

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO. POUZE PRO EXPORT.

## Zamýšlený účel

Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx Kit je sada reagensií a spotřebního materiálu, která se používá k přípravě knihoven vzorků z genomické DNA získané z lidských buněk a tkání pro vývoj diagnostických rozborů *in vitro*. Pro přípravu knihoven určených pro specifické genomické oblasti zájmu jsou nutné panely sond dodané uživatelem. Vytvořené knihovny vzorků jsou určeny pro použití v systémech pro sekvenování společnosti Illumina. Illumina® DNA Prep with Enrichment Dx obsahuje software pro nastavení, monitorování a analýzu sekvenování.

## Principy postupu

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je určen pro ruční přípravu sekvenačních knihoven DNA obohacených o cílové oblasti z genomové DNA získané z lidských buněk a tkání.

Pro obohacení cílů jsou nutné panely biotinylovaných oligonukleotidů dodané uživatelem. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilní s různými velikostmi panelů, včetně malých panelů (< 20 000 sond) až po velké panely (> 200 000 sond). Vytvořené obohacené knihovny jsou určeny pro použití k sekvenování na sekvenačních systémech Illumina.

Postup Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se skládá z následujících kroků:

- **Genomová DNA tagmentu** – používá Enrichment BLT Small (eBLTS) k tagmentaci vstupu DNA. Během tagmentace je gDNA fragmentována a označena adaptéry v jediném kroku. Pro saturaci eBLTS v reakci tagmentace je zapotřebí minimálně 50 ng vstupní DNA. Po saturaci eBLTS fragmentuje stanovený počet molekul DNA a vytváří normalizované knihovny s konzistentní distribucí velikosti fragmentů.
- **Následné tagmentační čištění** – vyčistí DNA označenou adaptérem na eBLTS pro použití při amplifikaci.
- **Amplifikace tagmentované DNA** – amplifikuje tagmentovanou DNA pomocí programu PCR s omezeným cyklem. Na konce fragmentů DNA se přidávají jedinečné duální (UD) indexy, které umožňují dvojí jedinečné čárové kódování knihoven DNA a generování klastrů během sekvenování.
- **Čištění knihoven** – k purifikaci a selekci velikosti amplifikovaných knihoven DNA se používá postup purifikace pomocí částic.
- **Sdružení knihoven** – sdružuje knihovny DNA s jedinečnými indexy do jednoho fondu až 12 knihoven. Knihovny můžete sdružovat podle objemu nebo hmotnosti.
- **Hybridizace sond** – sestává z hybridizační reakce, při níž jsou knihovny dvouvláknové DNA denaturovány a panel biotinylovaných sond DNA je hybridizován na cílené genomické oblasti.
  - Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilní s více panely. Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nezahrnuje obohacovací panel. Panely sond jsou dodávány uživatelem a musí splňovat požadované specifikace. Reagencie Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jsou kompatibilní

s oligonukleotidovými panely DNA obohacenými oligonukleotidy od společnosti Illumina i s těmi od třetích stran, které splňují požadované specifikace. Informace o požadovaných specifikacích pro panely třetích stran naleznete v části [Požadavky na panel obohacovacích sond na straně 10](#)

- **Zachycení hybridizovaných sond** – používá Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) k zachycení biotinylovaných sond hybridizovaných s cílovými oblastmi zájmu.
- **Amplifikace obohacených knihoven** – používá PCR k amplifikaci obohacených knihoven.
- **Čištění amplifikovaných obohacených knihoven** – k purifikaci obohacených knihoven připravených k sekvenování používá postup purifikace pomocí částic.
- **Sekvenování** – sekvenování obohacených knihoven se provádí na sekvenačním systému MiSeqDx, NextSeq 550Dx nebo NovaSeq 6000Dx. U přístrojů MiSeqDx a NextSeq 550Dx se integrovaný modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager používá pro nastavení sekvenačního běhu, monitorování běhu a generování FASTQ z přiřazení bází. U přístroje NextSeq 550Dx se serverem DRAGEN a přístroje NovaSeq 6000Dx se pro nastavení běhu a sekundární analýzu používá aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s několika dostupnými pracovními postupy.

## Omezení postupu

- Určeno k diagnostice *in vitro*.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilní s genomovou DNA získanou z lidských buněk a tkáně.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilní se vstupem dvouvláknové gDNA o hmotnosti 50-1000 ng. Funkčnost není zaručena u vstupů mimo tyto prahové hodnoty.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nezahrnuje reagentie pro extrakci DNA. Výsledky analytického testování, včetně testování interferencí, uvedené v [Charakteristiky funkčnosti na straně 58](#) byly získány s plnou krví a FFPE jako reprezentativními typy vzorků s reprezentativními sadami pro extrakci DNA. Všechny diagnostické testy vyvinuté pro použití s reagentii Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vyžadují úplnou validaci všech aspektů výkonnosti pomocí sady pro extrakci DNA dle vlastního výběru.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se nedoporučuje se pro nekvalitní vzorky FFPE s  $\Delta Cq > 5$ . Použití vzorků s  $\Delta Cq > 5$  může zvýšit pravděpodobnost selhání přípravy knihovny a snížit účinnost rozboru.
- Reagentie Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit byly nakonfigurovány a testovány pro vstupní materiál vzorků, reakce obohacení a plexitu obohacení uvedenou v následující tabulce.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Vstupní materiál vzorků	Reakce obohacení	Plexita obohacení
Souprava pro 16 vzorků	Nízká kvalita (FFPE)	16 reakcí	Jednoplexové
Souprava pro 96 vzorků	Vysoká kvalita (např. plná krev)	8 reakcí	12plexové

- Bylo testováno vstupní zpracování FFPE, které se doporučuje výhradně pro jednoplexové reakce obohacení s použitím sady pro 16 vzorků.
- U sady s 96 vzorky jsou možné nestandardní plexity (2- až 11plexové), ale mají následující omezení:
  - Zpracování vzorků ve 2- až 11plexových reakcích obohacení snižuje výkonnost sady.
  - Optimální výsledky nejsou zaručeny. Získání vhodné výtěžnosti obohacení pro nestandardní plexity může vyžadovat další optimalizaci.
  - U strategií sdružování s nízkou plexitou (2- až 8plexové) je pro optimální vyvážení barev pro úspěšné sekvenování a analýzu dat nutné zvolit indexové adaptéry s různými sekvencemi. Modul DNA GenerateFASTQ Dx na MiSeqDx a NextSeq 550Dx poskytuje možnosti pro kombinace barevně vyvážených indexů během nastavení běhu. Další informace o strategiích sdružování naleznete v části [Metody vkládání do fondu na straně 34](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je omezeno pouze na dodávání obohacených knihoven sekvenovaných na přístrojích MiSeqDx, NextSeq 550Dx a NovaSeq 6000Dx. Použití jiných sekvenačních systémů vyžaduje úplnou validaci všech aspektů výkonnosti.
- Obohacovací panely nejsou součástí tohoto produktu. Výsledky analytického testování uvedené v [Charakteristiky funkčnosti na straně 58](#) byly získány s reprezentativními obohacovacími panely a jsou uvedeny pouze pro informační účely. Charakteristiky analytické účinnosti slouží jako příklad obecných schopností rozboru a nestanovují možnosti nebo vhodnost týkající se jakýchkoli konkrétních tvrzení o rozboru. Všechny diagnostické testy vyvinuté pro použití s těmito reagenciemi vyžadují úplnou validaci všech aspektů výkonnosti.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilní s obohacovacími panely Illumina i s obohacovacími panely třetích stran. Výkonnost obohacovacích panelů třetích stran, které nesplňují požadavky panelu, však není zaručena. Informace o požadavcích na panel naleznete v části [Požadavky na panel obohacovacích sond na straně 10](#).
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit používá dvouhodinovou dobu hybridizace. Použití delší doby hybridizace může mít vliv na metriky výkonu.
- Moduly DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager pro MiSeqDx a NextSeq 550Dx poskytují pouze soubory FASTQ. Pokud tyto moduly používáte, je nutné provést validaci sekundární analýzy.

- Aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je k dispozici pro NextSeq 550Dx se serverem DRAGEN a pro NovaSeq 6000Dx. Aplikace podporuje více pracovních postupů sekundární analýzy, včetně generování FASTQ, generování FASTQ a VCF pro detekci zárodečných variant a generování FASTQ a VCF pro detekci somatických variant. Pokud aplikaci používáte pro generování VCF, nemusíte provádět validaci sekundární analýzy. Omezení aplikace zahrnují následující:
  - Inzerce délky > 18 bp a delece délky > 21 bp nebyly validovány.
  - Velké varianty, včetně vícenukleotidových variant (MNV) a velkých indelů, mohou být ve výstupním souboru VCF vykázány jako samostatné menší varianty.
  - Malé MNV jsou ve výstupním souboru VCF vykázány jako samostatné varianty.
  - Delece se v souboru VCF vykážou na souřadnici předcházející báze v souladu s formátem VCF. Proto je nutné zvážit přiléhající varianty dříve, než se vykáže, že signál přiřazení individuální báze je homozygotní reference.
  - Specifická omezení týkající se germinálních variant:
    - Pracovní postup analýzy generace Germline FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je navržen tak, aby poskytoval kvalitativní výsledky pro přiřazování germinálních variant (např. homozygotní, heterozygotní, divoký typ).
    - Zda bude varianta identifikována jako homozygotní, nebo heterozygotní, může být ovlivněno variabilitou počtu kopií.
    - Systém nebude hlásit víc než dvě varianty v jednom lokusu, a to ani za přítomnosti variability počtu kopií.
  - Specifická omezení týkající se somatických variant:
    - Pracovní postup analýzy generace Somatic FASTQ a VCF aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx je navržen tak, aby poskytoval kvalitativní výsledky pro přiřazování somatických variant (tj. přítomnost somatických variant).
    - Pracovní postup analýzy generace Somatic FASTQ a VCF nedokáže rozlišit mezi germinální a somatickou variantou. Pracovní postup je určen k detekování variant v celé řadě frekvencí variant, ale frekvenci variant nelze použít k rozlišení somatických variant od germinálních variant.
    - Detekci variant ovlivňuje normální tkáň ve vzorku. Vykázaná mez detekce je založena na frekvenci variant vzhledem k celkové DNA izolované z nádorové a normální tkáně.
    - Pokud je ve stejném lokusu přiřazena víc než jedna variantní alela, žádná z alel nebude hlášena jako průchozí varianta. Místo toho bude hlášena celá sada alel, ale bude filtrována pomocí vícealelového tagu.

## Složky produktu

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se skládá z následujících složek:

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se sadou A indexů UD, kat. č. 20051354 (16 vzorků), nebo č. 20051352 (96 vzorků)

- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se sadou B indexů UD, kat. č. 20051355 (16 vzorků), nebo č. 20051353 (96 vzorků)
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Modul pro NextSeq 550Dx, kat. č. 20063024
- Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Modul pro MiSeqDx, kat. č. 20063022
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Aplikace pro NovaSeq 6000Dx, kat. č. 20074609
- DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Aplikace pro NextSeq 550Dx, kat. č. 20074730

## Dodané reagensie

Dokončení Illumina DNA Prep with Enrichment Dx vyžaduje Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se sadou A indexů UD nebo Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se sadou B indexů UD. Pomocí soupravy pro 16 nebo 96 vzorků můžete provést následující počet reakcí přípravy a obohacení knihovny.

<b>Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit</b>	<b>Vstupní materiál vzorků</b>	<b>Reakce obohacení</b>	<b>Plexita obohacení</b>
Souprava pro 16 vzorků	Nízká kvalita (FFPE)	16 reakcí	Jednoplexové
Souprava pro 96 vzorků	Vysoká kvalita (např. plná krev)	8 reakcí	12plexové

## Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se sadou A/B indexů UD

### Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1, uchovávejte při teplotě 15 °C až 30 °C

Následující reagentie se dodávají při pokojové teplotě. Ihned uskladněte jednotlivé reagentie při uvedené skladovací teplotě, aby bylo zajištěno jejich správné fungování.

Název reagentie	Množství zkumavek		Barva víčka	Objem plnění	Účinné látky
	16 vzorků (č. 20050020)	96 vzorků (č. 20050025)			
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	4	Červená	350 µl	Roztok detergentu ve vodě.
Tagment Wash Buffer 2 (TWB2)	1	1	Zelená	41 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující detergent a sůl.
Cleanup Beads (CB)	1	N/A*	Červená	10 ml	Tuhé paramagnetické částice v pufrovaném vodném roztoku.

\* Cleanup Beads pro 96 vzorků je zahrnuto v Illumina Prep Dx Cleanup Beads 96 Samples (č. 20050030).

### Illumina Prep Dx Cleanup Beads (96 vzorků), skladujte při teplotě 15 °C až 30 °C

U 96vzorkových sad jsou Cleanup Beads součástí Illumina Prep Dx Cleanup Beads (kat. č. 20050030). Následující reagentie se dodává při pokojové teplotě. Ihned uskladněte jednotlivé reagentie při uvedené skladovací teplotě, aby bylo zajištěno jejich správné fungování. U 16vzorkových sad jsou Cleanup Beads součástí Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 1 (kat. č. 20050020).

Název reagentie	Množství	Barva víčka	Objem plnění	Účinné látky
Cleanup Beads (CB)	4	Červená	10 ml	Tuhé paramagnetické částice v pufrovaném vodném roztoku.

### Illumina DNA Prep Dx Tagmentation Reagents 2, uchovávejte při teplotě 2 °C až 8 °C

Následující reagentie se dodávají chlazené. Ihned uskladněte jednotlivé reagentie při uvedené skladovací teplotě, aby bylo zajištěno jejich správné fungování. Zásobní zkumavku eBLTS uchovávejte ve svislé poloze tak, aby byly částice vždy ponořené v pufu.

Název reagensie	Množství zkumavek		Barva víčka	Objem plnění		Účinné látky
	16 vzorků (č. 20050021)	96 vzorků (č. 20050026)		16 vzorků	96 vzorků	
Enrichment BLT Small (eBLTS)	1	4	Žlutá	200 µl	290 µl	Streptavidinové magnetické částice spojené s transpozomy v pufrovaném vodném roztoku obsahujícím glycerol, EDTA, dithiothreitol, sůl a detergent.
Resuspension Buffer (RSB)	1	4	Čirá	1,8 ml	1,8 ml	Pufrovaný vodný roztok.

### Illumina Prep Dx Tagmentation Reagents 3, uchovávejte při teplotě -25 °C až -15 °C

Následující reagensie se dodávají zmrazené. Ihned uskladněte jednotlivé reagensie při uvedené skladovací teplotě, aby bylo zajištěno jejich správné fungování.

Název reagensie	Množství zkumavek		Barva víčka	Objem plnění		Účinné látky
	16 vzorků (č. 20050022)	96 vzorků (č. 20050027)		16 vzorků	96 vzorků	
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	4	Čirá	290 µl	290 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující síran hořečnatý a dimethylformamid.
Enhanced PCR (EPM) (EPM)	2	4	Čirá	200 µl	610 µl	DNA polymeráza a dNTP v pufrovaném vodném roztoku.

### Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (16 vzorků), skladujte při teplotě 2 °C až 8 °C

U 16vzorkových sad jsou následující reagensie obsaženy v Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kat. č. 20050023). U 96vzorkových sad jsou reagensie obsaženy v Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kat. č. 20050028).

Následující reagentie se dodávají chlazené. Ihned uskladněte jednotlivé reagentie při uvedené skladovací teplotě, aby bylo zajištěno jejich správné fungování.

Název reagentie	Množství zkumavek	Barva víčka	Objem plnění	Účinné látky
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	4	Čirá	1,2 ml	Streptavidinové magnetické částice v pufrovaném vodném roztoku obsahujícím formamid, detergent a sůl.
Resuspension Buffer (RSB)	1	Čirá	1,8 ml	Pufrovaný vodný roztok.
Enrich Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Čirá	200 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující detergent a sůl.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Čirá	200 µl	Pufrovaný vodný roztok.

## **Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (96 vzorků), skladujte při teplotě 2 °C až 8 °C**

U 96vzorkových sad jsou následující reagentie obsaženy v Illumina Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kat. č. 20050028). U 16vzorkových sad jsou reagentie obsaženy v Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 1 (kat. č. 20050023).

Následující reagentie se dodávají chlazené. Ihned uskladněte jednotlivé reagentie při uvedené skladovací teplotě, aby bylo zajištěno jejich správné fungování.

Název reagentie	Množství zkumavek	Barva víčka	Objem plnění	Účinné látky
Streptavidin Magnetic Beads (SMB3)	2	Čirá	1,2 ml	Streptavidinové magnetické částice v pufrovaném vodném roztoku obsahujícím formamid, detergent a sůl.
Resuspension Buffer (RSB)	4	Čirá	1,8 ml	Pufrovaný vodný roztok.
Enrich Hyb Buffer 2 (EHB2)	1	Čirá	200 µl	Pufrovaný vodný roztok obsahující detergent a sůl.
Elute Target Buffer 2 (ET2)	1	Čirá	200 µl	Pufrovaný vodný roztok.



**Illumina DNA Prep Dx Enrichment Reagents 2, skladujte při teplotě -25 °C až -15 °C**

Následující reagenty se dodávají zmrazené. Ihned uskladněte jednotlivé reagenty při uvedené skladovací teplotě, aby bylo zajištěno jejich správné fungování.

Název reagentie	Množství zkumavek		Barva víčka	Objem plnění	Účinné látky
	16 vzorků (č. 20050024)	96 vzorků (č. 20050029)			
Enrichment Elution Buffer 1 (EE1)	1	1	Čirá	580 µl	Roztok detergentu ve vodě.
Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW)	4	4	Žlutohnědá	4,1 ml	Pufrovaný vodný roztok obsahující soli a detergent.
PCR Primer Cocktail (PPC)	1	1	Čirá	320 µl	Směs primerů PCR (oligonukleotidů).
2N NaOH (HP3)	1	1	Čirá	200 µl	2N roztok hydroxidu sodného (NaOH).
HYB Buffer 2 + IDT NXT Blockers (NHB2)	2	1	Modrá	480 µl	Pufrovaný vodný roztok s DNA Cot-1, zaplňovacím činidlem a formamidem
Enhanced PCR (EPM)	2	1	Čirá	200 µl	DNA polymeráza a dNTP v pufrovaném vodném roztoku.

**Sada Illumina Unique Dual Index Dx Set A/B, skladujte při teplotě od -25° C do -15 °C**

Následující reagenty se dodávají zmrazené. Ihned uskladněte jednotlivé reagenty při uvedené skladovací teplotě, aby bylo zajištěno jejich správné fungování. Sekvence indexových adaptérů naleznete v [Příloha: Illumina UD Indexes Adapter Sequences na straně 63](#).

Komponenta	Množství
Sada Illumina Unique Dual Index Dx Set A (96 indexů), č. 20050038	1
Sada Illumina Unique Dual Index Dx Set B (96 indexů), č. 20050039	1

## Nedodané reagensie

### Požadované reagensie, nedodané

- Reagensie pro extrakci a purifikaci DNA
- Reagensie kvantifikace DNA
- Ethanol (200 proof pro molekulární biologii)
- Voda bez nukleázy
- 10 mM Tris-HCl, pH 8,5
- 1N roztok NaOH, v kvalitě pro molekulární biologii
- Pokud používáte systém pro sekvenování NextSeq 550Dx:
  - 200 mM Tris, pH 7,0 (lze ředit z 1 M Tris-HCL, pH 7,0)
  - Sada reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) (kat. č. 20028871)
- Pokud používáte sekvenační systém MiSeqDx:
  - Sada reagensií MiSeqDx Reagent Kit v3 (kat. č. 20037124)
- Pokud používáte sekvenační systém NovaSeq 6000Dx:
  - 400 mM Tris, pH 8,0 (lze ředit z 1 M Tris-HCL, pH 8,0)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cyklů) (kat. č. 20046931)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cyklů) (kat. č. 20046933)
  - NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (kat. č. 20062292)
  - NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (kat. č. 20062293)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube (kat. č. 20062290)
  - NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (kat. č. 20062291)

### Požadavky na panel obohacovacích sond

Reagensie Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jsou kompatibilní s oligonukleotidovými panely DNA obohacenými oligonukleotidy od společnosti Illumina i těmi od třetích stran. Pokud používáte biotinylované sondy DNA třetích stran (fixní nebo vlastní panely), ujistěte se, že splňují požadované specifikace.

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit byl optimalizován a ověřen pomocí následujících specifikací panelu třetí strany. Při použití panelů třetích stran, které nesplňují specifikace, není srovnatelná účinnost zaručena.

- Délka sondy 80 bp nebo 120 bp
- 500 až 675 000 sond
- Jednovláknová nebo dvouvláknová DNA
- Celkový vstup sondy  $\geq 3$  pmoly pro obohacení při plexitách od 1 plexu do 12 plexů

## Skladování a manipulace

- Pokojová teplota je definována jako 15 °C až 30 °C.
- Reagencie jsou stabilní, pokud jsou skladovány v souladu s pokyny až do data použitelnosti uvedeného na štítcích sady. Teploty skladování naleznete v části [Dodané reagencie na straně 5](#).
- Zmrazené reagencie jsou stabilní maximálně po dobu čtyř cyklů zmrazení a rozmrazení, které proběhnou před uvedeným datem expirace.
- Postup Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit obsahuje následující body bezpečného přerušení:
  - Po [Amplifikace tagmentované DNA na straně 28](#) jsou amplifikované knihovny stabilní až 30 dní, pokud jsou skladovány při teplotě -25 °C až -15 °C.
  - Po [Čištění knihoven na straně 31](#) jsou vyčištěné amplifikované knihovny stabilní až 30 dní, pokud jsou skladovány při teplotě -25 °C až -15 °C.
  - Po [Sdružení předem obohacených knihoven na straně 33](#) jsou sdružené knihovny stabilní až 30 dní, pokud jsou skladovány při teplotě -25 °C až -15 °C.
  - Po [Amplifikace obohacené knihovny na straně 44](#) může deska s obohacenými amplifikovanými knihovnami zůstat na termocykléru až 24 hodin. Případně lze desku skladovat při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až 48 hodin.
  - Konečně vyčištěné obohacené knihovny jsou v případě skladování při teplotě -25 °C až -15 °C stabilní až 7 dní.
- Dojde-li k poškození nebo porušení obalu nebo obsahu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit, obraťte se na zákaznický servis společnosti Illumina.
- Stop Tagment Buffer 2 (ST2) mohou vytvářet viditelné sraženiny nebo krystaly. Pokud se objeví sraženiny, zahřívějte při 37 °C po dobu 10 minut a poté promíchejte ve vortexové třepačce, dokud se sraženiny nerozpustí.
- Hybridization Oligos (HYB) a Enhanced Enrichment Wash Buffer (EEW) musí být předeštěné na stejnou teplotu, jako je teplota pro udržování hybridizace platná pro daný typ vzorku a panel sondy. Další informace o nakládání s NHB2 a EEW naleznete v části [Poznámky k postupu na straně 16](#).
- Enrich Hyb Buffer 2 (EHB2) a hybridizační pufr + blokátory NXT IDT (NHB2) mohou vytvářet krystalky a zákal. Pokud se objeví krystalky a zákal, promíchejte roztok ve vortexové třepačce nebo pipetujte nahoru a dolů, dokud nebude čirý. Před pipetováním nezapomeňte NHB2 předeštět.
- Při nakládání s Cleanup Beads (CB) dodržujte následující osvědčené postupy:
  - Částice nikdy nezmrazujte.
  - Bezprostředně před použitím míchejte částice ve vortexové třepačce, dokud nebudou resuspendovány a barva nebude homogenní.
- Při nakládání s Enrichment BLT Small (eBLTS) dodržujte následující osvědčené postupy:
  - Zkumavku eBLTS uchovávejte ve svislé poloze tak, aby byly částice vždy ponořené v pufru.

- eBLTS důkladně promíchejte ve vortexové třepačce, dokud částice nebudou resuspendovány. Aby se zabránilo opětovnému usazování částic, nedoporučuje se před pipetováním odstředovat.
- Pokud se částice přichytí ke stěně nebo horní části desky s 96 jamkami, odstředujte je při 280 × g po dobu 3 sekund a poté pipetou resuspendujte.
- Při nakládání s deskami indexového adaptéru dodržujte následující osvědčené postupy:
  - Nepřidávejte vzorky na desku indexového adaptéru.
  - Každá jamka desky indexu je určena pouze k jednorázovému použití.

## Potřebné vybavení a materiály, které nejsou součástí dodávky

Kromě Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se před zahájením protokolu ujistěte, že máte potřebné vybavení a materiály.

### Vybavení

Před zahájením protokolu se ujistěte, že máte potřebné vybavení.

Protokol byl optimalizován a validován pomocí položek s uvedenými specifikacemi. Srovnatelný výkon není zaručen při použití vybavení mimo specifikace.

Některé položky jsou vyžadovány pouze pro určité pracovní postupy. Tyto položky jsou uvedeny v samostatných tabulkách.

- Termocyklér s následujícími specifikacemi:
  - Vyhřívané víko
  - Minimální rozsah regulace teploty 10 °C až 98 °C
  - Minimální přesnost teploty ± 0,25 °C
  - Maximální reakční objem 100 µl
  - Kompatibilní s deskami PCR s 96 jamkami a plným lemem
- Inkubátor mikrovzorků s následujícími specifikacemi:
  - Teplotní rozsah okolí +5,0 °C až 99,0 °C
  - Kompatibilní s deskami MIDI s 96 jamkami
- Vložky do inkubátoru mikrovzorků kompatibilní s deskami MIDI s 96 jamkami
- Vysokorychlostní třepačka pro mikrodisky s rozsahem rychlostí míchání 200–3000 ot./min
- Magnetický stojan kompatibilní s deskami PCR s 96 jamkami
- Magnetický stojan kompatibilní s deskami MIDI s 96 jamkami
- Fluorometr kompatibilní s vaší metodou kvantifikace

- Analyzátor fragmentů DNA
- Přesné pipety:
  - Jedno- nebo vícekanálové pipety 10 µl
  - Jedno- nebo vícekanálové pipety 20 µl
  - Jedno- nebo vícekanálové pipety 200 µl
  - Jednokanálové pipety 1000 µl
  - Přesné pipety zajišťují přesné dávkování reagensů a vzorků. Jedno- nebo vícekanálové pipety lze použít, pokud jsou pravidelně kalibrovány a jsou přesné v rozmezí 5 % uvedeného objemu.
- Odstředivka pro mikrodisky
- Mikroodstředivka
- Jeden z následujících Illumina sekvenovacích systémů:
  - Přístroj MiSeqDx, kat. č. DX-410-1001
  - Přístroj NextSeq 550Dx, kat. č. 20005715 s volitelným serverem Illumina DRAGEN Server for NextSeq 550Dx, kat. č. 20086130
  - Přístroj NovaSeq 6000Dx, kat. č. 20068232
- [Volitelné] Vakuový koncentrátor
- [FFPE] Systém detekce PCR v reálném čase

## Materiály

Před zahájením protokolu se ujistěte, že máte potřebné materiály.

Některé položky jsou vyžadovány pouze pro určité pracovní postupy. Tyto položky jsou uvedeny v samostatných tabulkách.

Protokol byl optimalizován a validován pomocí uvedených položek. Při použití alternativních materiálů není zaručena srovnatelná funkčnost.

- Pipetovací špičky s filtrem
- Kónické odstředivé zkumavky, 15 ml nebo 50 ml
- Zkumavky mikroodstředivky, 1,5 ml
- Vícekanálové zásobníky reagensů bez RNázy/DNázy, jednorázové
- Stripy a uzávěry pro 8 zkumavek bez RNázy/DNázy
- Sérologické pipety
- 0,8 ml polypropylenová deska Deepwell s 96 jamkami pro uchovávání (deska MIDI)
- Desky PCR Hard-Shell s 96 jamkami a s plným lemem
- [FFPE] Desky qPCR kompatibilní s přístrojem qPCR
- Lepicí těsnění na desky s 96 jamkami s následujícími specifikacemi:

- Odlupovací, opticky čirý polyester
- Vhodné na desky PCR s lemem
- Silné lepidlo, které odolává opakovaným změnám teploty v rozsahu -40 °C – 110 °C
- Bez DNáz/RNáz
- Plastové spotřební materiály kompatibilní s vybranou metodou kvantifikace
- Fluorometrická sada pro kvantifikaci dsDNA kompatibilní se zvoleným kvantifikačním systémem:
  - Pro kvantifikaci předem obohacených amplifikovaných knihoven lze použít sadu pro kvantifikaci se širokým rozsahem.
  - U kvantifikace obohacených knihoven závisí rozsah sady pro kvantifikaci na použitém panelu sondy.
- Sada pro analýzu fragmentů pro kvalifikaci knihovny s vybraným kvalifikačním systémem:
  - Pro kvalifikaci předem obohacených amplifikovaných knihoven lze použít sadu se širokým rozsahem.
  - U kvalifikace obohacených knihoven závisí rozsah sady pro kvalifikaci na použitém panelu sondy.
- **[Volitelné]** Souprava pro extrakci DNA z lidských buněk a tkáně. Můžete použít jakoukoli schválenou metodu extrakce.

## Sběr, přeprava a skladování vzorků



### UPOZORNĚNÍ

Se všemi vzorky zacházejte tak, jakoby byly potenciálně infekčními činidly.

- Tento rozbor je kompatibilní s genomovou DNA získanou z lidských buněk a tkání.
- U komerčně dostupné purifikované gDNA se ujistěte, že vzorky byly přepravovány za správných podmínek a skladovány podle pokynů výrobce. Dodržujte osvědčené postupy pro skladování a cykly zmrazování a rozmrazování gDNA.
- V případě vstupu plné krve dodržujte požadavky na odběr, přepravu a skladování krve platné pro zvolenou metodu extrakce DNA. Lze použít jakoukoli validovanou metodu extrakce. Přeprava plné krve musí splňovat všechny státní, federální a místní předpisy pro přepravu patogenů.
- Pro extrakci DNA z tkáně FFPE lze použít jakoukoli validovanou metodu extrakce. Při určování následujících postupů se řiďte pokyny a doporučeními platnými pro zvolenou metodu extrakce:
  - Formalínová fixace a metoda zalití tkání do parafínu pro zajištění nejlepší kvality extrahované DNA.
  - Uchovávání vzorků FFPE.
  - Požadavky na výchozí materiál, jako je počet a tloušťka řezů FFPE. Většina metod purifikace doporučuje používat čerstvě nařezané řezy.

## Varování a preventivní opatření

- Reagencie Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit obsahují potenciálně nebezpečné chemické látky. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k újmě na zdraví. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika expozice. S použitými reagenциemi nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a předpisy platnými ve vaší zemi. Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete v bezpečnostních listech (SDS) na stránce [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- Neprodleně nahlase veškeré závažné události související s tímto produktem společnosti Illumina a příslušným orgánům členských států, ve kterých uživatel a pacient sídlí.
- Se všemi vzorky krve zacházejte tak, jako by byly infikovány virem lidské imunodeficiency (HIV), lidským virem hepatitidy B (HBV) a dalšími krevními patogeny (univerzální opatření).
- Dodržujte běžná laboratorní preventivní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejzte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a sadami reagenциí používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a sadami reagenциí si důkladně umyjte ruce.
- Chcete-li zabránit degradaci vzorku nebo reagenциe, zajistěte, aby byly před zahájením protokolu plně rozptýleny všechny páry chlornanu sodného vzniklé čištěním.
- Kontaminace vzorků jinými produkty/amplikony PCR může vést k nepřesným a nespolehlivým výsledkům. Abyste zabránili kontaminaci, používejte následující osvědčené postupy:
  - Dodržujte správné laboratorní postupy a laboratorní hygienu.
  - Provedte kroky pracovního postupu v určených oblastech před amplifikací nebo po amplifikaci.
  - Použité reagenциe před čištěním knihoven uložte do prostoru pro předamplifikaci.
  - Preamplifikační reagenциe oddělte od postamplifikačních reagenциí.
  - Ujistěte se, že prostory pro předamplifikaci a postamplifikaci mají vyhrazené vybavení, jako jsou pipety, hroty pipet, vortexová třepačka a odstředivka.
- Zabraňte křížové kontaminaci. Pro odlišné vzorky nebo dispenzní reagenциe používejte čerstvé hroty pipet. Použití filtrovaných hrotů snižuje riziko přenosu amplikonů a křížové kontaminace mezi vzorky.
  - Při přidávání nebo přenášení vzorků nebo hlavních směsí reagenциí vyměňujte mezi jednotlivými vzorky hroty.
  - Při přidávání indexových adaptérů pomocí vícekanálové pipety vyměňujte mezi jednotlivými řádky nebo sloupci hroty. Pokud používáte jednodanálovou pipetu, vyměňte mezi jednotlivými vzorky hroty.
  - Z pracovního prostoru odstraňujte nepoužívané desky indexového adaptéru.
- Pro kroky mytí ethanolem použijte následující osvědčené postupy:
  - Vždy připravte čerstvý 80 % ethanol. Ethanol může absorbovat vodu ze vzduchu, což potenciálně ovlivňuje výsledky.
  - Dbejte na to, aby byl během promývání ze dna jamek odstraněn veškerý ethanol. Zbytky ethanolu mohou mít vliv na výsledky.

- Dodržujte stanovenou dobu schnutí pro kroky magnetického stojanu, aby se zajistilo úplné odpaření. Zbytečný ethanol může ovlivnit účinnost následných reakcí.
- Hlavní směsi připravujte vždy před použitím a nikdy neskladujte kombinované pracovní roztoky.
- Účinnost Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit není zaručena, pokud nejsou dodrženy postupy uvedené v příbalové informaci.
- Nepoužívejte žádné součásti sady po uplynutí doby použitelnosti uvedené na štítku sady.
- Nezaměňujte složky sady se složkami z jiných sad Illumina DNA Prep with Enrichment Dx. Sady jsou označeny na štítku sady.

## Poznámky k postupu

### Doporučení pro vstup DNA

Protokol Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilní se vstupy vysoce kvalitní dvouvláknové genomické DNA (gDNA) 50–1000 ng.

Ujistěte se, že počáteční vzorek gDNA neobsahuje > 1 mM EDTA a je bez organických kontaminantů, jako je fenol a etanol. Tyto látky mohou interferovat s reakcí tagmentace a vést k selhání rozboru.

#### Vstup gDNA $\geq$ 50 ng

Pro vstupy gDNA v rozmezí 50–1000 ng není kvantifikace a normalizace počátečního vzorku gDNA nutná.

#### Vstup gDNA < 50 ng

Vstupy DNA 10–50 ng lze použít s následujícími úpravami:

- Při použití vstupu gDNA 10–49 ng se doporučuje kvantifikovat počáteční vzorek gDNA, aby bylo možné určit počet cyklů PCR potřebných po označení. Pro kvantifikaci vstupu dvouvláknové gDNA použijte metodu založenou na měření fluorescence. Vyhněte se metodám, které měří celkovou nukleovou kyselinu, jako je NanoDrop nebo jiné metody UV absorbance.
- Tento protokol nenormalizuje konečné výtěžky předem obohacených knihoven z 10–49 ng gDNA, proto je nutná kvantifikace a normalizace před a po obohacení knihoven.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit byl charakterizován a ověřen pro vstupy DNA 50–1000 ng. Pro vstupy gDNA < 50 ng nelze zaručit ekvivalentní účinnost produktu.

### Doporučení pro vstup krve

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilní s gDNA extrahovanou z periferní plné krve. Lze použít jakoukoli validovanou metodu extrakce. Při extrakci gDNA z plné krve není nutná počáteční kvantifikace vstupu DNA a Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit vytváří výtěžky normalizovaných předem obohacených knihoven.



Množství DNA získané ze vzorků plné krve, a tedy i normalizaci knihovny, mohou nepříznivě ovlivnit následující faktory:

- Věk vzorku krve
- Podmínky skladování
- Základní zdravotní stav ovlivňující počet bílých krvinek

## Doporučení pro vstupní materiál vzorků tkáně FFPE

Pro určení vhodného vstupu pro úspěšnou přípravu knihovny použijte následující kritéria kvality DNA FFPE:

- Pro vzorky FFPE s hodnotou  $\Delta Cq \leq 5$  je doporučená vstupní hmotnost DNA 50–1000 ng.
- Illumina DNA Prep with Enrichment Dx se nedoporučuje pro nekvalitní vzorky FFPE s  $\Delta Cq > 5$ . Použití vzorků s  $\Delta Cq > 5$  je možné, ale může zvýšit pravděpodobnost selhání přípravy knihovny nebo snížit účinnost rozboru.

### Extrakce FFPE

Použijte metodu izolace nukleových kyselin, která poskytuje vysokou výtěžnost, minimalizuje spotřebu vzorku a zachovává jeho integritu. Pro extrakci DNA ze vzorků FFPE můžete použít jakoukoli validovanou metodu. U gDNA extrahované z tkáně FFPE je nutná počáteční kvantifikace vstupní DNA a Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit nevytváří výtěžky normalizovaných předem obohacených knihoven.

### Kvalifikace DNA FFPE

gDNA extrahovaná z tkáně FFPE musí být před použitím kvalifikována. Pro optimální výkon posuzujte kvalitu vzorků DNA pomocí validované extrakční metody pro kvalifikaci DNA extrahované ze vzorků FFPE. Protokol Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit je kompatibilní se vzorky DNA FFPE s hodnotou  $\Delta Cq \leq 5$ . Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit se nedoporučuje pro nekvalitní vzorky FFPE s hodnotou  $\Delta Cq > 5$ . Použití vzorků s  $\Delta Cq > 5$  je možné, ale může zvýšit pravděpodobnost selhání přípravy knihovny nebo snížit účinnost rozboru.

### [Volitelné] Referenční vzorky FFPE

Při provádění protokolu použijte jako pozitivní kontrolu charakterizované referenční materiály, například Horizon HD799 (DNA). Jako referenční vzorky lze použít také kvalifikované materiály FFPE z xenografů odvozených od buněčné linie. Ke kvantifikaci referenčních materiálů před použitím použijte metodu založenou na měření fluorescence.

**POZNÁMKA** Zpracování pozitivního kontrolního referenčního vzorku nebo kontrola bez šablony spotřebovává reagentie a snižuje celkový počet neznámých vzorků, které lze zpracovat.

## Doporučení vstupního materiálu vzorků

Doporučení vstupního materiálu vzorků pro Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jsou shrnuta v následující tabulce.

Tabulka 1 Doporučení vstupního materiálu vzorků

Typ vstupního materiálu vzorků	Množství vstupního materiálu vzorků	Vyžadovaná kvantifikace vstupu DNA	Požadovaná kvalita vstupu DNA	Výtěžnost normalizované předem obohacené knihovny
gDNA	10–49 ng	Ano	Poměr 260/280 1,8–2,0	Ne
gDNA	50–1000 ng	Ne	Poměr 260/280 1,8–2,0	Ano
gDNA z krve	50–1000 ng	Ne	Poměr 260/280 1,8–2,0	Ano
gDNA z FFPE	50–1000 ng	Ano	Hodnota $\Delta Cq \leq 5$	Ne

Doporučené cykly PCR pro program PCR eBLTS jsou upraveny na základě koncentrace a kvality vstupního materiálu vzorků. Další informace naleznete v části [Amplifikace tagmentované DNA na straně 28](#).

## Tipy a techniky

### Zabraňte křížové kontaminaci

- Při přidávání nebo přenášení vzorků vyměňujte mezi *jednotlivými vzorky* hroty.
- Při přidávání indexových adaptérů pomocí vícekanálové pipety vyměňujte mezi *jednotlivými řádky* nebo *sloupci* hroty. Pokud používáte jednorávkovou pipetu, vyměňte mezi jednotlivými vzorky hroty.

### Utěsnění desky

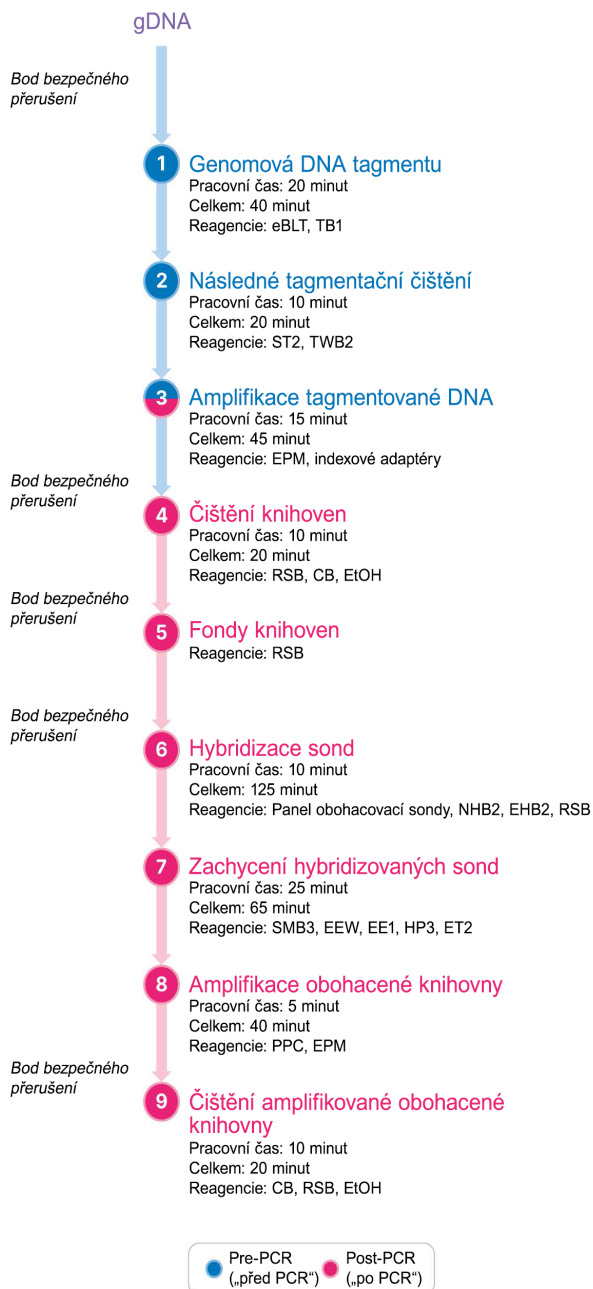
- Před následujícími kroky v protokolu vždy utěsněte desku s 96 jamkami novým lepicím těsněním pomocí gumového válečku, který desku zakryje:
  - Kroky míchání v třepačce
  - Kroky inkubace. Nesprávné utěsnění desky může vést k odpařování během inkubace.
  - Kroky odstředování
  - Kroky hybridizace
- Ujistěte se, že jsou okraje a jamky důkladně utěsněné. Sníží se tím riziko křížové kontaminace a odpařování.
  - Pokud se na těsnění nebo na stěnách jamek desky objeví tekutina nebo kondenzace, můžete před odlepením těsnění případně provést odstředění.
- Položte desku na rovný povrch a poté opatrně sejměte těsnicí fólii.

**Nakládání s Enrichment BLT Small (eBLTS)**

- Zásobní zkumavku eBLTS uchovávejte v chladničce ve svislé poloze tak, aby byly částice vždy ponořené v pufu.
- Bezprostředně před použitím zásobní zkumavku eBLTS důkladně promíchejte, dokud nebudou částice resuspendovány. Aby se zabránilo opětovnému usazování částic, nedoporučuje se před pipetováním odstřeďovat.
- Pokud se částice přichytí ke stěně nebo horní části desky s 96 jamkami, odstřeďte je při 280 × g po dobu 3 sekund a poté pipetou resuspendujte.
- Při mytí eBLTS:
  - Použijte vhodný magnetický stojan pro danou desku.
  - Ponechte desku na magnetickém stojanu, dokud nebude v pokynech uvedeno, že ji máte odebrat.
  - Pokud jsou částice nasáty do pipetových hrotů, vraťte je zpět na desku na magnetickém stojanu a počkejte, dokud tekutina nezprůhlední (2 minuty).

# Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit Pracovní postup

Následující diagram ilustruje pracovní postup Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit. Mezi kroky jsou vyznačeny body bezpečného přerušení. Odhady času jsou založeny na zpracování 12 vzorků při 12plexovém obohacení.



## Návod k použití

Tato kapitola popisuje protokol Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit.

- Zkontrolujte plánovaný kompletní pracovní postup sekvenování, od vzorku po analýzu, abyste zajistili kompatibilitu produktů a parametrů experimentu.
- Než budete pokračovat, ověřte si obsah sady a ujistěte se, že máte potřebné součásti, vybavení a materiály.
  - Biotinylované sondy třetích stran musí splňovat specifické požadavky. V části [Požadavky na panel obohacovacích sond na straně 10](#) se ujistěte, že sondy třetích stran splňují požadavky.
- Postupujte podle protokolu v uvedeném pořadí s použitím specifikovaných objemů a parametrů inkubace.
- Pokud v protokolu není stanoven bod bezpečného přerušování, přejděte ihned k dalšímu kroku.
- Při vytváření hlavní směsi je v poskytnutých objemech zahrnut přebytek.
- Ujistěte se, že pro daný typ desky používáte vhodný magnetický stojan.

## Příprava na sdružování

Tento krok je nutný k zajištění úspěšného sekvenování obohacených knihoven. Sdružování knihoven může probíhat před obohacením a před sekvenováním.

**Před obohacením** – jednotlivé indexované amplifikované knihovny jsou sdruženy pro obohacení vybraným panelem sond. Tím se vytvoří multiplexní fond obohacených knihoven. Zpracování vstupního materiálu vzorků FFPE bylo testováno a doporučuje se výhradně pro jednoplexové reakce obohacení Pro vysoce kvalitní gDNA byly testovány 12plexové, ale je možné použít i 2- až 11plexové.

**Před sekvenováním** – 1plexové obohacené knihovny a/nebo multiplexní obohacené knihovny se vloží do fondu před sekvenováním. Počet obohacených knihoven, které lze sekvenovat, závisí na cílové hloubce čtení pro každý vzorek ve vašem sekvenačním systému.

## Unikátní dvojitě indexování

Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit používá unikátní dvojitě indexy.

- Knihovny s dvojitým indexováním přidávají sekvence indexu 1 (i7) a indexu 2 (i5) a vytvářejí jedinečně označené knihovny.
- Indexy UD mají odlišné, nesouvisející sekvence indexů pro čtení indexů i7 a i5. Indexy jsou dlouhé 10 bází.

Výběr indexových adaptérů s různými sekvencemi pro sdružené knihovny optimalizuje vyvážení barev pro úspěšné sekvenování a analýzu dat. Fondy plexit, které jsou  $\geq 10$ plexové, jsou ze své podstaty barevně vyvážené, takže můžete použít libovolnou kombinaci indexových adaptérů. Během běhu sekvenování poskytuje modul DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager možnosti barevně vyvážených kombinací indexů a upozorní vás, pokud ve vybraných kombinacích indexů není dostatečná rozmanitost.

Informace o sekvencích indexových adaptérů UD Illumina a rozložení desek naleznete v [Příloha: Illumina UD Indexes Adapter Sequences na straně 63](#)

## Podporované obohacovací plexity

Reagencie Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jsou konfigurovány a testovány při jednoplexové a 12plexové obohacovací plexitě. Ačkoli je možné obohacovat i jiné plexity, některé plexity vyžadují reagencie pro dodatečnou přípravu knihovny před obohacením a panel obohacovací sondy.

Získání vhodné výtěžnosti obohacení pro nestandardní plexitu obohacení může vyžadovat další optimalizaci. Optimální výsledky nejsou zaručeny.

- **Plexita obohacení** – Počet předem obohacených knihoven (1–12) sdružených dohromady v jedné reakci obohacení pro hybridizaci s panely obohacovacích sond. Například kombinace 12 předem obohacených knihoven dohromady vytvoří 12plexový obohacovací fond.
- **Reakce obohacení** – Počet jedinečných příprav reakcí obohacení bez ohledu na počet předem obohacených knihoven sdružených do jedné reakce. Například z jediné reakce obohacení lze připravit 1- nebo 12plexový obohacovací fond.

Pro výpočet celkového počtu následně obohacených knihoven vynásobte plexitu obohacení na reakci počtem reakcí obohacení. Například jediná reakce obohacení 12plexového obohacovacího fondu vytváří fond 12 následně obohacených knihoven.

Při sdružování předem obohacených knihoven podporují reagencie Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit následující reakce obohacení a plexitu.

Reagencie Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit	Reakce obohacení	Plexita obohacení
Souprava pro 16 vzorků	16 reakcí	Jednoplexové
Souprava pro 96 vzorků	8 reakcí	12plexové

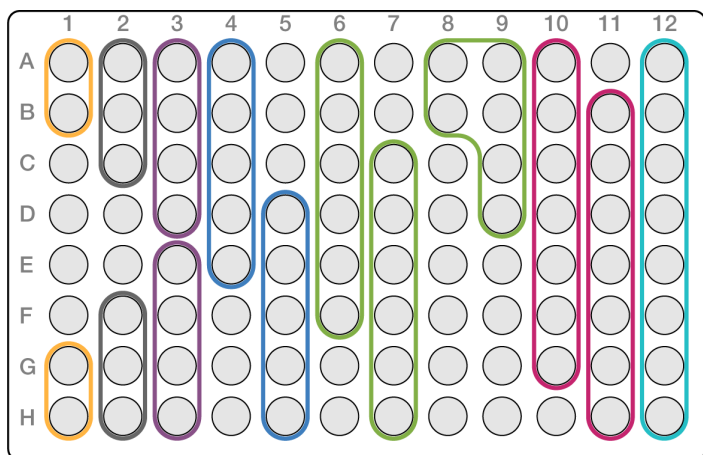
## Strategie 2- až 8plexového sdružování

Následující tabulka uvádí indexové adaptéry (jamky), které lze kombinovat ve 2–8plexovém fondu, zatímco barevně označený obrázek znázorňuje jednotlivé kombinace.

Sdružte libovolnou plexitu  $\geq 2$  z horní nebo dolní části sloupce. Nesdružujte napříč řádkem.

Plexita	Kombinace	Barva na obrázku
2	První dvě nebo poslední dvě jamky ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A a B</li> <li>• G a H</li> </ul> Řádky C–F se nepoužívají.	Oranžová

Plexita	Kombinace	Barva na obrázku
3	První tři nebo poslední tři jamky ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–C</li> <li>• F–H</li> </ul> Řádky D a E se nepoužívají.	Šedá
4	První čtyři nebo poslední čtyři jamky ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–D</li> <li>• E–H</li> </ul>	Fialová
5	Prvních pět nebo posledních pět jamek ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–E</li> <li>• D–H</li> </ul>	Modrá
6	[Možnost 1] Prvních šest nebo posledních šest jamek ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–F</li> <li>• C–H</li> </ul> [Možnost 2] První dvě jamky (A a B) nebo poslední dvě jamky (G a H) v jednom sloupci a všechny čtyři jamky ve vedlejším sloupci.	Zelená
7	Prvních sedm nebo posledních sedm jamek ve sloupci: <ul style="list-style-type: none"> <li>• A–G</li> <li>• B–H</li> </ul>	Růžová
8	Celý sloupec.	Modrozelená

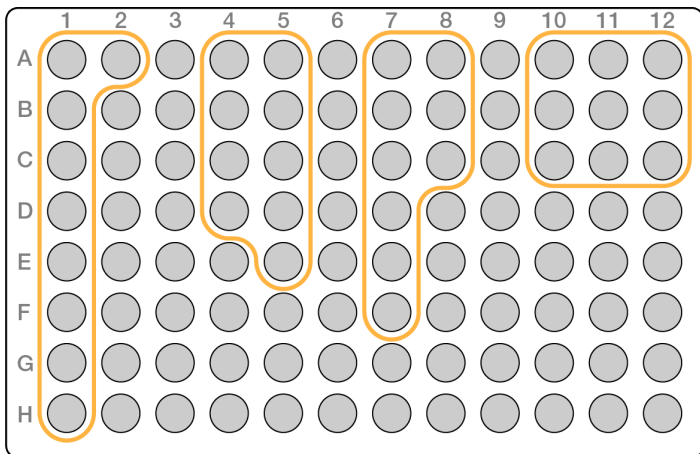


## Strategie 9plexového sdružování

Použijte indexové adaptéry z libovolných jamek, které optimalizují vyvážení barev při sekvenování, například:

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

Následující obrázek znázorňuje všechny čtyři příklady.



## Genomová DNA tagmentu

V tomto kroku se používá Enrichment BLT Small (eBLTS) k tagmentování DNA, což je proces, který fragmentuje a označuje DNA pomocí sekvencí adaptérů.

### Spotřební materiál

- eBLTS (Enrichment BLT Small) (žlutý uzávěr)
- TB1 (Tagmentation Buffer 1)
- Voda bez nukleázy
- Deska PCR s 96 jamkami
- Lepicí těsnění
- Zkumavky mikroadstředivky, 1,7 ml
- Strip s 8 zkumavkami
- Hroty pipet
  - Vícekanálové pipety o objemu 200 µl





## UPOZORNĚNÍ

Tato sada reagensií obsahuje potenciálně nebezpečné chemické látky. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k újmě na zdraví. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika expozice. S použitými reagensiemi nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a předpisy platnými ve vaší zemi. Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete v bezpečnostních listech (SDS) na stránce [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

## O reagensiích

- eBLTS musí být skladovány při teplotách 2 °C až 8 °C. Nepoužívejte eBLTS, který byl skladován při teplotě nižší než 2 °C.
- eBLTS neodstředujte.

## Příprava

- Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
eBLTS (žlutý uzávěr)	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě. Těsně před použitím promíchejte ve vortexové třepačce. Před pipetováním neodstředujte.
TB1	-25 °C až -15 °C	Přiveďte k pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce.

- DNA promíchejte ve vortexové třepačce nebo pipetujte a poté krátce odstředte.
- Uložte následující program TAG do termocykléru:
  - Zvolte možnost přehřátí víka a nastavte teplotu na 100 °C.
  - Nastavte reakční objem na 50 µl.
  - 55 °C po dobu 5 minut
  - Udržujte při teplotě 10 °C.

## Postup

1. Do každé jamky desky PCR s 96 jamkami přidejte 2–30 µl DNA tak, aby celkové vstupní množství bylo 50–1000 ng.  
Pokud je objem DNA < 30 µl, přidejte ke vzorkům DNA vodu bez nukleázy, aby celkový objem dosáhl 30 µl.
2. eBLTS důkladně promíchejte ve vortexové třepačce, dokud částice nebudou zcela resuspendovány.
3. Pro přípravu směsi Tagmentation Master Mix zkombinujte ve zkumavce následující objemy. Každý objem vynásobte počtem zpracovávaných vzorků.
  - eBLTS (11,5 µl)
  - TB1 (11,5 µl)Přebytky reagensů jsou zahrnuty v objemu.
4. Směs Tagmentation Master Mix důkladně pipetujte, aby se promíchala.
5. Rozdělte objem směsi Tagmentation Master Mix rovnoměrně do stripu s 8 zkumavkami.
6. Pomocí vícekanálové pipety o objemu 200 µl přeneste 20 µl směsi Tagmentation Master Mix do každé jamky desky PCR obsahující vzorek. Pro každý sloupec nebo řádek vzorku použijte nové hroty.
7. Po dávkování směsi Tagmentation Master Mix zlikvidujte strip s 8 zkumavkami.
8. Pomocí vícekanálové pipety o objemu 200 µl nastavené na 40 µl pipetujte každý vzorek 10krát, aby se promíchal. Pro každý sloupec vzorku použijte nové hroty.  
Případně desku PCR uzavřete a protřepávejte ve třepačce na desky při 1600 ot./min po dobu 1 minuty.
9. Desku uzavřete a poté ji umístěte na předprogramovaný termocyklér a spusťte program TAG.
10. Počkejte, dokud program TAG nedosáhne udržovací teploty 10 °C, a poté desku okamžitě vyjměte.
11. Nechte desku PCR s 96 jamkami po dobu 2 minut stát při pokojové teplotě a poté přejděte k dalšímu kroku.

## Následné tagmentační čištění

Tímto krokem se DNA označená adaptérem na eBLTS před amplifikací PCR promyje.

### Spotřební materiál

- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)
- TWB2 (Tagment Wash Buffer 2)
- Magnetický stojan desky PCR s 96 jamkami
- Lepicí těsnění
- Strip s 8 zkumavkami
- Hroty pipet
  - Vícekanálové pipety o objemu 20 µl
  - Vícekanálové pipety o objemu 200 µl
- Připravte se na pozdější postup:

- EPM (Enhanced PCR (EPM))
- Deska indexového adaptéru

## O reagentech

- Ujistěte se, že pro vaši desku používáte vhodný magnetický stojan. Použití magnetického stojanu desky MIDI pro desku PCR by mohlo zabránit přilnutí TWB2 k částicím.
- TWB2 pipetujte pomalu, abyste minimalizovali pění a předešli nesprávnému nasátí objemu a neúplnému promíchání.

## Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte na ledu po dobu 1 hodiny. Převertte, aby se obsah promíchal, poté krátce odstřed'te.
ST2	15 °C až 30 °C	Pokud se objeví sraženiny, zahřívajte při 37 °C po dobu 10 minut a poté promíchejte ve vortexové třepačce, dokud se sraženiny nerozpustí. Používejte při pokojové teplotě.
TWB2	15 °C až 30 °C	Používejte při pokojové teplotě.
Deska indexového adaptéru	-25 °C až -15 °C	Nechte 30 minut rozmrazovat při pokojové teplotě.

## Postup

1. Ke každé reakci tagmentace přidejte 10 µl ST2. Pokud používáte vícekanálovou pipetu, pipetujte ST2 do stripu s 8 zkumavkami a poté přeneste příslušné objemy na desku PCR. Pro každý sloupec nebo řádek vzorku použijte nové hroty.
2. Pomocí 200 µl pipety nastavené na 50 µl pomalu 10krát pipetujte každou jamku, abyste částice resuspendovali. Případně desku uzavřete a protřepávejte při 1600 ot./min po dobu 1 minuty. Podle potřeby opakujte.
3. Desku uzavřete a poté odstřed'ujte při 280 × g po dobu 10 sekund.
4. Inkubujte 5 minut při pokojové teplotě.
5. Umístěte na magnetický stojan desky PCR a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (3 minuty).
6. [≤ 48 vzorků] Třikrát promyjte následujícím způsobem.
  - a. Pomocí vícekanálové pipety o objemu 200 µl nastavené na 60 µl odeberte a zlikvidujte supernatant, aniž byste narušili shluk částic.
  - b. Vyjměte z magnetického stojanu.
  - c. Ihned poté pomalu přidejte 100 µl TWB2 přímo na částice.

- d. Pomalu pipetujte, dokud nejsou částice zcela resuspendovány. Případně desku uzavřete a protřepávejte při 1600 ot./min po dobu 1 minuty.
  - e. Pokud dojde k rozstříku, odstřed'ujte při 280 × g po dobu 10 sekund.
  - f. Umístěte na magnetický stojan desky PCR a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (3 minuty). Při třetím promývání nechte desku na magnetickém stojanu a TWB2 v jamkách, aby nedošlo k přesušení. Po přípravě hlavní směsi PCR Master Mix odstraňte a zlikvidujte supernatant.
  - g. Pomocí vícekanálové pipety o objemu 200 µl nastavené na 100 µl odeberte a zlikvidujte supernatant.
  - h. Kroky c–f opakujte dvakrát pro celkem tři promytí.
7. [> 48 vzorků] Třikrát promyjte následujícím způsobem.
- a. Kroky b a c provádějte v krocích po 1 až 2 sloupcích, dokud nezpracujete všechny sloupce, aby nedošlo k přesušení.
  - b. Pomocí vícekanálové pipety o objemu 200 µl nastavené na 60 µl odeberte a zlikvidujte supernatant.
  - c. Vyjměte z magnetického stojanu.
  - d. Ihned poté pomalu vypouštějte 100 µl TWB2 přímo na částice.
  - e. Pomalu pipetujte, dokud nejsou částice zcela resuspendovány. Případně desku uzavřete a protřepávejte při 1600 ot./min po dobu 1 minuty.
  - f. Pokud dojde k rozstříku, odstřed'ujte při 280 × g po dobu 10 sekund.
  - g. Umístěte na magnetický stojan desky PCR a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (3 minuty). Při třetím promývání nechte desku na magnetickém stojanu a TWB2 v jamkách, aby nedošlo k přesušení. Po přípravě hlavní směsi PCR Master Mix odstraňte a zlikvidujte supernatant.
  - h. Pomocí vícekanálové pipety o objemu 200 µl nastavené na 100 µl odeberte a zlikvidujte supernatant.
  - i. Vyjměte z magnetického stojanu a pomalu přidejte 100 µl TWB2 přímo na částice.
  - j. Kroky h a i opakujte v krocích po 1 nebo 2 sloupcích, dokud nezpracujete všechny sloupce.
  - k. Kroky e–h opakujte dvakrát pro celkem tři promytí.
8. Ponechte na magnetickém stojanu až do kroku 4 v části *Postup* v části *Amplifikace tagmentované DNA*. TWB2 zůstává v jamkách, aby se zabránilo nadměrnému vyschnutí částic.

## Amplifikace tagmentované DNA

V tomto kroku se tagmentovaná DNA amplifikuje pomocí programu PCR s limitovaným cyklem. V kroku PCR se přidávají adaptéry indexu 1 (i7), adaptéry indexu 2 (i5) a sekvence potřebné pro generování klastrů sekvenování.

### Spotřební materiál

- EPM (Enhanced PCR (EPM))
- Deska indexového adaptéru
- Deska PCR s 96 jamkami
- Voda bez nukleázy

- Lepicí těsnění
- Zkumavky mikroadstředivky, 1,5 ml
- Hroty pipet
  - Vícekanálové pipety o objemu 20 µl
  - Vícekanálové pipety o objemu 200 µl

## O reagentech

- Desky indexového adaptéru
  - Jamka může obsahovat > 10 µl indexových adaptérů.
  - Nepřidávejte vzorky na desku indexového adaptéru.
  - Každá jamka desky indexu je určena pouze k jednorázovému použití.

## Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte při 4 °C nebo na ledu po dobu 1 hodiny. Převertte, aby se obsah promíchal, poté krátce odstředte.
Deska indexového adaptéru	-25 °C až -15 °C	Nechte 30 minut rozmrazovat při pokojové teplotě.

2. Následující program PCR eBLTS uložte do termocykléru s použitím příslušného počtu cyklů PCR uvedených v tabulce níže.
  - Zvolte možnost předehřátí víka a nastavte teplotu na 100 °C.
  - Nastavte reakční objem na 50 µl.
  - 72 °C po dobu 3 minut
  - 98 °C po dobu 3 minut
  - X cyklů:
    - 98 °C po dobu 20 sekund
    - 60 °C po dobu 30 sekund
    - 72 °C po dobu 1 minuty
  - 72 °C po dobu 3 minut
  - Udržujte při teplotě 10 °C.

Celková doba provozu je ~38 minut pro 9 cyklů a ~46 minut pro 12 cyklů.

Typ vstupního materiálu vzorků	Počet cyklů PCR (X)
10–49 ng gDNA	12
50–1000 ng gDNA	9
50–1000 ng gDNA extrahované z FFPE	12
gDNA extrahovaná z krve	9

## Postup

- Pro přípravu směsi PCR Master Mix zkombinujte následující. Každý objem vynásobte počtem zpracovávaných vzorků.
  - EPM (23 µl)
  - Voda bez nukleázy (23 µl)
 Přebytky reagensů jsou zahrnuty v objemu.
- Směs PCR Master Mix 10krát pipetujte, aby se promíchala, a poté krátce odstředte.
- Když je deska na magnetickém stojanu, odeberte ji pomocí vícekanálové pipety o objemu 200 µl a zlikvidujte TWB2.  
Pěna, která zůstává na stěnách jamek, nemá na knihovnu nepříznivý vliv.
- Vyjměte z magnetického stojanu.
- Ihned přidejte 40 µl směsi PCR Master Mix přímo na částice v každé jamce.
- Okamžitě pipetujte, aby se obsah promíchal, dokud se částice zcela nerozpustí. Případně desku uzavřete a protřepávejte při 1600 ot./min po dobu 1 minuty.
- Desku se vzorkem uzavřete a odstředíte při 280 × g po dobu 10 sekund.
- Odstředíte desku indexového adaptéru při 1000 × g po dobu 1 minuty.
- Připravte desku indexového adaptéru.
  - [< 96 vzorků] Propíchněte těsnicí fólii na desce indexového adaptéru novým hrotem pipety pro každou jamku pouze pro takový počet vzorků, které se budou zpracovávat.
  - [96 vzorků] Zarovnejte novou desku PCR s polovičním lemlem nad desku indexového adaptéru a zatlačte ji dolů, abyste propíchnuli těsnicí fólii. Desku PCR použitou k propíchnutí těsnicí fólie zlikvidujte.
- Pomocí nového hrotu pipety přidejte do každé jamky 10 µl předem spárovaných indexových adaptérů.
- Pomocí pipety nastavené na 40 µl 10krát pipetujte, aby došlo k promíchání. Případně desku uzavřete a protřepávejte při 1600 ot./min po dobu 1 minuty.
- Desku uzavřete a poté odstředíte při 280 × g po dobu 10 sekund.
- Vložte na termocyklér a spusťte eBLTS program PCR.

## BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, skladujte při teplotě od -25 °C do -15 °C po dobu až 30 dní.

## Čištění knihoven

V tomto kroku se k purifikaci amplifikovaných knihoven používá postup oboustranné purifikace částic.

### Spotřební materiál

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Čerstvě připravený 80 % ethanol (EtOH)
- 0,8 ml polypropylenová deska Deepwell s 96 jamkami pro uchovávání (deska MIDI)
- Deska PCR s 96 jamkami
- Magnetický stojan desky MIDI
- Magnetický stojan desky PCR
- Zkumavky mikroadstředivky, 1,5 ml
- Voda bez nukleázy

### O reagentech

- Cleanup Beads
  - Před každým použitím promíchejte ve vortexové třepačce.
  - Často promíchejte ve vortexové třepačce, abyste se ujistili, že jsou částice rovnoměrně rozloženy.
  - Nasávejte a vypouštějte pomalu vzhledem k viskozitě roztoku.

### Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
CB	Pokožová teplota	Promíchejte ve vortexové třepačce a převracejte, dokud není barva kapaliny homogenní.
RSB	2 °C až 8 °C	Rozmrazujte 30 minut při pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce.

### Postup

1. Protřepávejte desku PCR s 96 jamkami při 1800 ot./min. po dobu 1 minuty a poté krátce odstředte.
2. Umístěte na magnetický stojan desky PCR a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (1 minutu).
3. CB třikrát promíchejte ve vortexové třepačce po dobu 10 sekund a poté několikrát převraťte, aby došlo k resuspendaci.
4. U vysoce kvalitní gDNA postupujte následovně.

- a. Do každé jamky nové desky MIDI přidejte 77 µl vody bez nukleázy.
  - b. Do každé jamky desky MIDI přidejte 88 µl CB.
  - c. Přeneste 45 µl supernatantu z každé jamky desky PCR do odpovídající jamky desky MIDI.
  - d. Zlikvidujte desku PCR.
  - e. Každou jamku pipetujte 10krát, abyste obsah promíchali. Případně desku uzavřete a protřepávejte při 1800 ot./min po dobu 1 minuty.
  - f. Desku uzavřete a inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
  - g. Zkontrolujte, zda se netvoří vzduchové bubliny. Pokud se tvoří, proveďte odstředění.
  - h. Umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (5 minut).
  - i. Během inkubace CBDůkladně promíchejte ve vortexové třepačce a poté přidejte 20 µl do každé jamky nové desky MIDI.
  - j. Přeneste 200 µl supernatantu z každé jamky první desky MIDI do odpovídající jamky nové desky MIDI (obsahující 20 µl CB).
  - k. Zlikvidujte první desku MIDI.
  - l. Každou jamku nové desky MIDI pipetujte 10krát, abyste obsah promíchali. Případně desku uzavřete a protřepávejte při 1800 ot./min po dobu 1 minuty.
5. U extrahovaného FFPE postupujte následovně.
- a. Přidejte 81 µl CB do každé jamky nové desky MIDI.
  - b. Přeneste 45 µl supernatantu z každé jamky desky PCR do odpovídající jamky desky MIDI.
  - c. Zlikvidujte desku PCR.
  - d. Každou jamku pipetujte 10krát, abyste obsah promíchali. Případně desku uzavřete a protřepávejte při 1800 ot./min po dobu 1 minuty.
6. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
7. Zkontrolujte, zda se netvoří vzduchové bubliny. Pokud se tvoří, proveďte odstředění.
8. Umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (5 minut).
9. Odeberte a zlikvidujte supernatant, aniž byste narušili částice.
10. Promyjte částice následujícím způsobem.
- a. Když je deska na magnetickém stojanu, přidejte 200 µl čerstvého 80 % EtOH bez míchání.
  - b. Inkubujte po dobu 30 sekund.
  - c. Odeberte a zlikvidujte supernatant, aniž byste narušili částice.
11. Promyjte částice **podruhé**.
12. Sušte na vzduchu na magnetickém stojanu po dobu 5 minut.
13. Během sušení na vzduchu odstraňte pomocí pipety o objemu 20 µl zbytky EtOH a zlikvidujte je.
14. Vyjměte z magnetického stojanu.
15. Přidejte k částicím 17 µl RSB.
16. Desku uzavřete a protřepávejte při 1800 ot./min po dobu 2 minut.



17. Inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě.
18. Zkontrolujte, zda se netvoří vzduchové bubliny. Pokud se tvoří, proveďte odstředění.
19. Umístěte desku na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
20. Přeneste 15  $\mu$ l supernatantu do nové desky PCR s 96 jamkami.

## **BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ**

Pokud provádíte přerušení, zapečete desku a uskladněte ji při teplotě -25 až -15 °C maximálně na 30 dní.

## **Sdružení předem obohacených knihoven**

Tento krok spojuje knihovny DNA s jedinečnými indexy do jednoho fondu, a to až do 12 knihoven.

## Metody vkládání do fondu

Sdružovat můžete podle objemu nebo hmotnosti. Pomocí následující tabulky určete vhodnou metodu pro váš vstup.

Tabulka 2 Doporučené metody sdružování

Vstupní materiál vzorků	Metoda sdružování
10–49 ng gDNA	Hmotnost
50–1000 ng gDNA	Objem
gDNA extrahovaná z FFPE	Hmotnost
gDNA extrahovaná z krve	Objem

- Jednoplexové obohacení nevyžaduje sdružování předem obohacených knihoven. Přidání RSB však může být nezbytné.
- Po kvantifikaci předem obohacené knihovny lze všechny typy vstupního materiálu vzorků sdružit podle hmotnosti, aby se dosáhlo optimální indexové rovnováhy.
- Konečná výtěžnost předem obohacených knihoven generovaných v samostatných experimentálních přípravných postupech se může lišit. Proto se doporučuje sdružování podle hmotnosti, aby se dosáhlo optimální indexové rovnováhy.
- Jednoplexové obohacení použijte v následujících situacích.
  - 10–49 ng gDNA
  - 50–1000 ng gDNA extrahované z FFPE
  - Detekce nízké frekvence recesivní alely pro přiřazení somatických variant.

## Sdružení podle hmotnosti

V následujících situacích kvantifikujte své knihovny tak, abyste použili hmotnost DNA na knihovnu pro obohacení uvedenou v části [Sdružení předem obohacených knihoven při stejné koncentraci na straně 35](#).

- Vstupní materiál vzorků gDNA 10–49 ng
- 50–1000 ng gDNA extrahované ze vstupního materiálu vzorků FFPE
- Detekce nízké frekvence recesivní alely pro přiřazení somatických variant
- gDNA extrahovaná z krve pro optimální rovnováhu indexu

## Kvantifikace předem obohacených knihoven

- Provedte 1 µl předem obohacených knihoven pomocí preferované metody kvantifikace založené na měření fluorescence, která používá interkalační barvivo dsDNA.
  - U 50–1000 ng vysoce kvalitní gDNA očekávejte výtěžnost  $\geq$  500 ng předem obohacené knihovny.
  - U 50–1000 ng gDNA extrahované z FFPE očekávejte výtěžnost 500–6000 ng předem obohacené knihovny v závislosti na kvalitě výchozího vzorku.

**POZNÁMKA** V případě kvantifikačních metod s různými odchylkami kvalifikujte kvantifikační metodu pro tento pracovní postup. Výsledky koncentrace se mohou lišit v závislosti na použité metodě.

## Sdružení předem obohacených knihoven při stejné koncentraci

Pomocí následující tabulky určete hmotnost DNA na knihovnu potřebnou pro obohacení podle typu vzorku a plexity obohacení. Při použití nižších než doporučených výtěžků předem obohacené knihovny není zaručena optimální výtěžnost obohacení a účinnost rozboru.

Celková hmotnost DNA v reakci obohacení by neměla překročit 6000 ng.

Vstupní materiál vzorků	Plexita obohacení	Hmotnost DNA na knihovnu (ng)	Celková hmotnost knihovny DNA (ng)
Vysoce kvalitní gDNA	12	250–500	3000–6000
gDNA extrahovaná z FFPE	1	200	200

- V tomto kroku zaznamenejte indexy knihoven, které plánujete sdružit.
- Na základě koncentrace každé knihovny vypočítejte objem, který je třeba přidat do reakce obohacení, aby bylo dosaženo požadované hmotnosti DNA.
  - Vysoce kvalitní gDNA: Vypočítejte objem knihovny potřebný pro vstup 250–500 ng.
  - gDNA extrahovaná z FFPE: Vypočítejte objem knihovny potřebný pro vstup 200 ng.
- Přidejte vypočtený objem pro každou knihovnu do stejné jamky desky PCR.
- Pokud používáte vysoce kvalitní gDNA, proveďte jednu z následujících akcí na základě celkového objemu sdružených předem obohacených knihoven:
  - Pokud objem předem obohacené knihovny = 30 µl, přejděte k části [Hybridizace sond na straně 37](#).
  - Pokud je objem předem obohacené knihovny < 30 µl, přidejte RSB, abyste dosáhli celkového objemu 30 µl.
  - Pokud je objem předem obohacené knihovny > 30 µl, použijte ke koncentraci sdruženého vzorku metodu založenou na částicích nebo vakuový koncentrátor. Přidejte RSB do koncentrovaného sdruženého vzorku, abyste dosáhli celkového objemu 30 µl.
- Pokud používáte gDNA extrahovanou z FFPE, proveďte jednu z následujících akcí na základě celkového objemu sdružených předem obohacených knihoven.

- Pokud objem předem obohacené knihovny = 7,5 µl, přejděte k části [Hybridizace sond na straně 37](#).
- Pokud je objem předem obohacené knihovny < 7,5 µl, přidejte RSB, abyste dosáhli celkového objemu 7,5 µl.

## BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, zapečete desku a uskladněte ji při teplotě -25 °C až -15 °C na dobu až 30 dní.

## Sdružení podle objemu

Při vstupu 50–1000 ng gDNA není nutné kvantifikovat a normalizovat jednotlivé knihovny vytvořené ve stejném experimentu.

Pro dosažení optimálního výkonu sdružujte pouze vzorky předem obohacených knihoven připravené stejným uživatelem, stejnou šarží reagentie a stejnou deskou indexového adaptéru.

1. V tomto kroku zaznamenejte indexy knihoven, které plánujete sdružit.
2. Zkombinujte následující objemy předem obohacené knihovny a RSB pro vaši plexitu obohacení do stejné jamky nové desky PCR.  
Výsledný objem je 30 µl.

Plexita obohacení*	Každý objem předem obohacené knihovny (µl)	Objem RSB (µl)
Jednoplexové	14	16
2plexové	14	2
3plexové	10	0
4plexové	7,5	0
5plexové	6	0
6plexové	5	0
7plexové	4,2	0,6
8plexové	3,7	0,4
9plexové	3,3	0,3
10plexové	3	0
11plexové	2,7	0,3
12plexové	2,5	0

\* Informace o nestandardních plexitách (2- až 11plexové) naleznete v části [Omezení postupu na straně 2](#).

## BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, zapečete desku a uskladněte ji při teplotě -25 °C až -15 °C na dobu až 30 dní.

## [Volitelné] Kvalifikace předem obohacených knihoven

V případě sdružování podle objemu použijte ke kvantifikaci předem obohacených knihoven metodu založenou na měření fluorescence, která používá interkalační barvivo dsDNA. Ke kvalifikaci předem obohacených knihoven použijte analyzátor fragmentů DNA s příslušnou sadou pro analýzu fragmentů.

Pro kvalifikaci knihovny použijte celkem 1 µl. Předem obohacené knihovny jsou dostatečně koncentrované, aby umožnily malé ředění pro kvantifikaci nebo analýzu fragmentů.

## Hybridizace sond

V tomto kroku probíhá vazba cílových oblastí DNA pomocí záchytných sond.

Reagencie Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit jsou kompatibilní s oligonukleotidovými panely DNA obohacenými oligonukleotidy od společnosti Illumina i s těmi od třetích stran. Informace o požadovaných specifikacích pro panely třetích stran naleznete v části [Požadavky na panel obohacovacích sond na straně 10](#).

### Spotřební materiál

- EHB2 (Enrich Hyb Buffer 2)
- NHB2 (hybridizační pufr 2 + blokátory NXT IDT) (modrý uzávěr)
- Panel obohacovací sondy
- Deska PCR s 96 jamkami
- Lepicí těsnění
- Připravte se na pozdější postup:
  - SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
  - EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (žlutohnědý uzávěr)

### O reagentech

- NHB2 se při skladování sráží a odděluje.
- Panel obohacovací sondy označuje vybraný oligonukleotidový obohacovací panel od dodavatele Illumina.

### Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
EHB2	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce. Pokud se objeví krystalky a zákal, znovu promíchejte roztok ve vortexové třepačce nebo pipetujte nahoru a dolů, aby se obsah promíchal, dokud nebude čirý.
Panel obohacovací sondy	-25 °C až -15 °C (Illumina)	Panely Illumina i panely třetích stran uveďte do pokojové teploty. Promíchejte ve vortexové třepačce.
NHB2 (modrý uzávěr)	-25 °C až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Při pokojové teplotě předehřívejte mikrovzorkový inkubátor na stejnou teplotu, jakou má používaná sonda, po dobu 5 minut. Promíchejte ve vortexové třepačce maximální rychlostí třikrát po dobu 10 sekund, aby došlo k resuspenzi. Krátkce odstřed'te. Pipetujte ode dna zkumavky nahoru a dolů. Pokud se objeví krystalky a zákal, znovu promíchejte roztok ve vortexové třepačce nebo pipetujte nahoru a dolů, aby se obsah promíchal, dokud nebude čirý. Používejte teplé, aby se znovu nevytvořily sraženiny.
SMB3*	2 °C až 8 °C	Pokud přecházíte k dalšímu postupu bezprostředně po 90minutovém pozastavení v programu HYB, nechte přejít do pokojové teploty nejméně 2 hodiny před zahájením programu HYB.
EEW* (žlutohnědá zkumavka)	-25 °C až -15 °C	Pokud přecházíte k dalšímu postupu bezprostředně po 90minutovém pozastavení v programu HYB, nechte přejít do pokojové teploty nejméně 2 hodiny před zahájením programu HYB. Při pokojové teplotě předehřívejte na mikrovzorkovém inkubátoru na příslušnou hybridizační teplotu a teplotu záchytu po dobu 30 minut před ukončením programu HYB.

\* Pokud před dalším postupem zastavujete, odložte přípravu této reagensie, dokud se nedostanete k tomuto postupu.

2. Následující program HYB uložte do termocykléru s použitím příslušného počtu cyklů, které jsou uvedeny v [Tabulka 3](#).
- Zvolte možnost predehřátí víka a nastavte teplotu na 100 °C.
  - Nastavte reakční objem
    - [Vysoce kvalitní gDNA] 100 µl
    - [gDNA extrahovaná z FFPE] 25 µl
  - 98 °C po dobu 5 minut
  - X cyklů po 1 minutě, přičemž první cyklus začíná na 98 °C, poté se teplota snižuje o 2 °C na cyklus
  - Udržujte po dobu 90 minut na příslušné teplotě:
    - [gDNA extrahovaná z FFPE] 58 °C
    - [80 mer na panely sondy] 58 °C
    - [Přiřazení somatických variant] 58 °C
    - [Všechno ostatní] 62 °C
- Celková doba provozu je ~115 minut.

Tabulka 3 Číslo cyklu na vzorek nebo panel

Typ vzorku a panelu	Počet cyklů (X)
gDNA extrahovaná z FFPE (bez ohledu na typ panelu)	20
80 mer na panely sondy (bez ohledu na typ vzorku)	20
Přiřazení somatických variant	20
Všechny ostatní vzorky a panely	18

## Postup

1. **[Vysoce kvalitní gDNA]** Přidejte následující reagenty v *uvedeném pořadí* ke každé sdružené knihovně na desce PCR.  
Nevytvářejte hlavní směs. Vytvoření hlavní směsi NHB2 a EHB2 má negativní dopad na výkonnost obohacení.
  - NHB2 (modrý uzávěr) (50 µl)
  - Panel obohacovací sondy (10 µl)
  - EHB2 (10 µl)
2. **[Vysoce kvalitní gDNA]** Pomocí pipety nastavené na 90 µl pipetujte každou jamku 10krát, aby došlo k promíchání.
3. **[gDNA extrahovaná z FFPE]** Přidejte následující reagenty v *uvedeném pořadí* ke každé sdružené knihovně na desce PCR.  
Nevytvářejte hlavní směs. Vytvoření hlavní směsi NHB2 a EHB2 má negativní dopad na výkonnost obohacení.

- NHB2 (modrý uzávěr) (12,5 µl)
  - Panel obohacovací sondy (2,5 µl)
  - EHB2 (2,5 µl)
4. [gDNA extrahovaná z FFPE] Pomocí pipety nastavené na 20 µl pipetujte každou jamku 10krát, aby se obsah promíchal.
  5. Desku uzavřete a odstřed'ujte při 280 × g po dobu 10 sekund.
  6. Umístěte desku se vzorkem na předprogramovaný termocyklér a spusťte program HYB.
  7. Po uplynutí doby udržování teploty v rámci programu HYB přejděte okamžitě k dalšímu postupu.



### UPOZORNĚNÍ

Ke srážení dochází, pokud teplota hybridizační reakce klesne pod pokojovou teplotu.

## Zachycení hybridizovaných sond

Tento krok používá Streptavidin Magnetic Beads (SMB3) k zachycení sond hybridizovaných na cílené oblasti zájmu.

### Spotřební materiál

- EEW (Enhanced Enrichment Wash Buffer) (žlutohnědý uzávěr)
- EE1 (Enrichment Elution Buffer 1)
- ET2 (Elute Target Buffer 2)
- HP3 (2N NaOH)
- SMB3 (Streptavidin Magnetic Beads)
- Zkumavka mikroadstředivky, 1,5 ml
- Deska MIDI s 96 jamkami
- Deska PCR s 96 jamkami
- Lepicí těsnění
- Magnetický stojan desky MIDI
- Připravte se na pozdější postup:
  - Enhanced PCR (EPM) (EPM)
  - PCR Primer Cocktail (PPC)

### O reagentech

- EEW
  - Ujistěte se, že před předeřháním na mikrovzorkovém inkubátoru byl EEW rozmrazován při pokojové teplotě po dobu nejméně 2 hodin.



- Ujistěte se, že před ukončením programu HYB byl EEW zahříván v mikrovzorkovém inkubátoru po dobu 30 minut.
- Pokud se nepoužívá, ponechte EEW v mikrovzorkovém inkubátoru. EEW by měl po celou dobu protokolu zůstat zahřátý.
- Po dosažení pokojové teploty může být obsah zakalený.
- Může se jevit žlutě.
- SMB3
  - SMB3 musí mít před použitím pokojovou teplotu.

## Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál.

Položka	Skladování	Pokyny
SMB3	2 °C až 8 °C	Nechte 2 hodiny odstát, aby byla dosažena pokojová teplota. Převraťte a poté promíchejte ve vortexové třepačce, dokud nedojde k úplné resuspenzi.
EEW (žlutohnědá zkumavka)	-25 °C až -15 °C	Po dvouhodinové inkubaci při pokojové teplotě předehřívajte na mikrovzorkovém inkubátoru na příslušnou hybridizační teplotu a teplotu záchytu po dobu 30 minut před ukončením programu HYB.
EE1	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte při pokojové teplotě a poté promíchejte ve vortexové třepačce.
HP3	-25 °C až -15 °C	Rozmrazte při pokojové teplotě a poté promíchejte ve vortexové třepačce.
ET2	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce.
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte na ledu po dobu jedné hodiny. Převraťte, aby se obsah promíchal, poté krátce odstřed'te. Odložte na led.
PPC	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte na ledu po dobu jedné hodiny. Promíchejte ve vortexové třepačce, poté krátce odstřed'te. Odložte na led.

2. Předehřívajte jeden mikrovzorkový inkubátor s vyhřívací vložkou MIDI a inkubujte desku se vzorkem na jednu z následujících teplot. K předehřátí EEW lze použít volitelný druhý mikrovzorkový inkubátor. EEW položte na horní část vyhřívací vložky MIDI.
  - [FFPE] 58 °C
  - [80 mer na panely sond] 58 °C
  - [Přiřazení somatických variant] 58 °C

- [Všechno ostatní] 62 °C

## Postup

### Zachycení

1. Přidejte SMB3 do příslušné jamky nové desky MIDI následujícím způsobem.
  - [Vysoce kvalitní gDNA] Přidejte 250 µl SMB3.
  - [gDNA extrahovaná z FFPE] Přidejte 62,5 µl SMB3.
2. Pomocí pipety nastavené na 100 µl pro vysoce kvalitní gDNA nebo 25 µl pro FFPE přeneste každou sloučenou knihovnu z desky PCR s 96 jamkami do odpovídající jamky nové desky MIDI.
3. Desku uzavřete a protřepávejte při 1200 ot./min po dobu 4 minut.
4. Pokud dojde k rozstříku, krátce desku odstřed'te.
5. Umístěte desku se sloučenými knihovnami na vyhřívací vložku MIDI na mikrovzorkovém inkubátoru pod EEW zkumavku, zavřete víko a poté inkubujte 15 minut při příslušné teplotě:
  - [FFPE] 58 °C
  - [Panel sondy mer 80] 58 °C
  - [Přiřazení somatických variant] 58 °C
  - [Všechno ostatní] 62 °C
6. Vyjměte desku se sloučenými knihovnami a odstřed'ujte ji při 280 × g po dobu 30 sekund.
7. Ihned umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
8. [Vysoce kvalitní gDNA] Pomocí pipety nastavené na 200 µl odstraňte a zlikvidujte veškerý supernatant z každé jamky, aniž byste narušili shluk částic.
9. [gDNA extrahovaná z FFPE] Pomocí pipety nastavené na 90 µl odstraňte a zlikvidujte veškerý supernatant z každé jamky, aniž byste narušili shluk částic.
10. Odstraňte a zlikvidujte veškerý zbylý supernatant.

### Mytí

1. Vyjměte z magnetického stojanu.
2. [Vysoce kvalitní gDNA] Rychle vyjměte EEW z mikrovzorkového inkubátoru a přidejte 200 µl do každé jamky.
3. [gDNA extrahovaná z FFPE] Rychle vyjměte EEW z mikrovzorkového inkubátoru a přidejte 50 µl do každé jamky.
4. Nepoužité vzorky EEW vraťte do mikrovzorkového inkubátoru a udržujte je zahřáté.
5. Uzavřete a protřepávejte při 1800 ot./min po dobu 4 minut.
6. Umístěte desku se vzorkem na vyhřívací vložku MIDI v mikrovzorkovém inkubátoru pod zkumavku EEW, zavřete víko a poté inkubujte 5 minut při příslušné teplotě:

- [FFPE] 58 °C
  - [80 mer na panely sondy] 58 °C
  - [Přiřazení somatických variant] 58 °C
  - [Všechny ostatní panely] 62 °C
7. Ihned umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
  8. Pomocí pipety nastavené na 200 µl pro vysoce kvalitní gDNA nebo 50 µl pro FFPE odeberte a zlikvidujte veškerý supernatant z každé jamky.
  9. Kroky 1–8 opakujte dvakrát pro celkem tři promytí.

### Mytí při přenášení

1. Vyjměte z magnetického stojanu.
2. **[Vysoce kvalitní gDNA]** Rychle vyjměte EEW z mikrovzorkového inkubátoru a přidejte 200 µl do každé jamky.
3. **[gDNA extrahovaná z FFPE]** Rychle vyjměte EEW z mikrovzorkového inkubátoru a přidejte 50 µl do každé jamky.
4. Uzavřete a protřepávejte při 1800 ot./min po dobu 4 minut. Pokud dojde k rozstříku, snižte otáčky na 1600 ot./min.
5. Resuspendovaný roztok částic přeneste na novou desku MIDI.  
Některé vzorky mohou zůstat v jamkách.



#### UPOZORNĚNÍ

Přenos reagentie minimalizuje přenos zbytkových reagentů, které mohou inhibovat následné PCR.

6. Umístěte desku se vzorkem na vyhřívací vložku MIDI v mikrovzorkovém inkubátoru, zavřete víko a poté inkubujte 5 minut při příslušné teplotě:
  - [FFPE] 58 °C
  - [80 mer na panely sondy] 58 °C
  - [Přiřazení somatických variant] 58 °C
  - [Všechno ostatní] 62 °C
7. Ihned umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
8. Pomocí pipety nastavené na 200 µl pro vysoce kvalitní gDNA nebo 50 µl pro FFPE odeberte a zlikvidujte veškerý supernatant z každé jamky.
9. Odstřed'ujte desku při 280 × g po dobu 30 sekund.
10. Umístěte na magnetický stojan desky MIDI na 10 sekund.
11. Pomocí 20 µl pipety odstraňte a zlikvidujte zbytkovou kapalinu z každé jamky.

12. Okamžitě přejděte k [Eluování na straně 44](#), abyste zabránili nadměrnému vysychání částic a ztrátě výtěžnosti knihovny.

## Eluování

1. Pro přípravu směsi Elution Master Mix zkombinujte následující objemy. Každý objem vynásobte počtem zpracovávaných sdružených knihoven.
  - EE1 (28,5 µl)
  - HP3 (1,5 µl)Přebytky dalších reagensů jsou zahrnuty v objemu.
2. Promíchejte ve vortexové třepačce a poté krátce odstředte.
3. Odeberte desku MIDI z magnetického stojanu.
4. Do každé jamky přidejte 23 µl směsi Elution Master Mix.
5. Desku uzavřete a protřepávejte při 1800 ot./min po dobu 2 minut.
6. Inkubujte desku při pokojové teplotě po dobu 2 minut.
7. Odstředte s nastavením 280 × g po dobu 30 sekund.
8. Umístěte na magnetický stojan desku MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
9. Přeneste 21 µl supernatantu z desky MIDI do odpovídající jamky nové desky PCR s 96 jamkami.
10. Zlikvidujte desku MIDI.
11. Přidejte 4 µl ET2 do každé jamky obsahující 21 µl supernatantu.
12. Nastavte pipetu na 20 µl a pomalu pipetujte každou jamku 10krát, aby se obsah promíchal.
13. Desku uzavřete a poté odstředte při 280 × g po dobu 10 sekund.
14. Inkubujte desku při pokojové teplotě po dobu 1 minuty.

## Amplifikace obohacené knihovny

V tomto kroku se k amplifikaci obohacené knihovny používá PCR.

### Spotřební materiál

- EPM (Enhanced PCR (EPM))
- PPC (PCR Primer Cocktail)
- Lepicí těsnění

## Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál:

Položka	Skladování	Pokyny
EPM	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte při 4 °C nebo na ledu po dobu jedné hodiny. Převertte, aby se obsah promíchal, poté krátce odstředte. Odložte na led.
PPC	-25 °C až -15 °C	Rozmrazujte při 4 °C na ledu po dobu jedné hodiny. Promíchejte ve vortexové třepačce, poté krátce odstředte. Odložte na led.

2. Následující program AMP uložte do termocykléru s použitím příslušného počtu cyklů PCR, které jsou uvedeny v následující tabulce.

- Zvolte možnost přehřátí víka a nastavte teplotu na 100 °C.
- Nastavte reakční objem na 50 µl.
- 98 °C po dobu 45 sekund
- (X) cyklů:
  - 98 °C po dobu 30 sekund
  - 60 °C po dobu 30 sekund
  - 72 °C po dobu 30 sekund
- 72 °C po dobu 5 minut
- Udržujte při teplotě 10 °C.

Celková doba provozu je ~35 minut.

Typ vzorku a panelu	(X) cykly
FPPE	14
Illumina Panel exomu (CEX) pro vysoce kvalitní gDNA	10
Illumina Panel exomu (CEX) pro FFPE	12
Všechny ostatní vzorky a panely	12 <sup>1234</sup>

<sup>1</sup> U malých panelů třetích stran lze následnou optimalizací nastavit až 15 cyklů. Při použití FFPE lze počet cyklů nastavit až na 17.

<sup>2</sup> U panelů třetích stran, které mají pouze 500 sond, lze nastavit až 17 cyklů. Při použití FFPE lze počet cyklů nastavit až na 19.

<sup>3</sup> U vzorků FFPE lze nastavit až 14 cyklů.

<sup>4</sup> Zvýšení počtu cyklů PCR může vést k vyššímu počtu duplicit a menší velikosti fragmentů u vzorků FFPE.

## Postup

1. Do PPC každé jamky přidejte 5 µl.
2. Do EPM každé jamky přidejte 20 µl.
3. Desku uzavřete a protřepávejte při 1200 ot./min po dobu 1 minuty.
4. Odstřed'ujte desku při 280 × g po dobu 10 sekund.
5. Umístěte do předprogramovaného termocykléru a spusťte program AMP.

## BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušení, skladujte při teplotě 2 °C až 8 °C po dobu až dvou dnů. Případně ponechte na termocykléru po dobu až 24 hodin.

## Čištění amplifikované obohacené knihovny

Tento krok využívá Cleanup Beads k vyčištění obohacené knihovny a odstranění nežádoucích produktů.

## Spotřební materiál

- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Čerstvě připravený 80 % ethanol (EtOH)
- Lepicí těsnění
- Deska MIDI s 96 jamkami
- Deska PCR s 96 jamkami
- Magnetický stojan desky MIDI

## O reagentech

- Cleanup Beads
  - Před každým použitím promíchejte ve vortexové třepačce.
  - Často promíchejte ve vortexové třepačce, abyste se ujistili, že jsou částice rovnoměrně rozloženy.
  - Nasávejte a vypouštějte pomalu vzhledem k viskozitě roztoku.

## Příprava

1. Připravte následující spotřební materiál.

Položka	Skladování	Pokyny
CB	Pokožová teplota	Promíchejte ve vortexové třepačce a převracejte, dokud není barva kapaliny homogenní.
RSB	2 °C až 8 °C	Přiveďte k pokojové teplotě. Promíchejte ve vortexové třepačce.

- Z absolutního ethanolu připravte čerstvý 80 % EtOH.

## Postup

- Odstřed'ujte desku PCR při 280 × g po dobu 10 sekund.
- CB 3krát promíchejte ve vortexové třepačce po dobu 10 sekund a poté převraťte.
- Přidejte 40,5 µl CB do každé jamky nové desky **MIDI**.
- Přeneste 45 µl z každé jamky desky PCR do odpovídající jamky desky MIDI.
- Desku uzavřete a protřepávejte při 1800 ot./min po dobu 1 minuty.
- Inkubujte desku MIDI při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
- Odstřed'ujte s nastavením 280 × g po dobu 10 sekund.
- Umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (5 minut).
- Pomocí pipety nastavené na 95 µl odeberte a zlikvidujte veškerý supernatant z každé jamky.
- Umyjte dvakrát následujícím způsobem.
  - Když je deska na magnetickém stojanu, přidejte 200 µl čerstvého 80 % EtOH bez míchání.
  - Inkubujte po dobu 30 sekund.
  - Odeberte a zlikvidujte supernatant, aniž byste narušili částice.
- Sušte na vzduchu na magnetickém stojanu po dobu 5 minut.
- Během sušení na vzduchu odstraňte pomocí pipety o objemu 20 µl zbytky EtOH z každé jamky a zlikvidujte je.
- Vyjměte z magnetického stojanu a přidejte 32 µl RSB do každé jamky.
- Desku uzavřete a protřepávejte při 1800 ot./min po dobu 1 minuty.
- Inkubujte desku při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
- Odstřed'ujte s nastavením 280 × g po dobu 10 sekund.
- Umístěte na magnetický stojan desky MIDI a počkejte, dokud kapalina nebude čirá (2 minuty).
- Přeneste 30 µl supernatantu z desky MIDI s 96 jamkami do odpovídající jamky nové desky PCR.
- Zlikvidujte desku MIDI.

## BOD BEZPEČNÉHO PŘERUŠENÍ

Pokud provádíte přerušování, zapečete desku a uskladněte ji při teplotě -25 až -15 °C max. na 7 dní.

## Kontrola obohacených knihoven

Pro kvantifikaci vstupu dvouvláknové gDNA použijte metodu založenou na fluorescenci, která používá interkalační barvivo. Vyhněte se metodám, které měří celkovou nukleovou kyselinu, jako je NanoDrop nebo jiné metody UV absorbance.

1. Zpracujte 1 µl obohacených knihoven pomocí vaší kvantifikační metody.

**POZNÁMKA** Celková molarita sondy proporcionalně ovlivňuje výtěžnost následně obohacené knihovny.

Očekávejte průměrnou velikost insertů 125–235 bp a distribuci fragmentů knihovny s rozsahem velikostí od ~200 bp do ~1000 bp.



## Ředění knihoven na počáteční koncentraci

Tento krok ředí knihovny na výchozí koncentraci pro váš sekvenační systém a je prvním krokem sériového ředění. Po naředění na počáteční koncentraci jsou knihovny připraveny k denuraci a naředění na konečnou koncentraci pro vložení.

Pro sekvenování, bez ohledu na panel obohacovacích sond, který používáte, Illumina doporučuje nastavit párový-koncový běh se 151 cykly na čtení (2 × 151) a 10 cykly na indexové čtení. Pokud chcete mít méně překrývajících se čtení nebo menší hrubé pokrytí, můžete sekvenci snížit na 2 × 126 nebo 2 × 101.

1. Vypočítejte hodnotu molarity knihovny nebo sdružených knihoven pomocí následujícího vzorce.

- U knihoven kvalifikovaných na analyzátoru fragmentů DNA použijte průměrnou velikost získanou pro danou knihovnu.
- Pro všechny ostatní kvalifikační metody použijte jako průměrnou velikost knihovny 350 bp.

$$\frac{\text{ng} / \mu\text{l} \times 10^6}{660 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times \text{průměrná velikost knihovny (bp)}} = \text{Molarita (nM)}$$

Pokud je například koncentrace vaší knihovny 20 ng/μl a průměrná velikost je 350 bp, výsledná hodnota molarity je 86,58 nM.

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

2. Pomocí hodnoty molarity vypočítejte objemy RSB a knihovny potřebné k naředění knihoven na výchozí koncentraci pro váš systém.

Sekvenační systém	Minimální požadovaný objem knihovny (μl)	Počáteční koncentrace (nM)	Konečná koncentrace pro vložení (pM)
NextSeq 550Dx	10	2	1,2
MiSeqDx	5	4	11
NovaSeq 6000Dx	150 (S2) nebo 310 (S4)	1,75	350

[NovaSeq 6000Dx] 1,75 nM je počáteční koncentrace pro konečnou koncentraci pro vložení 350 pM. V případě potřeby upravte konečnou koncentraci pro vložení podle následující tabulky.

Konečná koncentrace pro vložení (pM)	Koncentrace sdružené knihovny (nM)
100	0,50
150	0,75
200	1

Konečná koncentrace pro vložení (pM)	Koncentrace sdružené knihovny (nM)
250	1,25
300	1,50
350	1,75
400	2
450	2,25
500	2,50

### 3. Ředění knihoven pomocí RSB:

- **Knihovny kvantifikované jako multiplexní fond knihoven** – naředte fond na počáteční koncentraci pro váš systém.
- **Knihovny kvantifikované jednotlivě** – naředte každou knihovnu na počáteční koncentraci pro váš systém. Přidejte 10 µl každé zředěné knihovny do zkumavky, abyste vytvořili multiplexní fond knihoven.

### 4. Při ředění na konečnou koncentraci pro vložení postupujte podle pokynů pro denaturaci a ředění pro váš systém.

- V případě systému NextSeq 550Dx viz [Příprava sekvenování NextSeq 550Dx na straně 50](#).
- V případě systému MiSeqDx viz [Příprava sekvenování na MiSeqDx na straně 52](#).
- V případě systému NovaSeq 6000Dx viz [Příprava sekvenování na NovaSeq 6000Dx na straně 53](#).

Konečné koncentrace pro vložení jsou výchozím bodem a obecným vodítkem. Optimalizujte koncentrace pro svůj pracovní postup a metodu kvantifikace během následných sekvenčních cyklů nebo pomocí titrace v průtokové kyvetě.

## Příprava sekvenování NextSeq 550Dx

Pro denaturaci a ředění knihoven pro sekvenování na sekvenačním systému NextSeq 550Dx se řiďte následujícími pokyny.

### Spotřební materiál

- HT1 (Hybridizační pufr)
- 1N NaOH
- 200 mM Tris-HCl, pH 7,0

### Příprava

Připravte *nový* roztok 0,2N NaOH k denaturaci knihoven pro sekvenování. Aby se předešlo drobným chybám při pipetování, které by mohly ovlivnit konečnou koncentraci NaOH, připraví se dodatečný objem.

**UPOZORNĚNÍ**

Čerstvě zředěný 0,2N NaOH je pro proces denaturace nezbytný. Nesprávná denaturace může snížit výtěžnost.

1. Připravte následující spotřební materiál.

Položka	Skladování	Pokyny
HT1	-25 °C až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Uchovávejte při teplotě 2 °C až 8 °C, dokud nebudete připraveni naředit denaturované knihovny.

2. Ve zkumavce mikroadstředivky zkombinujte následující objemy a připravte nový roztok NaOH:
  - Voda laboratorní jakosti (800 µl)
  - 1N NaOH (200 µl)Výsledkem je 1 ml 0,2N NaOH.
3. Zkumavku několikrát převraťte, aby se obsah promíchal.
4. Ve zkumavce mikroadstředivky zkombinujte následující objemy a připravte 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.
  - Voda laboratorní jakosti (800 µl)
  - 1M Tris-HCl, pH 7,0 (200 µl)Výsledkem je 1 ml 200 mM Tris-HCl, pH 7,0.

**POZNÁMKA** Zkumavku udržujte uzavřenou. Čerstvý roztok použijte do **12 hodin**.

## Denaturace knihoven

1. Ve zkumavce mikroadstředivky smíchejte následující objemy knihovny a čerstvě zředěného 0,2N NaOH.
  - 10 µl knihovny
  - 10 µl 0,2N NaOH
2. Krátce promíchejte ve vortexové třepačce a pak odstřed'ujte při 280 × g po dobu 1 minuty.
3. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
4. Přidejte 10 µl 200 mM Tris-HCl, pH 7.

## Ředění denaturovaných knihoven na 20 pM

1. Do zkumavky s denaturovanými knihovnami přidejte 970 µl předchlazeného HT1. Výsledkem je denaturovaná knihovna 20 pM.
2. Krátce promíchejte ve vortexové třepačce a pak odstřed'ujte při 280 × g po dobu 1 minuty.
3. Knihovny o velikosti 20 pM uložte na led, dokud nebudete připraveni na konečné ředění.

## Ředění knihoven na koncentraci pro vložení

- Přidejte následující objemy, abyste 20 pM roztok denaturované knihovny zředili na 1,2 pM.
  - Roztok denaturované knihovny (78 µl)
  - Předchlazený HT1 (1222 µl)
 Celkový objem je 1,3 ml při 1,2 pM.
- Převraťte, aby došlo k promíchání, a poté pulzně odstředěte.
- Pokračujte v sekvenaci. Pokyny naleznete v *Referenční příručce k přístroji NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)* a v *Průvodci pracovním postupem Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx pro NextSeq 550Dx (dokument č. 200015671)* nebo v *Uživatelské příručce k aplikaci DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx on NextSeq 550Dx (dokument č. 200025238)*.

## Příprava sekvenování na MiSeqDx

Pro denuraci a ředění knihoven pro sekvenování na sekvenačním systému MiSeqDx se řiďte následujícími pokyny.

### Spotřební materiál

- HT1 (Hybridizační pufr)
- 1N NaOH

### Příprava

Připravte *nový* roztok 0,2N NaOH k denuraci knihoven pro sekvenování. Aby se předešlo drobným chybám při pipetování, které by mohly ovlivnit konečnou koncentraci NaOH, připraví se dodatečný objem.



#### UPOZORNĚNÍ

Čerstvě zředěný 0,2N NaOH je pro proces denurace nezbytný. Nesprávná denurace může snížit výtěžnost.

- Připravte následující spotřební materiál.

Položka	Skladování	Pokyny
HT1	-25 °C až -15 °C	Zajistěte rozmrazení při pokojové teplotě. Uchovávejte při teplotě 2 °C až 8 °C, dokud nebudete připraveni naředit denaturované knihovny.

- Ve zkumavce mikroadstředivky zkombinujte následující objemy a připravte nový roztok NaOH:
  - Voda laboratorní jakosti (800 µl)
  - 1N NaOH (200 µl)
 Výsledkem je 1 ml 0,2N NaOH.

**POZNÁMKA** Zkumavku udržujte uzavřenou. Čerstvý roztok použijte do **12 hodin**.

## Denaturace knihovny 4 nM

1. Nakombinujte následující objemy ve zkumavce mikroodstředivky.
  - Knihovna 4 nM (5 µl)
  - 0,2N NaOH (5 µl)
2. Krátce promíchejte ve vortexové třepačce a pak odstřed'ujte při 280 × g po dobu 1 minuty.
3. Inkubujte při pokojové teplotě po dobu 5 minut.
4. Do zkumavky obsahující denaturovanou knihovnu přidejte 990 µl předchlazeného HT1. Výsledkem je 1 ml denaturované knihovny 20 pM.

## Nařed'te denaturovanou knihovnu 20 pM

1. Nařed'te na požadovanou koncentraci pomocí následujících objemů.

Koncentrace	6 pM	8 pM	10 pM	11 pM	12 pM	15 pM	20 pM
Knihovna 20 pM	180 µl	240 µl	300 µl	330 µl	360 µl	450 µl	600 µl
Předchlazený HT1	420 µl	360 µl	300 µl	270 µl	240 µl	150 µl	0 µl

2. Převraťte, aby došlo k promíchání, a poté pulzně odstřed'ete.
3. Pokračujte v sekvenaci. Pokyny naleznete v *Referenční příručka přístroje MiSeqDx pro systém MOS v4* (dokument č. 1000000157953) a v *příručce Local Run Manager DNA Generate FASTQ Dx Workflow Guide for MiSeqDx* (dokument č. 200015661).

## Příprava sekvenování na NovaSeq 6000Dx

Pro denaturaci a ředění knihoven pro sekvenování na sekvenačním systému NovaSeq 6000Dx se řiďte následujícími pokyny.

### Spotřební materiál

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

## Příprava

Připravte *nový* roztok 0,2N NaOH k denuraci knihoven pro sekvenování. Aby se předešlo drobným chybám při pipetování, které by mohly ovlivnit konečnou koncentraci NaOH, připraví se dodatečný objem.



### UPOZORNĚNÍ

Čerstvě zředěný 0,2N NaOH je pro proces denurace nezbytný. Nesprávná denurace může snížit výtěžnost.

1. Ve zkumavce mikroadstředivky zkombinujte následující objemy a zřed'te 1N NaOH na 0,2N NaOH:

Tabulka 4 Režim S2

Reagencie	Objem pro jednu průtokovou kyvetu (μl)	Objem pro dvě průtokové kyvety (μl)
Voda laboratorní jakosti	40	80
Zásoba 1N NaOH	10	20

Výsledkem těchto objemů je 50 μl 0,2N NaOH pro jednu průtokovou kyvetu nebo 100 μl 0,2N NaOH pro dvě průtokové kyvety.

Tabulka 5 Režim S4

Reagencie	Objem pro jednu průtokovou kyvetu (μl)	Objem pro dvě průtokové kyvety (μl)
Voda laboratorní jakosti	80	160
Zásoba 1N NaOH	20	40

Výsledkem těchto objemů je 100 μl 0,2N NaOH pro jednu průtokovou kyvetu nebo 200 μl 0,2N NaOH pro dvě průtokové kyvety.

2. Několikrát převraťte, aby se obsah promíchal, nebo důkladně promíchejte ve vortexové třepačce.
3. Ve zkumavce mikroadstředivky zkombinujte následující objemy a připravte 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.
  - Voda laboratorní jakosti (600 μl)
  - 1M Tris-HCl, pH 8,0 (400 μl)
 Výsledkem je 1 ml 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.

**POZNÁMKA** Zkumavku udržujte uzavřenou. Čerstvý roztok použijte do **12 hodin**.

## Vytvoření fondu normalizované knihovny

Koncentrace pro vložení se může lišit v závislosti na metodách přípravy, kvantifikace a normalizace knihovny.

Pomocí následujících pokynů normalizujte knihovny na příslušnou koncentraci a poté je sdužte. Knihovny sekvenované na stejné průtokové kyvetě musí být sduženy do jednoho normalizovaného fondu.

**POZNÁMKA** Maximální počet vzorků, které lze s Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Kit zpracovat na jedné dráze, je 192. Tento limit je dán celkovým počtem indexů UD v sadě A a B.

## Normalizace knihoven pro sdužování

1. Určete požadovanou koncentraci sdužené knihovny na základě požadované konečné koncentrace pro vložení.
  - Pro konečnou koncentraci náplně 350 pM je požadovaná koncentrace sdužené knihovny 1,75 nM.
  - Chcete-li určit koncentraci sdužené knihovny pro jinou konečnou koncentraci pro vložení, nahlédněte do části [Ředění knihoven na počáteční koncentraci na straně 49](#).
2. Normalizujte knihovny na požadovanou koncentraci sdužené knihovny pomocí 10 mM Tris-HCl, pH 8,5. Pomoc při ředění knihoven na vhodnou koncentraci naleznete v [Kalkulátoru sdužování](#) na webové stránce Illumina.

### Doporučené koncentrace pro vložení

Optimální koncentrace DNA pro vložení závisí na typu knihovny a velikosti vložky. U knihoven o velikosti > 450 bp může být nutné použít vyšší koncentraci pro vložení.

## Sdužování normalizovaných knihoven a přidání volitelné kontroly PhiX

1. Zkombinujte příslušný objem každé normalizované knihovny v nové zkumavce mikroodstředivky tak, abyste získali jeden z následujících konečných objemů:

Režim	Konečný objem (µl)
S2	150
S4	310

2. **[Volitelné]** Přidejte 1 % nedenaturované PhiX > následovně.
  - a. Zředte 10 nM PhiX na 2,5 nM pomocí 10 mM Tris-HCl, pH 8,5.
  - b. Do zkumavky fondu nedenaturované knihovny přidejte příslušný objem nedenaturované 2,5 nM PhiX.

Režim	Nedenaturovaná 2,5 nM PhiX (µl)	Fond nedenaturované knihovny (µl)
S2	0,9	150
S4	1,9	310

Při přidávání PhiX je doporučené množství pro dobře vyvážené knihovny 1 %. Knihovny s nízkou diverzitou mohou vyžadovat více. Chcete-li použít kontrolu PhiX s knihovnami s nízkou diverzitou, obraťte se na technickou podporu Illumina.

**Fond knihovny denaturace a volitelná kontrola PhiX**

1. Do zkumavky s fondem nedenaturované knihovny a volitelným PhiX přidejte 0,2N NaOH následujícím způsobem.

Průtoková kvjeta	0,2N NaOH	Fond nedenaturované knihovny (µl)	Výsledný objem
S2	37	150	187 µl nebo 187,9 µl s PhiX
S4	77	310	387 µl nebo 388,9 µl s PhiX

2. Uzavřete a krátce promíchejte.
3. Odstřed'ujte při 280 × g po dobu až 1 minuty.
4. Inkubujte 8 minut při pokojové teplotě kvůli denaturaci.
5. Pro neutralizaci přidejte 400 mM Tris-HCl, pH 8,0 následujícím způsobem.

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

6. Uzavřete a krátce promíchejte.
7. Odstřed'ujte při 280 × g po dobu až 1 minuty.
8. Přeneste celý objem denaturované knihovny nebo denaturované knihovny a PhiX do zkumavky knihovny NovaSeq 6000Dx.
9. Pokračujte v sekvenaci. Pokyny naleznete v dokumentaci *NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation* (dokument č. 200010105) a *DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx for NovaSeq 6000Dx* (dokument č. 200014776).



## Řešení problémů

K řešení problémů v pracovním postupu můžete použít následující tabulku. Pokud se běh sekvenování nebo příprava knihovny pro vzorek dvakrát nezdaří, může být nutné provést dodatečné řešení problémů. Obratě se na technickou podporu Illumina.

Pozorování	Možná příčina	Doporučená akce
Běh sekvenování nevyhovuje specifikacím kontroly kvality	Chyba uživatele nebo laboratorního vybavení v pracovním postupu rozboru	<p>Kvalifikujte obohacené knihovny, abyste zajistili odpovídající výtěžnost knihovny a distribuci velikosti fragmentů. Opakujte přípravu knihovny od jednoho z následujících kroků v závislosti na tom, kde došlo k domněle chybnému použití nebo závadě vybavení. Pokud došlo k neznámé nebo jiné chybě, obraťte se v rámci odstraňování chyby běhu na technickou podporu Illumina.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Knihovny resekvenování. Viz <a href="#">Příprava sekvenování NextSeq 550Dx na straně 50</a>, <a href="#">Příprava sekvenování na MiSeqDx na straně 52</a> nebo <a href="#">Příprava sekvenování na NovaSeq 6000Dx na straně 53</a>.</li> <li>• Knihovny opětovného obohacení. Viz <a href="#">Hybridizace sond na straně 37</a>.</li> <li>• Začněte s přípravou knihovny od začátku pracovního postupu. Viz <a href="#">Návod k použití na straně 21</a>.</li> </ul>
	Problém s přístrojem	Obratě se na technickou podporu Illumina.
Chyba při generování FASTQ nebo obecná chyba sekvenovacího systému (např. chyba sítě, chyba při vkládání/vyjímání reagentů atd.)	Problém se softwarem nebo přístrojem	<p>Nápovědu k analýze naleznete v příručce k modulu nebo aplikaci, případně v <i>Referenční příručka k přístroji NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)</i>, <i>Referenční příručka přístroje MiSeqDx pro systém MOS v4 (dokument č. 1000000157953)</i> nebo v <i>dokumentaci NovaSeq 6000Dx Instrument Product Documentation (dokument č. 200010105)</i>. Další nápovědu získáte od technické podpory společnosti Illumina.</p>

Pozorování	Možná příčina	Doporučená akce
Knihovna DNA nevytváří dostatečný výtěžek pro sekvenační vložení	Nebyly splněny požadavky na vstupní materiál vzorků	Zajistěte vhodný vstupní materiál vzorků a opakujte přípravu knihovny. Viz <a href="#">Doporučení vstupního materiálu vzorků na straně 18</a> .
	Chybné použití nebo závada vybavení v pracovním postupu rozboru	Opakujte přípravu knihovny od jednoho z následujících kroků v závislosti na tom, kde došlo k domněle chybnému použití nebo závadě vybavení. Pokud došlo k neznámé nebo jiné chybě, obraťte se v rámci odstraňování chyby běhu na technickou podporu Illumina. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Knihovny resekvenování. Viz <a href="#">Příprava sekvenování NextSeq 550Dx na straně 50</a>, <a href="#">Příprava sekvenování na MiSeqDx na straně 52</a> nebo <a href="#">Příprava sekvenování na NovaSeq 6000Dx na straně 53</a>.</li> <li>• Knihovny opětovného obohacení. Viz <a href="#">Hybridizace sond na straně 37</a>.</li> <li>• Začněte s přípravou knihovny od začátku pracovního postupu. Viz <a href="#">Návod k použití na straně 21</a>.</li> </ul>
	Požadavky na panel obohacovacích sond nebyly splněny	Zajistěte vhodný panel obohacovacích sond a opakujte přípravu knihovny. Viz <a href="#">Požadavky na panel obohacovacích sond na straně 10</a> .

## Charakteristiky funkčnosti

### Výkonnost s panely celého exomu

Výkonnost panelu exomu byla testována pomocí nejnižšího (50 ng) a nejvyššího (1000 ng) doporučeného vstupu gDNA buněčné linie Coriell NA12878 se známou pravdivou sadou pro detekci germinální varianty (Coriell platinum genome). Jako reprezentativní panely byly použity panel exomu 1 (45 Mb) a panel exomu 2 (36,8 Mb). 24 technických replikátů bylo testováno pomocí rozboru Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s použitím panelu exomu 1 (45 Mb) ve dvou reakcích 12plexového obohacení. Pomocí rozboru Illumina DNA Prep with Enrichment Dx bylo testováno 12 technických replikátů s použitím panelu exomu 2 (36,8 Mb) v jedné reakci 12plexového obohacení. Obohacené knihovny byly sekvenovány na sekvenačním systému NextSeq 550Dx s modulem DNA GenerateFASTQ Dx Local Run Manager.

Následující tabulka zobrazuje průměrné hodnoty sekundárního sekvenování a metrik výkonu pro přiřazení variant pro technické replikáty testované s každým panelem.

Tabulka 6 Výkonnost rozboru se dvěma panely celého exomu

Panel	Doplněná jedinečná obohacení a čtení	Rovnoměrnost pokrytí	Medián délky fragmentu	Opětovné přiřazení SNV <sup>1</sup>	Přesnost SNV <sup>2</sup>	Opětovné přiřazení Indel <sup>1</sup>	Přesnost Indel <sup>2</sup>
Panel exomu 1 (45 Mb)	80 %	96 %	186 bp	96 %	99 %	90 %	89 %
Panel exomu 2 (36,8 Mb)	93 %	98 %	188 bp	96 %	99 %	92 %	93 %

<sup>1</sup> Opětovné přiřazení = pozitivní / (skutečně pozitivní + falešně negativní)

<sup>2</sup> Přesnost = skutečně pozitivní / (skutečně pozitivní + falešně pozitivní)

## Mez detekce

K testování limitu detekce byl použit referenční standard DNA Horizon HD799. HD799 se skládá z mírně poškozené DNA ošetřené formalínem se známými SNV v alelických frekvencích v rozmezí 1–24,5 %. Byl použit nejnižší doporučený vstup DNA (50 ng) a byla vyhodnocena míra detekce SNV s  $\geq 5,0$  % alelickou frekvencí variant (VAF). 16 technických replikátů bylo testováno pomocí rozboru Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s využitím pracovního postupu FFPE, obohaceno panelem pro pan-kancerogenní obohacení (1,94 Mb) v 16 (jednoplexových) obohaceních a poté sekvenováno na přístroji NextSeq 550Dx s modulem DNA GenerateFASTQ Dx.

Všechny vzorky vyhověly požadavkům na účinnost specifických vzorků panelu, jak je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 7 Účinnost vzorku pro limit detekce

Panel	Míra detekce varianty SNV $\geq 5,0$ % VAF	Průměr Rovnoměrnost pokrytí
Panel pro pan-kancerogenní obohacení (1,94 Mb, 523 genů)	100 %	99 %

## Interferující látky

Vliv potenciálních interferentů byl posouzen v testu Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na základě vyhodnocení účinnosti rozboru za přítomnosti interferujících látek.

## Interference v plné krvi

Acetaminofen (exogenní sloučenina, léčivo), kreatinin a triglyceridy (endogenní metabolity) byly testovány jejich přidáním do vzorků plné lidské krve před extrakcí DNA. Pro posouzení interference způsobené odběrem krve (krátký odběr) byla do vzorků plné krve přidána také EDTA. Pro posouzení interferencí způsobených přípravou vzorků byl navíc do DNA extrahované z plné krve přidán ethanol molekulární kvality.

V následující tabulce jsou uvedeny testovací koncentrace pro jednotlivé interferenty.

Tabulka 8 Potenciálně interferující látky a koncentrace testované v plné krvi

Testovaná látka	Testovací koncentrace
Acetaminofen	15,6 mg/dl* Trojnásobek nejvyšší koncentrace očekávané po terapeutické dávce léku.
Kreatinin	15 mg/dl* Nejvyšší pozorovaná koncentrace v populaci.
Triglyceridy	1,5 g/dl* Nejvyšší pozorovaná koncentrace v populaci.
EDTA	6 mg/ml Trojnásobek koncentrace očekávané v krvi odebrané do zkumavek EDTA.
Ethanol molekulární kvality	15 % objemu na objem V eluátu po extrakci DNA.

\* Podle CLSI EP37-ED1:2018

Na jednu interferující látku bylo testováno 12 technických replikátů pomocí rozboru Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, obohaceno o panel exomu 1 (45 Mb) v rámci jednoho (12plexového) obohacení a poté sekvenovány na přístroji NextSeq 550Dx s modulem DNA GenerateFASTQ Dx.

U testovaných látek splnilo všech 12 vzorků požadavky na účinnost vzorku a nebyla pozorována žádná interference s účinností rozboru.

## Interference v tkáni FFPE

Dva kolorektální vzorky FFPE byly testovány za přítomnosti a nepřítomnosti hemoglobinu v množství 0,1 mg na 10 µm řezu FFPE, aby představovaly nejhorší možný scénář 50 % kontaminace vzorku tkáně FFPE krví s vysokým obsahem hemoglobinu. Vzorky byly testovány pomocí rozboru Illumina DNA Prep with Enrichment Dx s použitím panelu pro pan-kancerogenní obohacení 1 (1,94 Mb) jako reprezentativního panelu v jednoplexovém obohacení. Obohacené knihovny byly poté sekvenovány na přístroji NextSeq 550Dx s modulem DNA GenerateFASTQ Dx. Všechny vzorky splňovaly požadavky na účinnost vzorku a bylo prokázáno, že hemoglobin neinterferuje s účinností rozboru.

Pro posouzení interference způsobené přípravou vzorku byly do DNA extrahované ze vzorku tkáně FFPE karcinomu močového měchýře přidány dvě exogenní sloučeniny. Testované exogenní látky jsou extrakční roztoky běžně používané při extrakci DNA a jsou uvedeny s testovanými množstvími v následující tabulce. Roztoky testovaných látek jsou komerčně dostupné v sadách pro izolaci DNA kolonkovou metodou.

Tabulka 9 Potenciálně interferující exogenní látky a koncentrace testované ve FFPE

Testovaná látka	Testované koncentrace (μl / 30 μl eluátu)
Deparafinizační roztok	113 × 10 <sup>-6</sup>
Promývací pufr AW2	0,417

Na jednu interferující látku bylo testováno osm technických replikátů pomocí rozboru Illumina DNA Prep with Enrichment Dx, obohaceno panelem pro pan-kancerogenní obohacení (1,94 Mb) v jednoplexovém obohacení a poté sekvenováno na přístroji NextSeq 550Dx s modulem DNA GenerateFASTQ Dx.

U obou testovaných látek splnilo všech osm vzorků požadavky na účinnost vzorku a nebyla pozorována žádná interference s účinností rozboru.

## Křížová kontaminace

Coriell Cell Line gDNA NA12878 (žena, 10 vzorků), Coriell Cell Line gDNA NA12877 (muž, 12 vzorků) a kontroly bez šablony (NTC, 2 vzorky) byly testovány v rozboru Illumina DNA Prep with Enrichment Dx v šachovnicovém uspořádání desek. U všech vzorků byla použita nejvyšší doporučená hodnota (1000 ng) gDNA vstupu jako nejpřísnější podmínka pro hodnocení křížové kontaminace vzorků. Testování bylo provedeno dvakrát dvěma samostatnými operátory. Panel exomu 1 (45 Mb) byl použit u 12plexových reakcí obohacení. Obohacené knihovny byly sekvenovány na přístroji NextSeq 550Dx s DNA GenerateFASTQ Dx. Hodnocení bylo provedeno posouzením pokrytí mužského specifického chromozomu Y v ženských vzorcích porovnáním s úrovní pozadí plné desky ženských vzorků a také indexovým zastoupením vzorků NTC.

Tabulka 10 Výsledky křížové kontaminace

Ženské vzorky s pokrytím mužského chromozomu Y v < 3x základní úrovně šumu	Indexové zastoupení v NTC
100 %	< 0,0005 %

## Účinnost aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx

Charakteristiky účinnosti aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx pro NovaSeq 6000Dx jsou uvedeny v *příbalové informaci k přístroji NovaSeq 6000Dx (dokument č. 200025276)*.

DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na NextSeq 550Dx poskytuje stejné pracovní postupy sekundární analýzy jako aplikace na NovaSeq 6000Dx, včetně následujících tří pracovních postupů: generování FASTQ, generování FASTQ a VCF pro detekci zárodečných variant a generování FASTQ a VCF pro detekci somatických variant.

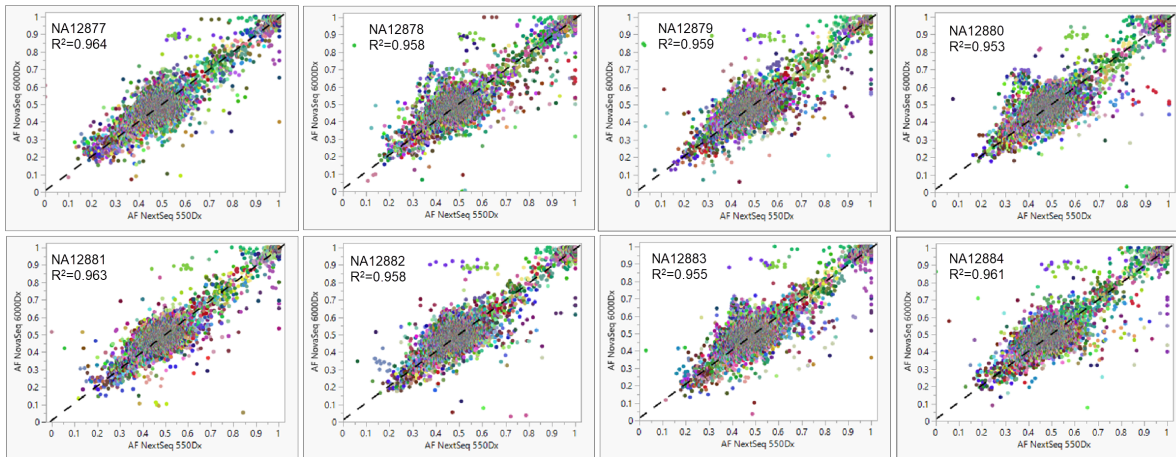
Ze stejné přípravné knihovny sekvenované na obou platformách bylo dosaženo srovnatelné účinnosti sekundární analýzy. Limit detekce varianty ([Tabulka 11](#)) a shoda frekvence ([Obrázek 1](#)) pro vzorky gDNA buněčné linie Coriell byly vyhodnoceny pomocí reprezentativního rozboru určeného k vyhledání různých genů zahrnujících 1 970 505 bází (9 232 cílů) napříč všemi 23 lidskými chromozomy. Bylo testováno osm vzorků DNA genomu Platinum Genome, sedm v šesti replikátech (NA12877, NA12878, NA12879, NA12880, NA12882, NA12883, NA12884) a jeden (NA12881) v pěti replikátech (viz [Obrázek 1](#)). Knihovny byly sekvenovány po třech bězích na přístrojích NovaSeq 6000Dx a NextSeq 550Dx a přiřazení variant bylo provedeno pomocí pracovního postupu generování FASTQ a VCF pro analýzu detekce germinálních variant v aplikaci DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx.

Na základě silné korelace mezi výkonem aplikací na přístrojích NovaSeq 6000Dx a NextSeq 550Dx se charakteristiky účinnosti týkající se sekundární analýzy uvedené v *příbalové informaci k přístroji NovaSeq 6000Dx (dokument č. 200025276)* považují za použitelné i pro DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx na aplikaci NextSeq 550Dx.

Tabulka 11 Výkonnost aplikace – míra detekce varianty pro SNV, inserce a delece

Panel	Míra detekce variant na NovaSeq 6000Dx	Míra detekce variant na NextSeq 550Dx
Panel pangenomu (1,97 Mb, 9 232 cílů, 23 chr.)	99,9 %	99,9 %

Obrázek 1 Porovnání frekvence variant pro NovaSeq 6000Dx a NextSeq 550Dx s analýzou aplikace DRAGEN for IDPE Dx



## Příloha: Illumina UD Indexes Adapter Sequences

Tyto jedinečné duální (UD) indexové adaptéry jsou v desce uspořádány tak, aby vynucovaly doporučenou strategii párování. Indexové adaptéry jsou namísto obvyklých osmi bází dlouhé 10 bází.

Adaptéry Index 1 (i7)

CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT [ i 7 ] GTCTCGTGGGCTCGG

Adaptéry Index 2 (i5)

AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC [ i 5 ] TCGTCGGCAGCGTC

Pro ořezávání adaptérů Read 1 a Read 2 se používá následující sekvence.

CTGTCTCTTATACATCT

## Indexové adaptéry desky A/Set 1

Název indexu	Základny i7 v adaptéru	Základny i5 v adaptéru
UDP0001	CGCTCAGTTC	TCGTGGAGCG
UDP0002	TATCTGACCT	CTACAAGATA
UDP0003	ATATGAGACG	TATAGTAGCT
UDP0004	CTTATGGAAT	TGCCTGGTGG
UDP0005	TAATCTCGTC	ACATTATCCT
UDP0006	GCGCGATGTT	GTCCACTTGT
UDP0007	AGAGCACTAG	TGGAACAGTA

Název indexu	Základny i7 v adaptéru	Základny i5 v adaptéru
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	ATGTCGTGGT	TCGTATGCGG
UDP0029	AGAGTGCGGC	TCCGACCTCG
UDP0030	TGCCTGGTGG	CTTATGGAAT
UDP0031	TGCGTGTAC	GCTTACGGAC
UDP0032	CATACACTGT	GAACATACGG
UDP0033	CGTATAATCA	GTCGATTACA
UDP0034	TACGCGGCTG	ACTAGCCGTG
UDP0035	GCGAGTTACC	AAGTTGGTGA
UDP0036	TACGGCCGGT	TGGCAATATT
UDP0037	GTCGATTACA	GATCACCGCG



Název indexu	Základny i7 v adaptéru	Základny i5 v adaptéru
UDP0038	CTGTCTGCAC	TACCATCCGT
UDP0039	CAGCCGATTG	GCTGTAGGAA
UDP0040	TGACTACATA	CGCACTAATG
UDP0041	ATTGCCGAGT	GACAAGTCAA
UDP0042	GCCATTAGAC	AGTGGTCAGG
UDP0043	GGCGAGATGG	TTCTATGGTT
UDP0044	TGGCTCGCAG	AATCCGGCCA
UDP0045	TAGAATAACG	CCATAAGGTT
UDP0046	TAATGGATCT	ATCTCTACCA
UDP0047	TATCCAGGAC	CGGTGGCGAA
UDP0048	AGTGCCACTG	TAACAATAGG
UDP0049	GTGCAACACT	CTGGTACACG
UDP0050	ACATGGTGTC	TCAACGTGTA
UDP0051	GACAGACAGG	ACTGTTGTGA
UDP0052	TCTTACATCA	GTGCGTCCTT
UDP0053	TTACAATTCC	AGCACATCCT
UDP0054	AAGCTTATGC	TTCCGTCGCA
UDP0055	TATTCTCAG	CTTAAKT
UDP0056	CTCGTGCGTT	GCCTCGGATA
UDP0057	TTAGGATAGA	CGTCGACTGG
UDP0058	CCGAAGCGAG	TACTAGTCAA
UDP0059	GGACCAACAG	ATAGACCGTT
UDP0060	TTCCAGGTAA	ACAGTTCCAG
UDP0061	TGATTAGCCA	AGGCATGTAG
UDP0062	TAACAGTGTT	GCAAGTCTCA
UDP0063	ACCGCGCAAT	TTGGCTCCGC
UDP0064	GTTTCGCGCCA	AACTGATACT
UDP0065	AGACACATTA	GTAAGGCATA
UDP0066	GCGTTGGTAT	AATTGCTGCG
UDP0067	AGCACATCCT	TTACAATTCC

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

## Indexové adaptéry desky B/Set 2

Název indexu	Základny i7 v adaptéru	Základny i5 v adaptéru
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
UDP0120	GGCCTGTCCT	CATTCCAGCT
UDP0121	TAGGTTCTCT	GGTTATGCTA
UDP0122	ACACAATATC	ACCACACGGT
UDP0123	TTCCTGTACG	TAGGTTCTCT
UDP0124	GGTAACGCAG	TATGGCTCGA

Název indexu	Základny i7 v adaptéru	Základny i5 v adaptéru
UDP0125	TCCACGGCCT	CTCGTGCGTT
UDP0126	GATACCTCCT	CCAGTTGGCA
UDP0127	CAACGTCAGC	TGTTTCGCATT
UDP0128	CGGTTATTAG	AACCGCATCG
UDP0129	CGCGCTAGA	CGAAGGTAA
UDP0130	TCTTGGCTAT	AGTGCCACTG
UDP0131	TCACACCGAA	GAACAAGTAT
UDP0132	AACGTTACAT	ACGATTGCTG
UDP0133	CGGCCTCGTT	ATACCTGGAT
UDP0134	CATAACACCA	TCCAATTCTA
UDP0135	ACAGAGGCCA	TGAGACAGCG
UDP0136	TGGTGCCTGG	ACGCTAATTA
UDP0137	TAGGAACCGG	TATATTTCGAG
UDP0138	AATATTGGCC	CGGTCCGATA
UDP0139	ATAGGTATTC	ACAATAGAGT
UDP0140	CCTTCACGTA	CGGTTATTAG
UDP0141	GGCCAATAAG	GATAACAAGT
UDP0142	CAGTAGTTGT	AGTTATCACACA
UDP0143	TTCATCCAAC	TTCCAGGTAA
UDP0144	CAATTGGATT	CATGTAGAGG
UDP0145	GGCCATCATA	GATTGTCATA
UDP0146	AATTGCTGCG	ATTCCGCTAT
UDP0147	TAAGGAACGT	GACCGCTGTG
UDP0148	CTATACGCGG	TAGGAACCGG
UDP0149	ATTCAGAATC	AGCGGTGGAC
UDP0150	GTATTCTCTA	TATAGATTTCG
UDP0151	CCTGATACAA	ACAGAGGCCA
UDP0152	GACCGCTGTG	ATTCTTATTG
UDP0153	TTCAGCGTGG	TATTCCTCAG
UDP0154	AACTCCGAAC	CGCCTTCTGA

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

Název indexu	Základny i7 v adaptéru	Základny i5 v adaptéru
UDP0185	GTTGGACCGT	TCTTACATCA
UDP0186	ACCAAGTTAC	CGCCATACCT
UDP0187	GTGTGGCGCT	CTAATGTCTT
UDP0188	GGCAGTAGCA	CAACCGGAGG
UDP0189	TGCGGTGTTG	GGCAGTAGCA
UDP0190	GATTAAGGTG	TTAGGATAGA
UDP0191	CAACATTCAA	CGCAATCTAG
UDP0192	GTGTTACCGG	GAGTTGTACT

## Historie revizí

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 200038118 v00	Červenec 2023	<p>První vydání. Předchozí dokument 200019584 byl nahrazen tímto dokumentem.</p> <p>Změny z dokumentu 200019584 v2 na tento nový dokument:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Přidán obsah podporující sekvenování na přístroji NextSeq 550Dx pomocí aplikace DRAGEN for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx Application for NextSeq 550Dx.</li> <li>• Zpřesněný seznam neposkytnutých reagentů.</li> <li>• Do části „Varování a preventivní opatření“ byly přidány informace o hlášení incidence.</li> <li>• Zpřesněné očekávání knihoven obohacení.</li> <li>• Přidán pokyn k přípravě 400 mM Tris-HCl, pH 8,0.</li> <li>• Odstraněna tisková chyba v kroku Příprava sekvenování.</li> </ul> <p>Změny provedené v dokumentu 200019584:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Přidán obsah podpory sekvenování na přístroji NovaSeq 6000Dx.</li> <li>• Přidány názvy a katalogová čísla sekvenačních systémů.</li> <li>• Odstraněny jedinečné informace o duálním indexování pro knihovny s jedním indexem.</li> </ul>

## Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah je vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. a jejich přidružených společností (dále jen „Illumina“). Slouží výlučně zákazníkovi ke smluvním účelům v souvislosti s použitím zde popsaných produktů a k žádnému jinému účelu. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen za žádným jiným účelem ani jinak sdělován, zveřejňován či rozmnožován bez předchozího písemného souhlasu společnosti Illumina. Společnost Illumina nepředává tímto dokumentem žádnou licenci na svůj patent, ochrannou známku, autorské právo či práva na základě zvykového práva ani žádná podobná práva třetích stran.

Pokyny v tomto dokumentu musí být důsledně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a řádně proškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaných produktů. Veškerý obsah tohoto dokumentu musíte před použitím takových produktů beze zbytku přečíst a pochopit.

**NEDODRŽENÍ POŽADAVKU NA PŘEČTENÍ CELÉHO TEXTU A NA DŮSLEDNÉ DODRŽOVÁNÍ ZDE UVEDENÝCH POKYŇŮ MŮŽE VÉST K POŠKOZENÍ PRODUKTŮ, PORANĚNÍ OSOB, AŽ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A POUŽÍVÁNÍ KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.**

**SPOLEČNOST ILLUMINA NA SEBE NEBERE ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽITÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ DÍLŮ TĚCHTO PRODUKTŮ NEBO SOFTWARE).**

© 2023 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejich příslušných vlastníků. Podrobné informace o ochranných známkách viz adresa [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktní údaje



Illumina, Inc.

5200 Illumina Way

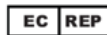
San Diego, Kalifornie 92122, Spojené státy americké

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com



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

### Australský zadavatel

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Austrálie

## Štítky na produktech

Úplné vysvětlení symbolů, které jsou uvedeny na balení a označení produktů, naleznete v přehledu symbolů na adrese [support.illumina.com](http://support.illumina.com) na kartě *Documentation* (Dokumentace) pro vaši sadu.