 minuti. In caso di spruzzi, ridurre la velocità a 1.600 giri/min.
5. Trasferire la soluzione di microsferi risospese in una nuova piastra MIDI.
Parte dei campioni potrebbe rimanere nei pozzetti.



ATTENZIONE

Il trasferimento del reagente riduce al minimo il carry-over di reagenti residui che possono inibire la PCR a valle.

6. Posizionare la piastra campioni sull'inserto blocco di riscaldamento MIDI nell'incubatore per microcampioni, chiudere il coperchio, quindi incubare per 5 minuti alla temperatura richiesta:
 - [FFPE] 58 °C

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- [Pannelli sonda da 80 mer] 58 °C
 - [Identificazioni di varianti somatiche] 58 °C
 - [Tutti gli altri] 62 °C
7. Posizionare immediatamente su un supporto magnetico per piastra MIDI e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).
 8. Con una pipetta impostata a 200 µl per gDNA di qualità elevata o a 50 µl per FFPE, rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto.
 9. Centrifugare la piastra a 280 × g per 30 secondi.
 10. Posizionare su un supporto magnetico per piastra MIDI per 10 secondi.
 11. Con una pipetta da 20 µl, rimuovere ed eliminare il liquido residuo da ciascun pozzetto.
 12. Procedere immediatamente all' [Eluizione a pagina 44](#) per evitare un'eccessiva essiccazione delle microsfere e la perdita di resa della libreria.

Eluizione

1. Combinare i seguenti volumi per preparare una Elution Master Mix. Moltiplicare ciascun volume per il numero di librerie raggruppate in pool elaborate.
 - EE1 (28,5 µl)
 - HP3 (1,5 µl)Nel volume è compreso ulteriore reagente in eccesso.
2. Agitare con un vortex, quindi centrifugare brevemente.
3. Rimuovere la piastra MIDI dal supporto magnetico.
4. Aggiungere 23 µl di Elution Master Mix a ciascun pozzetto.
5. Sigillare la piastra e agitare a 1.800 giri/min per 2 minuti.
6. Incubare la piastra a temperatura ambiente per 2 minuti.
7. Centrifugare a 280 × g per 30 secondi.
8. Posizionare su un supporto magnetico per piastra MIDI e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).
9. Trasferire 21 µl di surnatante dalla piastra MIDI al pozzetto corrispondente di una nuova piastra PCR a 96 pozzetti.
10. Eliminare la piastra MIDI.
11. Aggiungere 4 µl di ET2 a ciascun pozzetto contenente 21 µl di surnatante.
12. Impostare la pipetta su 20 µl e pipettare lentamente ciascun pozzetto 10 volte per miscelare.
13. Sigillare la piastra, quindi centrifugare a 280 × g per 10 secondi.
14. Incubare la piastra a temperatura ambiente per 1 minuto.

Amplificazione della libreria arricchita

Tramite questo passaggio, il PCR amplifica la libreria arricchita.

Materiali di consumo

- EPM (Enhanced PCR Mix)
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Sigillo adesivo

Preparazione

1. Preparare i seguenti materiali di consumo:

Item	Conservazione	Istruzioni
EPM	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a 4 °C o su ghiaccio per 1 'ora. Capovolgere per miscelare, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte su ghiaccio.
PPC	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a 4 °C o su ghiaccio per 1 'ora. Utilizzare un vortex per miscelare, quindi centrifugare brevemente. Mettere da parte su ghiaccio.

2. Salvare il seguente programma AMP sul ciclatore termico usando il numero adeguato di cicli PCR elencati
nella tabella sottostante.

- Scegliere l'opzione con coperchio pre-riscaldato e impostare la temperatura su 100 °C
- Impostare il volume di reazione a 50 µl.
- 98 °C per 45 secondi
- (X) cicli di:
 - 98 °C per 30 secondi
 - 60 °C per 30 secondi
 - 72°C per 30 secondi
- 72°C per 5 minuti
- Mantenere la temperatura a 10 °C

Il tempo di esecuzione totale è approssimativamente di 35 minuti

Tipo di campione e pannello	(X) Cicli
FPPE	14
Exome Panel di Illumina (CEX) per gDNA di qualità elevata	10

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Tipo di campione e pannello	(X) Cicli
Exome Panel di Illumina (CEX) per FFPE	12
Tutti gli altri campioni e pannelli	12 ¹²³⁴

¹ Per piccoli pannelli di terze parti, è possibile regolare fino a 15 cicli grazie all'ottimizzazione successiva. Se si usa l'FFPE, il numero di cicli può essere regolato fino a 17.

² Per pannelli di terze parti con solo 500 sonde, è possibile regolare fino a 17 cicli. Se si usa l'FFPE, il numero di cicli può essere regolato fino a 19.

³ Per campioni FFPE, è possibile regolare fino a 14 cicli.

⁴ L'aumento di cicli PCR potrebbe causare un maggior tasso di duplicati e frammenti di minori dimensioni per i campioni FFPE.

Procedura

1. Aggiungere 5 µl di PPC a ciascun pozzetto.
2. Aggiungere 20 µl di EPM a ciascun pozzetto.
3. Sigillare la piastra e agitare a 1.200 giri/min per 1 minuto.
4. Centrifugare la piastra a 280 × g per 10 secondi.
5. Posizionare sul ciclatore termico preprogrammato ed eseguire il programma AMP.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, conservare a una temperatura compresa tra 2 °C e 8 °C per un massimo di 2 giorni. In alternativa, lasciare sul ciclatore termico per un massimo di 24 ore.

Pulizia delle librerie arricchite e amplificate

In questa fase, vengono usate le Cleanup Beads per purificare la libreria arricchita e rimuovere i prodotti non desiderati.

Materiali di consumo

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Etanolo all'80% preparato al momento (EtOH)
- Sigilli adesivi
- Piastra MIDI a 96 pozzetti
- Piastra PCR a 96 pozzetti
- Supporto magnetico per piastra MIDI

Informazioni sui reagenti

- Cleanup Beads

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- Agitare con un vortex prima di ogni utilizzo.
- Agitare frequentemente con un vortex per assicurarsi che le microsfere si distribuiscano in modo regolare.
- Aspirare e dispensare lentamente poiché la soluzione è viscosa.

Preparazione

1. Preparare i seguenti materiali di consumo.

Item	Conservazione	Istruzioni
CB	Temperatura ambiente	Utilizzare un vortex e capovolgere per mescolare fino a quando il colore del liquido diventi omogeneo.
RSB	Tra 2 °C e 8 °C	Portare a temperatura ambiente. Utilizzare un vortex per miscelare.

2. Preparare al momento EtOH all'80% a partire dall'etanolo assoluto.

Procedura

1. Centrifugare la piastra PCR a 280 × g per 10 secondi.
2. Agitare il CB con un vortex tre volte per 10 secondi, quindi capovolgere.
3. Aggiungere 40,5 µl di CB a ciascun pozzetto di una nuova piastra **MIDI**.
4. Trasferire 45 µl da ciascun pozzetto dalla piastra PCR al pozzetto corrispondente della piastra MIDI.
5. Sigillare la piastra e agitare a 1.800 giri/min per 1 minuto.
6. Incubare la piastra MIDI a temperatura ambiente per 5 minuti.
7. Centrifugare a 280 × g per 10 secondi.
8. Posizionare su un supporto magnetico per piastra MIDI e attendere che il liquido diventi trasparente (5 minuti).
9. Con una pipetta impostata a 95 µl, rimuovere ed eliminare tutto il surnatante da ogni pozzetto.
10. Lavare due volte come indicato di seguito
 - a. Mantenendo la piastra sul supporto magnetico, aggiungere 200 µl di etanolo all'80% preparato al momento senza mescolare.
 - b. Incubare per 30 secondi.
 - c. Rimuovere ed eliminare il surnatante senza alterare le microsfere.
11. Asciugare all'aria sul supporto magnetico per 5 minuti.
12. Durante la fase di asciugatura all'aria, con una pipetta da 20 µl, rimuovere ed eliminare l'EtOH residuo da ogni pozzetto.
13. Rimuovere dal supporto magnetico e aggiungere 32 µl di RSB a ciascun pozzetto.
14. Sigillare la piastra e agitare a 1.800 giri/min per 1 minuto.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

15. Incubare la piastra a temperatura ambiente per 5 minuti.
16. Centrifugare a $280 \times g$ per 10 secondi.
17. Posizionare su un supporto magnetico per piastra MIDI e attendere che il liquido diventi trasparente (2 minuti).
18. Trasferire 30 μ l di surnatante dalla piastra MIDI a 96 pozzetti al pozzetto corrispondente di una piastra PCR nuova.
19. Eliminare la piastra MIDI.

PUNTO DI ARRESTO SICURO

Nel caso si esegua un arresto, sigillare la piastra e conservare a una temperatura compresa tra $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ per un massimo di 7 giorni.

Controllo delle librerie arricchite

Per quantificare l'input di gDNA a doppio filamento, usare un sistema a base fluorescente che utilizzi un colorante intercalante. Evitare i sistemi che misurano l'acido nucleico totale, come NanoDrop e altri sistemi di assorbimento dei raggi UV.

1. Eseguire 1 μ l delle librerie arricchite secondo il proprio sistema di quantificazione.

NOTA La molarità totale della sonda ha conseguenze proporzionali sulla resa della libreria successiva all'arricchimento.

Prevedere una dimensione media del frammento da 125 a 235 bp e una distribuzione dei frammenti di DNA approssimativamente tra i 200 bp e i 1.000 bp.

Diluizione delle librerie alla concentrazione iniziale

In questa fase, le librerie vengono diluite alla concentrazione iniziale per il proprio sistema di sequenziamento, è il primo passaggio per una diluizione in serie. Dopo aver ottenuto la concentrazione iniziale, le librerie sono pronte per essere denaturate e diluite nella concentrazione di caricamento finale.

Per il sequenziamento, qualunque sia il pannello sonda di arricchimento usato, Illumina consiglia di impostare una corsa paired-end con 151 cicli per lettura (2×151) e 10 cicli per Index Read (Lettura indici). Se si preferiscono meno letture sovrapposte o meno coperture non elaborate, è possibile eseguire un sequenziamento di 2×126 o 2×101 .

1. Calcolare il valore di molarità della libreria o delle librerie raggruppate in pool usando la formula seguente.
 - In caso di librerie qualificate con un analizzatore di frammenti di DNA, usare la dimensione media ottenuta dalla libreria.
 - Per tutti gli altri sistemi di qualificazione, usare come dimensione media della libreria 350 bp.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

$$\frac{ng / \mu l \times 10^6}{660 \frac{g}{mol} \times \text{dimensione media della libreria (bp)}} = \text{Molarità (nM)}$$

Per esempio, se la concentrazione della libreria è 20 ng/μl e la dimensione media è 350 bp, il valore di molarità risultante sarà 86,58 nM.

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

- Con il valore di molarità, calcolare i volumi di RSB e libreria richiesti per diluire le librerie alla concentrazione iniziale per il proprio sistema.

Sistema di sequenziamento	Volume libreria minimo richiesto (μl)	Concentrazione iniziale (nM)	Concentrazione di caricamento finale (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) o 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM è la concentrazione iniziale che consente di ottenere una concentrazione finale di caricamento di 350 pM. Se necessario, regolare la concentrazione finale di caricamento utilizzando la tabella seguente.

Concentrazione di caricamento finale (pM)	Concentrazione delle librerie raggruppate in pool (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

- Diluire le librerie con RSB:
 - Librerie quantificate come raggruppamento di librerie in multiplex:** diluire il raggruppamento in pool alla concentrazione iniziale del proprio sistema.

Insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

- **Librerie quantificate individualmente:** diluire ciascuna biblioteca alla concentrazione iniziale del proprio sistema. In una provetta, aggiungere 10 µl di ciascuna libreria diluita per creare un raggruppamento in pool di librerie in multiplex.
4. Seguire le istruzioni del proprio sistema per la denaturazione e la diluizione per ottenere la concentrazione di caricamento finale.
- Per NextSeq 550Dx System, fare riferimento a [Preparazione del sequenziamento NextSeq 550Dx a pagina 50](#).
 - Per MiSeqDx System, fare riferimento a [Preparazione del sequenziamento MiSeqDx a pagina 52](#).
 - Per NovaSeq 6000Dx System, fare riferimento a [Preparazione del sequenziamento NovaSeq 6000Dx a pagina 53](#).

Le concentrazioni di caricamento finali sono un punto di partenza e delle linee guida generali. Ottimizzare le concentrazioni per il proprio flusso di lavoro e il sistema di quantificazione con corse di sequenziamento successive o titolazione della cella a flusso.

Preparazione del sequenziamento NextSeq 550Dx

Usare le seguenti istruzioni per denaturare e diluire le librerie ed eseguire il sequenziamento sul sistema di sequenziamento NextSeq 550Dx.

Materiali di consumo

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

Preparazione

Preparare *al momento* una diluizione di 0,2N di NaOH per denaturare le librerie per il sequenziamento. Per evitare che piccoli errori di pipettamento influiscano sulla concentrazione finale di NaOH, viene preparato del volume supplementare.



ATTENZIONE

0,2N di NaOH appena diluito è fondamentale per il processo di denaturazione. Una denaturazione inadeguata può ridurre la resa.

1. Combinare i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga per diluire 1N di NaOH a 0,2N di NaOH:
1. Preparare i seguenti materiali di consumo.

Item	Conservazione	Istruzioni
HT1	Tra -25 °C e -15 °C	Scongela a temperatura ambiente. Conservare a una temperatura compresa tra 2 e 8 °C fino a quando si è pronti per diluire le librerie denaturate.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

2. Combinare i seguenti volumi in una provetta per microcentrifuga per preparare una diluizione di NaOH fresca:
 - Acqua da laboratorio (800 µl)
 - 1N di NaOH (200 µl)Si ottiene 1 ml di NaOH da 0,2N.
3. Capovolgere la provetta diverse volte per miscelare.
4. Combinare i seguenti volumi in una provetta per microcentrifuga per preparare 200 mM di Tris-HCl, pH 7,0.
 - Acqua da laboratorio (800 µl)
 - 1M di Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)Il risultato è 1 ml di Tris-HCl da 200 mM, pH 7,0.

NOTA Tenere la provetta tappata. Usare la diluizione fresca entro **12 ore**.

Denaturazione delle librerie

1. Combinare i volumi seguenti di libreria e diluizione fresca di NaOH da 0,2N in una provetta per microcentrifuga.
 - 10 µl di libreria
 - 10 µl di NaOH da 0,2N
2. Utilizzare brevemente un vortex quindi centrifugare a 280 × g per 1 minuto.
3. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
4. Aggiungere 10 µl di Tris-HCl da 200 mM, pH 7.

Diluizione delle librerie denaturate da 20 pM

1. Aggiungere 970 µl di HT1 pre-raffreddato alla provetta contenente le librerie denaturate. Si ottiene una libreria denaturata da 20 pM.
2. Utilizzare brevemente un vortex quindi centrifugare a 280 × g per 1 minuto.
3. Posizionare le librerie da 20 pM su ghiaccio fino al momento di passare alla fase di diluizione finale.

Diluizione delle librerie alla concentrazione di caricamento

1. Aggiungere i seguenti volumi per diluire la soluzione di libreria denaturata da 20 pM a 1,2 pM.
 - Soluzione libreria denaturata (78 µl)
 - HT1 pre-raffreddato (1.222 µl)Il volume totale è 1,3 ml a 1,2 pM.
2. Capovolgere per miscelare, quindi utilizzare una centrifuga a impulsi.

Insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

3. Passare al sequenziamento. Per istruzioni, fare riferimento alla *Guida di consultazione del NextSeq 550Dx Instrument (documento n. 1000000009513)*.

Preparazione del sequenziamento MiSeqDx

Usare le seguenti istruzioni per denaturare e diluire le librerie ed eseguire il sequenziamento sul sistema di sequenziamento MiSeqDx.

Materiali di consumo

- HT1 (Hybridization Buffer)
- 1N di NaOH

Preparazione

Preparare *al momento* una diluizione di 0,2N di NaOH per denaturare le librerie per il sequenziamento. Per evitare che piccoli errori di pipettamento influiscano sulla concentrazione finale di NaOH, viene preparato del volume supplementare.



ATTENZIONE

0,2N di NaOH appena diluito è fondamentale per il processo di denaturazione. Una denaturazione inadeguata può ridurre la resa.

1. Combinare i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga per diluire 1N di NaOH a 0,2N di NaOH:
1. Preparare i seguenti materiali di consumo.

Item	Conservazione	Istruzioni
HT1	Tra -25 °C e -15 °C	Scongellare a temperatura ambiente. Conservare a un temperatura compresa tra 2 e 8 °C fino a quando si è pronti per diluire le librerie denaturate.

2. Combinare i seguenti volumi in una provetta per microcentrifuga per preparare una diluizione di NaOH fresca:
 - Acqua da laboratorio (800 µl)
 - 1N di NaOH (200 µl)Si ottiene 1 ml di NaOH da 0,2N.

NOTA Tenere la provetta tappata. Usare la diluizione fresca entro **12 ore**.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Denaturazione di una libreria da 4 nM

1. Combinare i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga.
 - Libreria da 4 nM (5 µl)
 - 0,2N di NaOH (5 µl)
2. Utilizzare brevemente un vortex quindi centrifugare a 280 × g per 1 minuto.
3. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti.
4. Aggiungere 990 µl di HT1 pre-raffreddato alla provetta contenente la libreria denaturata. Si ottiene 1 ml di libreria denaturata da 20 pM.

Diluizione di libreria denaturata a 20 pM

1. Diluire alla concentrazione desiderata usando i seguenti volumi.

Concentrazione	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Libreria 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
HT1 pre-raffreddato	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Capovolgere per miscelare, quindi utilizzare una centrifuga a impulsi.
3. Passare al sequenziamento. Per informazioni, fare riferimento alla *Guida di consultazione del MiSeqDx Instrument per MOS v4 (documento n. 1000000157953)*.

Preparazione del sequenziamento NovaSeq 6000Dx

Utilizzare le seguenti istruzioni per denaturare e diluire le librerie ed eseguire il sequenziamento sul sistema di sequenziamento NovaSeq 6000Dx.

Materiali di consumo

- HP3 (2N NaOH)
- RSB (Resuspension Buffer)
- 1N di NaOH
- 10 mM di Tris-HCl, pH 8,5
- 400 mM di Tris-HCl, pH 8,0
- Provette libreria NovaSeq 6000Dx

Preparazione

Preparare *al momento* una diluizione di 0,2N di NaOH per denaturare le librerie per il sequenziamento. Per evitare che piccoli errori di pipettamento influiscano sulla concentrazione finale di NaOH, viene preparato del volume supplementare.

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina



ATTENZIONE

0,2N di NaOH appena diluito è fondamentale per il processo di denaturazione. Una denaturazione inadeguata può ridurre la resa.

1. Combinare i volumi seguenti in una provetta per microcentrifuga per diluire 1N di NaOH a 0,2N di NaOH:

Tabella 4 Modalità S2

Reagente	Volume per una cella a flusso (µl)	Volume per due celle a flusso (µl)
Acqua da laboratorio	40	80
1N di NaOH standard	10	20

Con questi volumi si ottengono 50 µl di 0,2N di NaOH per una cella a flusso oppure 100 µl di 0,2N di NaOH per due celle a flusso.

Tabella 5 Modalità S4

Reagente	Volume per una cella a flusso (µl)	Volume per due celle a flusso (µl)
Acqua da laboratorio	80	160
1N di NaOH standard	20	40

Con questi volumi si ottengono 100 µl di 0,2N di NaOH per una cella a flusso oppure 200 µl di 0,2N di NaOH per due celle a flusso.

2. Capovolgere diverse volte o utilizzare un vortex per miscelare correttamente.

NOTA Tenere la provetta tappata. Usare la diluizione fresca entro **12 ore**.

Creazione di un pool di librerie normalizzate

La concentrazione di caricamento può variare in base ai metodi di preparazione e quantificazione delle librerie.

Utilizzare le istruzioni seguenti per normalizzare le librerie alla concentrazione adeguata e creare un raggruppamento in pool. Le librerie sequenziate sulla stessa cella a flusso devono essere combinate in un singolo pool normalizzato.

NOTA Il numero massimo di campioni che possono essere analizzati per corsia con il DNA Prep with Enrichment Dx Kit di Illumina è 192. Questo limite è dovuto al numero totale di UD Indexes nel Set A e B.

Normalizzazione delle librerie per il raggruppamento in pool

1. Determinare la concentrazione richiesta per le librerie raggruppate in pool in base alla concentrazione di caricamento finale desiderata.
 - Per ottenere una concentrazione di caricamento finale di 350 pM, è richiesta una concentrazione di librerie raggruppate in pool di 1,75 nM.
 - Per determinare la concentrazione delle librerie raggruppate in pool per una diversa concentrazione di caricamento finale, fare riferimento a [Diluizione delle librerie alla concentrazione iniziale a pagina 48](#).
2. Normalizzare le librerie alla concentrazione delle librerie raggruppate in pool desiderata utilizzando 10 mM di Tris-HCl, pH 8,5.
Per informazioni sulla diluizione delle librerie alla concentrazione appropriata, fare riferimento a [Pooling Calculator](#) sul sito Web di Illumina.

Concentrazioni di caricamento raccomandate

La concentrazione ottimale di DNA dipende dal tipo di libreria e dalla dimensione dell'inserto. Per le librerie da più di 450 bp, potrebbero essere necessarie concentrazioni più elevate.

Raggruppamento di librerie normalizzate e aggiunta facoltativa di un campione di controllo PhiX

1. Combinare il volume appropriato di ciascuna libreria normalizzata in una nuova provetta per microcentrifuga per ottenere uno dei seguenti volumi finali:

Modalità	Volume finale (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Facoltativo]** Aggiungere 1% di campione di controllo PhiX non denaturato nel modo seguente.
 - a. Diluire 10 nM di campione di controllo PhiX con 2,5 nM utilizzando 10 mM di Tris-HCl, pH 8,5.
 - b. Aggiungere il volume appropriato di campione di controllo PhiX 2,5 nM non denaturato nel pool di librerie non denaturate.

Modalità	Campione di controllo PhiX 2,5 nM non denaturato (µl)	Pool di librerie non denaturate (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Quando si aggiunge il campione di controllo PhiX, la quantità raccomandata per ottenere librerie ben bilanciate è di 1%. Le librerie a bassa diversità potrebbero richiedere una quantità maggiore. Per utilizzare un campione di controllo PhiX con librerie a bassa diversità, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina per informazioni su come procedere.

Denaturazione del raggruppamento delle librerie e del campione di controllo PhiX facoltativo

1. Dispensare 0,2N di NaOH nella provetta del pool di librerie non denaturate e del campione di controllo PhiX facoltativo nel modo seguente.

Cella a flusso	0,2N di NaOH	Pool di librerie non denaturate (µl)	Volume risultante
S2	37	150	187 µl o 187,9 µl con PhiX
S4	77	310	387 µl o 388,9 µl con PhiX

2. Tappare e utilizzare brevemente un vortex.
3. Centrifugare a 280 × g per 1 minuto.
4. Incubare a temperatura ambiente per 8 minuti per denaturare.
5. Dispensare 400 mM di Tris-HCl, pH 8,0 come segue per neutralizzare.

Modalità	400 mM di Tris-HCl, pH 8,0 (µl)	Volume risultante
S2	38	225 µl o 225,9 µl con PhiX
S4	78	465 µl o 466,9 µl con PhiX

6. Tappare e utilizzare brevemente un vortex.
7. Centrifugare a 280 × g per 1 minuto.
8. Trasferire l'intero volume di libreria denaturata o di libreria denaturata e PhiX nella provetta della libreria NovaSeq 6000Dx.
9. Passare al sequenziamento. Per istruzioni, fare riferimento a *NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation (Documentazione sul prodotto NovaSeq 6000Dx Instrument) (documento n. 200010105)*.

Risoluzione dei problemi

Per risolvere i problemi nel flusso di lavoro, utilizzare la seguente tabella. Se una corsa di sequenziamento o la preparazione delle librerie per un campione non riesce per due volte, potrebbe essere necessaria un'ulteriore operazione di risoluzione dei problemi. Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
La corsa di sequenziamento non supera le specifiche del controllo qualità	Errore dell'utente o nell'apparecchiatura di laboratorio all'interno del flusso di lavoro del saggio	<p>Qualificare le librerie arricchite per garantire un'adeguata resa della libreria e la distribuzione delle dimensioni dei frammenti. Ripetere la preparazione delle librerie da uno dei seguenti passaggi a seconda del punto in cui si è verificato il sospetto errore di utilizzo o di apparecchiatura. Se si ignora il punto o se si verificano errori di altro tipo, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina per risolvere i problemi della corsa.</p> <ul style="list-style-type: none">• Risequenziare le librerie. Fare riferimento a Preparazione del sequenziamento NextSeq 550Dx a pagina 50, Preparazione del sequenziamento MiSeqDx a pagina 52 oppure Preparazione del sequenziamento NovaSeq 6000Dx a pagina 53.• Arricchire nuovamente le librerie. Fare riferimento a Ibridazione delle sonde a pagina 37.• Avviare la preparazione delle librerie a partire dall'inizio del flusso di lavoro. Fare riferimento alle Istruzioni per l'uso a pagina 21.
	Problema dello strumento	Contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.

Insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Osservazione	Possibile causa	Intervento raccomandato
Errore nella generazione di file FASTQ o errore generale del sistema di sequenziamento (es. errore di rete, errori di caricamento/scaricamento dei reagenti ecc.)	Problema del software o dello strumento	Fare riferimento a <i>Local Run Manager Software Guide</i> (Guida del software Local Run Manager) (documento n. 100000002702) per informazioni sulla generazione di file FASTQ oppure a <i>NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide</i> (Guida di consultazione del NextSeq 550Dx Instrument) (documento n. 1000000009513) oppure a <i>MiSeqDx Instrument Reference Guide for MOS v4</i> , (Guida di consultazione del MiSeqDx Instrument per MOS v4) (documento n. 1000000157953) oppure a <i>NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation</i> (Documentazione sui prodotti NovaSeq 6000Dx Instrument) (documento n. 200010105). Per ricevere ulteriore assistenza, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina.
La libreria di DNA non genera una resa sufficiente per il caricamento del sequenziamento	I requisiti per l'input del campione non sono stati soddisfatti	Assicurarsi che l'input del campione sia appropriato e ripetere la preparazione delle librerie. Fare riferimento a Raccomandazioni in merito all'input di campioni a pagina 18 .
	Errore di utilizzo o di apparecchiatura nel flusso di lavoro del saggio	Ripetere la preparazione delle librerie da uno dei seguenti passaggi a seconda del punto in cui si è verificato il sospetto errore di utilizzo o di apparecchiatura. Se si ignora il punto o se si verificano errori di altro tipo, contattare l'Assistenza Tecnica Illumina per risolvere i problemi della corsa. <ul style="list-style-type: none"> • Risequenziare le librerie. Fare riferimento a Preparazione del sequenziamento NextSeq 550Dx a pagina 50, Preparazione del sequenziamento MiSeqDx a pagina 52 oppure Preparazione del sequenziamento NovaSeq 6000Dx a pagina 53. • Arricchire nuovamente le librerie. Fare riferimento a Ibridazione delle sonde a pagina 37. • Avviare la preparazione delle librerie a partire dall'inizio del flusso di lavoro. Fare riferimento alle Istruzioni per l'uso a pagina 21.
	Requisiti pannello sonda di arricchimento non soddisfatti	Assicurare un pannello sonda di arricchimento corretto e ripetere la preparazione delle librerie. Fare riferimento a Requisiti del pannello sonda di arricchimento a pagina 10 .

Caratteristiche delle prestazioni

Le caratteristiche delle prestazioni di DRAGEN per Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application per NovaSeq 6000Dx sono fornite nell'*Inserto della confezione di NovaSeq 6000Dx Instrument (documento n. 200025276)*.

Prestazione con pannelli di esomi interi

La prestazione dell'Exome Panel è stata analizzata usando l'input più basso (50 ng) e più alto (1.000 ng) consigliati del gDNA della linea cellulare Coriell NA12878, con un set vero noto per il rilevamento della variante della linea germinale (Platinum Genome di Coriell). Come pannelli rappresentativi sono stati utilizzati Exome Panel 1 (45 Mb) ed Exome Panel 2 (36,8 Mb). Sono stati testati 24 replicati tecnici con il saggio DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina utilizzando Exome Panel 1 (45 Mb) in due reazioni di arricchimento da 12 plex. Sono stati testati 12 replicati tecnici con il saggio DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina utilizzando Exome Panel 2 (36,8 Mb) in una singola reazione di arricchimento da 12 plex. Le librerie arricchite sono state sequenziate sul sistema di sequenziamento NextSeq 550Dx con il DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager Module.

La tabella seguente mostra i valori medi del sequenziamento secondario e le metriche della prestazione di identificazione delle varianti relative ai replicati tecnici analizzati in ciascun pannello.

Tabella 6 Prestazione del saggio con due pannelli di esomi interi

Pannello	Arricchimento di letture "padded" univoche	Uniformità di copertura	Lunghezza mediana frammento	Identificazione ripetuta di SNV ¹	Precisione SNV ²	Identificazione ripetuta delle indel ¹	Precisione indel ²
Exome Panel 1 (45 Mb)	80%	96%	186 bp	96%	99%	90%	89%
Exome Panel 2 (36,8 Mb)	93%	98%	188 bp	96%	99%	92%	93%

¹ Identificazione ripetuta = Positivi / (veri positivi + falsi negativi)

² Precisione = Veri positivi / (veri positivi + falsi positivi)

Limite di rilevamento

Per testare il limite del rilevamento, è stato usato il DNA di riferimento Horizon HD799. Il HD799 contiene DNA con moderata compromissione trattato con formalina con varianti di singolo nucleotide (SNV, Single Nucleotide Variant) con frequenza allelica tra l'1 e il 24,5%. È stato utilizzato il più basso input di DNA (50 ng) consigliato ed è stato valutato il tasso di rilevamento delle SNV con frequenza allelica delle varianti (VAF, Variant Allele

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Frequency) $\geq 5,0\%$. Sono stati analizzati 16 replicati tecnici con il saggio DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina utilizzando il flusso di lavoro FFPE, con un pannello di arricchimento pan-cancer (1,94 Mb) in 16 arricchimenti (1 plex), quindi sono stati sequenziati su un NextSeq 550Dx Instrument con il DNA GenerateFASTQ Dx Module.

Tutti i campioni presentavano i requisiti di prestazione specifici per il pannello, come illustrato nella tabella seguente.

Tabella 7 Prestazione dei campioni per limite di rilevamento

Pannello	Percentuale di rilevamento delle varianti di SNV $\geq 5,0\%$ VAF	Media Uniformità di copertura
Pannello di arricchimento pan-cancer (1,94 Mb, 523 geni)	100%	99%

Sostanze interferenti

Nel DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina, l'impatto delle sostanze potenzialmente interferenti è stato valutato considerando le prestazioni del saggio in presenza di tali sostanze.

Interferenze e sangue intero

L'acetaminofene (farmaco, componente esogena), la creatinina e i trigliceridi (metaboliti endogeni) sono stati analizzati aggiungendoli nei campioni di sangue umano intero prima dell'estrazione del DNA. Per valutare eventuali interferenze causate dalla raccolta di sangue (prelievo breve), l'EDTA è stato aggiunto nei campioni di sangue intero. Inoltre, per valutare le interferenze dovute alla preparazione dei campioni, dell'etanolo di grado molecolare è stato aggiunto nel DNA estratto dal sangue intero.

La tabella seguente mostra le concentrazioni del test per interferente.

Tabella 8 Sostanze potenzialmente interferenti e concentrazioni analizzate nel sangue intero

Sostanza del test	Concentrazione del test
Acetaminofene	15,6 mg/dl* Una concentrazione tre volte superiore a quella attesa secondo un dosaggio farmacologico terapeutico.
Creatinina	15 mg/dl* La più alta concentrazione osservata in una popolazione.
Trigliceridi	1,5 g/dl* La più alta concentrazione osservata in una popolazione.

Insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Sostanza del test	Concentrazione del test
EDTA	6 mg/ml Una concentrazione tre volte superiore a quella attesa nel sangue, raccolta in provette EDTA.
Etanolo di grado molecolare	15% v/v Nell'eluato successivo all'estrazione del DNA.

* Come da CLSI EP37-ED1:2018

Per ciascuna sostanza interferente, sono stati analizzati 12 replicati tecnici con il saggio DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina, arricchito con Exome Panel 1 (45 Mb) in un solo arricchimento (a 12 plex), quindi sono stati sequenziati su NextSeq 550Dx Instrument con il DNA GenerateFASTQ Dx Module.

Nelle sostanze analizzate, tutti i 12 campioni rispettavano ai requisiti di prestazione del campione e non è stata osservata alcuna interferenza con la prestazione del saggio.

Interferenze in tessuto FFPE

Due campioni in FFPE di colon-retto sono stati analizzati in presenza o in assenza di 0,1 mg di emoglobina per una sezione di area tissutale da 10 µM come rappresentazione dello scenario peggiore riportante il 50% di contaminazione del campione di tessuto FFPE e livelli di emoglobina elevati. I campioni sono stati analizzati tramite il saggio DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina con il pannello di arricchimento pan-cancer 1 (1,94 Mb) come pannello rappresentativo in arricchimenti a singolo plex. Successivamente, le librerie arricchite sono state sequenziate su un NextSeq 550Dx Instrument con il DNA GenerateFASTQ Dx Module. Tutti i campioni rispettavano i requisiti di prestazione del campione e si è dimostrato che l'emoglobina non interferisce con la prestazione del saggio.

Per valutare l'interferenza derivante dalla preparazione dei campioni, sono stati aggiunti due componenti esogeni al DNA estratto dal campione di tessuto FFPE di un cancro della vescica. Le sostanze esogene analizzate sono soluzioni di estrazione normalmente utilizzate nel processo di estrazione del DNA e sono elencate nella tabella seguente, assieme alle quantità analizzate.

Le soluzioni della sostanza del test sono in commercio in kit per l'isolamento del DNA basati su colonna.

Tabella 9 Sostanze esogene potenzialmente interferenti e concentrazioni analizzate nel tessuto FFPE

Sostanza del test	Concentrazione del test (µl/30 µl di eluato)
Soluzione di deparaffinizzazione	113 x 10 ⁻⁶
Wash Buffer AW2	0,417

Per ciascuna sostanza interferente, sono stati analizzati otto replicati tecnici con il saggio DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina, con un pannello di arricchimento pan-cancer (1,94 Mb) in arricchimenti a singolo plex, quindi sono stati sequenziati su un NextSeq 550Dx Instrument con il DNA GenerateFASTQ Dx Module.

In entrambe le sostanze analizzate, tutti gli otto campioni hanno rispettato i requisiti di prestazione del campione e non è stata osservata alcuna interferenza con la prestazione del saggio.

Contaminazione incrociata

Con il saggio DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina sono stati analizzati il gDNA della linea cellulare Coriell NA12878 (femminile, 10 campioni), il gDNA della linea cellulare Coriell NA12877 (maschile, 12 campioni) e i controlli senza template (NTC, 2 campioni) in un layout della piastra a scacchiera. Tutti i campioni hanno adottato come condizione maggiormente stringente per la valutazione della contaminazione incrociata dei campioni la raccomandazione più elevata in merito all'input di gDNA (1.000 ng). L'analisi è stata realizzata due volte, da due operatori distinti. L'Exome Panel 1 (45 Mb) è stato utilizzato in reazioni di arricchimento a 12 plex. Le librerie arricchite sono state sequenziate su NextSeq 550Dx con il DNA GenerateFASTQ Dx. La valutazione è stata eseguita considerando la copertura del cromosoma Y specifico per il genere maschile nei campioni femminili, in confronto ai livelli generali di una piastra di tutti i campioni femminili e la rappresentazione degli indici dei campioni NTC.

Tabella 10 Risultati della contaminazione incrociata

Campioni femminili con copertura del cromosoma Y maschile con rumore della linea di base < 3x	Rappresentazione degli indici in NTC
100%	< 0,0005%

Appendice: Sequenze adattatore indici UD di Illumina

Questi adattatori a doppi indici univoci (UD) sono disposti nella piastra per applicare la strategia di accoppiamento raccomandata. Gli adattatori indice hanno una lunghezza di 10 basi anziché la tipica lunghezza di otto basi.

Adattatori Index 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG

Adattatori Index 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC

Per il trimming dell'adattatore di Read 1 (Lettura 1) e Read 2 (Lettura 2) viene utilizzata la seguente sequenza.

CTGTCTCTTATACACATCT

Adattatori indice piastra A/set 1

Nome indice	i7 basi nell'adattatore	i5 basi nell'adattatore
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Nome indice	i7 basi nell'adattatore	i5 basi nell'adattatore
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA
UDP0008	TGCCTTGATC	CCTTGTTAAT
UDP0009	CTACTCAGTC	GTTGATAGTG
UDP0010	TCGTCTGACT	ACCAGCGACA
UDP0011	GAACATACGG	CATACACTGT
UDP0012	CCTATGACTC	GTGTGGCGCT
UDP0013	TAATGGCAAG	ATCACGAAGG
UDP0014	GTGCCGCTTC	CGGCTCTACT
UDP0015	CGGCAATGGA	GAATGCACGA
UDP0016	GCCGTAACCG	AAGACTATAG
UDP0017	AACCATTCTC	TCGGCAGCAA
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	TGCGTGTAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Nome indice	i7 basi nell'adattatore	i5 basi nell'adattatore
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAAC TGAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GCGGAGATGG	TTCTATGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTGCGA
UDP0055	TATTCCTCAG	CTTAACCACT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Nome indice	i7 basi nell'adattatore	i5 basi nell'adattatore
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC
UDP0068	TTGTTCCGTG	AACCTAGCAC
UDP0069	AAGTACTCCA	TCTGTGTGGA
UDP0070	ACGTCAATAC	GGAATTCCAA
UDP0071	GGTGTACAAG	AAGCGCGCTT
UDP0072	CCACCTGTGT	TGAGCGTTGT
UDP0073	GTTCCGCAGG	ATCATAGGCT
UDP0074	ACCTTATGAA	TGTTAGAAGG
UDP0075	CGCTGCAGAG	GATGGATGTA
UDP0076	GTAGAGTCAG	ACGGCCGTCA
UDP0077	GGATACCAGA	CGTTGCTTAC
UDP0078	CGACTAATG	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

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Nome indice	i7 basi nell'adattatore	i5 basi nell'adattatore
UDP0093	CTGGATATGT	TATGTGCAAT
UDP0094	CAATCTATGA	GATTAAGGTG
UDP0095	GGTGGAAATAC	ATGTAGACAA
UDP0096	TGGACGGAGG	CACATCGGTG

Adattatori indice piastra B/set 2

Nome indice	i7 basi nell'adattatore	i5 basi nell'adattatore
UDP0097	CTGACCGGCA	CCTGATACAA
UDP0098	GAATTGAGTG	TTAAGTTGTG
UDP0099	GCGTGTGAGA	CGGACAGTGA
UDP0100	TCTCCATTGA	GCACTACAAC
UDP0101	ACATGCATAT	TGGTGCCTGG
UDP0102	CAGGCGCCAT	TCCACGGCCT
UDP0103	ACATAACGGA	TTGTAGTGTA
UDP0104	TTAATAGACC	CCACGACACG
UDP0105	ACGATTGCTG	TGTGATGTAT
UDP0106	TTCTACAGAA	GAGCGCAATA
UDP0107	TATTGCGTTC	ATCTTACTGT
UDP0108	CATGAGTACT	ATGTCGTGGT
UDP0109	TAATTCTACC	GTAGCCATCA
UDP0110	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

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Nome indice	i7 basi nell'adattatore	i5 basi nell'adattatore
UDP0120	GGCCTGTCCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
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

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Nome indice	i7 basi nell'adattatore	i5 basi nell'adattatore
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCCTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA
UDP0155	ATTCCGCTAT	GCGCAGAGTA
UDP0156	TGAATATTGC	GGGCCCAATT
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

Inserto della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

Nome indice	i7 basi nell'adattatore	i5 basi nell'adattatore
UDP0180	TGAGACAGCG	ATTACTCACC
UDP0181	TGTTTCGCATT	AATTGGCGGA
UDP0182	TCCAAGAATT	TTGTCAACTT
UDP0183	GCTGTAGGAA	GGCGAATTCT
UDP0184	ATACCTGGAT	CAACGTCAGC
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

Cronologia revisioni

Documento	Data	Descrizione della modifica
Documento n. 200019584 v02	Settembre 2022	Aggiunto contenuto per supportare il sequenziamento sul NovaSeq 6000Dx Instrument.
Documento n. 200019584 v01	Maggio 2022	Aggiunti i nomi dei sistemi di sequenziamento e i numeri di catalogo. Informazioni sulla doppia indicizzazione univoca rimosse per le librerie con indicizzazione singola.
Documento n. 200019584 v00	Maggio 2022	Versione iniziale.

Insero della confezione di DNA Prep with Enrichment Dx di Illumina

illumina®

Brevetti e marchi di fabbrica

Questo documento e il suo contenuto sono di proprietà di Illumina, Inc. e delle aziende ad essa affiliate ("Illumina") e sono destinati esclusivamente ad uso contrattuale da parte dei clienti di Illumina, per quanto concerne l'utilizzo dei prodotti qui descritti, con esclusione di qualsiasi altro scopo. Questo documento e il suo contenuto non possono essere usati o distribuiti per altri scopi e/o in altro modo diffusi, resi pubblici o riprodotti, senza previa approvazione scritta da parte di Illumina. Mediante questo documento, Illumina non trasferisce a terzi alcuna licenza ai sensi dei suoi brevetti, marchi, copyright, o diritti riconosciuti dal diritto consuetudinario, né diritti simili di alcun genere.

Al fine di assicurare un uso sicuro e corretto dei prodotti qui descritti, le istruzioni riportate in questo documento devono essere scrupolosamente ed esplicitamente seguite da personale qualificato e adeguatamente formato. Leggere e comprendere a fondo tutto il contenuto di questo documento prima di usare tali prodotti.

LA LETTURA INCOMPLETA DEL CONTENUTO DEL PRESENTE DOCUMENTO E IL MANCATO RISPETTO DI TUTTE LE ISTRUZIONI IVI CONTENUTE POSSONO CAUSARE DANNI AL/I PRODOTTO/I, LESIONI PERSONALI A UTENTI E TERZI E DANNI MATERIALI E RENDERANNO NULLA QUALSIASI GARANZIA APPLICABILE AL/I PRODOTTO/I.

ILLUMINA NON SI ASSUME ALCUNA RESPONSABILITÀ DERIVANTE DALL'USO IMPROPRIO DEL/DEI PRODOTTO/I QUI DESCRITTI (INCLUSI SOFTWARE O PARTI DI ESSO).

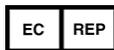
© 2022 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati.

Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, consultare la pagina Web www.illumina.com/company/legal.html.

Informazioni di contatto



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (fuori dal Nord America)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Paesi Bassi

Sponsor Australiano

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

Etichettatura del prodotto

Per un riferimento completo dei simboli che si trovano sulla confezione del prodotto e sull'etichettatura, fare riferimento alla legenda dei simboli alla pagina Web support.illumina.com sulla scheda *Documentation* (Documentazione) per il kit in uso.