

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 1 из 24

1. **Цель:** Данная процедура описывает стандартизированный лабораторный протокол подготовки библиотеки ДНК энтеральных бактериальных организмов с использованием набора Illumina® DNA Prep kit для последующего секвенирования на платформе Illumina, что обеспечивает межлабораторную сопоставимость результатов секвенирования и оптимизирует результат и качество данных секвенирования.
2. **ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ:** Для использования сертифицированными специалистами PulseNet WGS при подготовке библиотек из ДНК энтеральных организмов с помощью набора Illumina® DNA Prep kit для секвенирования на платформах Illumina с целью предоставления данных секвенирования в PulseNet. Лаборатории могут вносить необходимые изменения в данную процедуру для использования в своих лабораториях после валидации в соответствии с рекомендациями лаборатории.  
**ПРИМЕЧАНИЕ1:** *Инструкции по объединению ампликонов Norovirus и Cyclospora в одном цикле с организмами PulseNet изложены в приложениях PNL35-1 и PNL35-2, соответственно.*  
**ПРИМЕЧАНИЕ2:** *Данный СОП отличается от протокола, предоставленного компанией Illumina, поскольку оригинальный протокол Illumina был оптимизирован для секвенирования 2 x 150 (300с). Протокол PulseNet был оптимизирован для секвенирования 2 x 250 (500с). Если ваша лаборатория придерживается оригинального протокола Illumina SOP, то рабочие книги, прилагаемые к протоколу PulseNet SOP, не позволят произвести точные расчеты.*
3. **ОПРЕДЕЛЕНИЯ:**
  - 3.1. **BaseSpace:** Облачная вычислительная среда Illumina для анализа, управления и хранения данных секвенирования следующего поколения, включая совместное использование данных.
  - 3.2. **BLT:** Транспозома, связанная с бусинами.
  - 3.3. **CD Index:** Комбинаторный двойной индекс.
  - 3.4. **CSV:** значения, разделенные запятыми (файл) или разделенные запятыми (файл).
  - 3.5. **ДНК:** Дезоксирибонуклеиновая кислота.
  - 3.6. **dsDNA:** Двухцепочечная ДНК.
  - 3.7. **ЕРМ:** Усовершенствованная смесь для ПЦР.
  - 3.8. **Fastq:** текстовый формат файла для хранения последовательности и соответствующих ей оценок качества.
  - 3.9. **GHS:** Согласованная на глобальном уровне система.
  - 3.10. **HS:** высокая чувствительность.
  - 3.11. **IPB:** очистительные бусины Illumina.
  - 3.12. **LRM:** локальный менеджер прогонов.
  - 3.13. **Mb:** Мегабаза.
  - 3.14. **Ng:** Нанограмм.
  - 3.15. **нМ:** Наномоляр.
  - 3.16. **ПЦР:** Полимеразная цепная реакция.
  - 3.17. **PHL:** Лаборатория общественного здравоохранения.
  - 3.18. **PN:** PulseNet.
  - 3.19. **PPE:** средства индивидуальной защиты.
  - 3.20. **PulseNet Central:** Группа PulseNet в CDC, состоящая из Группы реагирования и управления вспышками PulseNet ([PulseNet@cdc.gov](mailto:PulseNet@cdc.gov)) и Центральной лаборатории [PulseNetNGSlab@cdc.gov](mailto:PulseNetNGSlab@cdc.gov)
  - 3.21. **PulseNet/OutbreakNet SharePoint:** Закрытое веб-приложение для совместной работы, используемое для общения между участниками PulseNet.
  - 3.22. **КК:** Контроль качества.
  - 3.23. **RSB:** буфер для ресуспендирования.
  - 3.24. **SDS:** паспорт безопасности.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 2 из 24

- 3.25. **SOP:** Стандартная операционная процедура.
- 3.26. **TB1:** Тагментационный буфер 1.
- 3.27. **TSB:** Стоп-буфер для метки.
- 3.28. **TWB:** промывочный буфер для метки.
- 3.29. **Индекс UD:** Уникальный двойной индекс.
- 3.30. **WGS:** Полногеномное секвенирование.

#### 4. ОБЯЗАННОСТИ:

##### 4.1. Лаборатория общественного здравоохранения PulseNet:

- 4.1.1. Подготовка библиотек ДНК и, при необходимости, контроль качества для последующего проведения WGS.
- 4.1.2. Повторное секвенирование любых изолятов, не соответствующих пороговым значениям качества.
- 4.1.3. При необходимости информировать PulseNet Central о любых сложностях с лабораторными протоколами или подозрениях на проблемы с реагентами.

##### 4.2. PulseNet Central:

- 4.2.1. Проведите дополнительный анализ качества последовательностей, чтобы обеспечить обратную связь и поддержку PHL в устранении неполадок, если это необходимо.
- 4.2.2. Уведомление PN PHL, если представленные последовательности не соответствуют пороговым значениям качества.
- 4.2.3. При необходимости сообщайте PHL о любых предполагаемых проблемах с реагентами.
- 4.2.4. Регулярно поддерживать и пересматривать СОПы и размещать их в SharePoint.

#### 5. БЕЗОПАСНОСТЬ:

5.1. **Предупреждение о биобезопасности:** Данный документ описывает работу с ДНК и сопутствующими продуктами и не описывает передовые методы работы с биологическим инфекционным материалом.

5.2. **Предупреждение о химической безопасности:** Соблюдайте надлежащие меры предосторожности и надевайте соответствующие СИЗ при работе с потенциально опасными химическими веществами. Убедитесь, что химикаты, использованные контейнеры и неиспользованное содержимое утилизируются в соответствии с местными и государственными стандартами безопасности. **Дополнительную информацию см. во всех соответствующих SDS.**

##### 5.2.1. Illumina® DNA Prep Kit:

- 5.2.1.1. TSB: Категория 1 GHS по повреждению/раздражению глаз и вреден для водных организмов.
- 5.2.1.2. TB1: GHS Категория 4 по острой токсичности (пыль/туман), Категория 2A по раздражению глаз и Категория 1B по репродуктивной токсичности. Содержит N, N=диметилформамид.
- 5.2.1.3. EPM: GHS Категория 4 по острой пероральной токсичности и Категория 1 по токсичности для отдельных органов. Содержит тетраметиламмоний хлорид.

5.2.2. Этанол легко воспламеняется (категория воспламеняемости 2 по GHS).

#### 6. РЕАГЕНТЫ:

6.1. Illumina® DNA Prep (M) Tagmentation Kit (любой из следующих):

6.1.1. 96 образцов, с IPB, Illumina Cat# 20060059

6.1.2. 24 образца, с IPB, Illumina Cat# 20060060

Компоненты набора:

- Бусины + Буферы. Хранить при температуре от 15 до 30°C. **ПРИМЕЧАНИЕ:** на

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 3 из 24

*внешней этикетке указано хранение при 2-8°C, но во всех флаконах с компонентами указано хранение при температуре от 15 до 30°C.*

**PB (хранить вертикально)**

TSB

TWB

- **ПЦР + буферы.** Хранить при температуре от -25 до -15°C.

RSB

TB1

EBM

- **Тагментирующие (M) бусины.** Хранить при температуре 2-8°C.

BLT (хранить вертикально)

6.2. Индексы: выберите один из пунктов 6.2.1, 6.2.2 или 6.2.3.

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** *Необходимый набор(ы) индексов зависит от пропускной способности лаборатории и желаемого уровня мультиплексирования. Рекомендуется не использовать одну и ту же индексную пару в двух последовательных прогонах на одном и том же приборе, чтобы избежать переноса от прогона к прогону.*

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** *Индексы CD и UD нельзя смешивать в одном прогоне.*

**ПРИМЕЧАНИЕ3:** *IDT для индексов ДНК/РНК Illumina и индексы ДНК/РНК Illumina не могут быть смешаны в одном цикле.*

**ПРИМЕЧАНИЕ4:** *Индексы UD имеют адаптеры на ДЕСЯТЬ пар оснований, поэтому количество циклов считывания индексов на приборе должно быть установлено на 10 (с 8 для индексов CD).*

6.2.1. Индексы Nextera DNA CD. Хранить при температуре от -25°C до -15°C. Двойной индекс 96, формат пластины (96 образцов, Illumina Cat# 20018708).

6.2.2. IDT для индексов Illumina DNA/RNA UD. Хранить при температуре от -25°C до -15°C.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Эти наборы индексов будут сняты с производства: последняя дата заказа 29 января 2025 года или до тех пор, пока не закончатся запасы.*

6.2.2.1. Набор А, Tagmentation (96 индексов, 96 образцов, Illumina Cat# 20027213)

6.2.2.2. Набор В, Tagmentation (96 индексов, 96 образцов, Illumina Cat# 20027214)

6.2.2.3. Набор С, тегирование (96 индексов, 96 образцов, Illumina Cat # 20042666)

6.2.2.4. Набор D, Tagmentation (96 индексов, 96 образцов, Illumina Cat # 20042667)

6.2.3. Индексы Illumina DNA/RNA UD. Хранить при температуре от -25°C до -15°C.

6.2.3.1. Набор А, Tagmentation (96 индексов, 96 образцов, Illumina Cat # 20091654)

6.2.3.2. Набор В, Tagmentation (96 индексов, 96 образцов, Illumina Cat # 20091656)

6.2.3.3. Набор С, Tagmentation (96 индексов, 96 образцов, Illumina Cat # 20091658)

6.2.3.4. Набор D, тегирование (96 индексов, 96 образцов, Illumina Cat # 20091660)

6.3. Этанол, молекулярный класс, 95-100% (Fisher Scientific Cat# BP2818-500 или эквивалент)

6.4. Этанол, лабораторный, 70% или эквивалент для целей дезинфекции (Fisher Scientific Cat# 04-355-305 или эквивалент).

6.5. Вода, молекулярный класс (Fisher Scientific Cat# BP24701 или эквивалент).

6.6. Invitrogen™ Qubit™ dsDNA HS Assay Kit: выберите один из пунктов 6.6.1. или 6.6.2.

6.6.1. Концентрированный набор реагентов для анализа (100 анализов, Fisher Scientific Cat# Q32851 **ИЛИ** 500 анализов, Fisher Scientific Cat# Q32854) со следующими компонентами:

- dsDNA HS Reagent, компонент А (комнатная температура, беречь от света)
- Буфер для dsDNA HS, компонент В (комнатная температура)
- Стандарт dsDNA HS №1, компонент С ( $\leq 4^\circ\text{C}$ )
- Стандарт dsDNA HS №2, компонент D ( $\leq 4^\circ\text{C}$ )

6.6.2. 1x готовый к использованию набор реагентов для анализа (100 анализов, Fisher Cat# Q33230 **ИЛИ** 500 анализов Fisher Scientific Cat# Q33231) со следующими компонентами (2-

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 4 из 24

8°C):

- Рабочий раствор dsDNA HS, компонент А (комнатная температура, беречь от света).
- Стандарт dsDNA HS №1, компонент В ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ).
- Стандарт dsDNA HS №2, компонент С ( $\leq 4^{\circ}\text{C}$ ).

## 7. ПРИНАДЛЕЖНОСТИ:

- 7.1. 96-луночные ПЦР-планшеты, с бортиком, с жесткой оболочкой и низким профилем, тонкостенные (BioRad Cat# HSP-9601 или эквивалент).
- 7.2. Глубокие планшеты для хранения "MIDI", 96 лунок (Fisher Scientific Cat# AB-0859 или эквивалент) – **дополнительно**.
- 7.3. Лед.
- 7.4. Микроцентрифужные пробирки, 1,5 мл, стерильные (Fisher Scientific Cat# 05-408-129 или эквивалент).
- 7.5. Клейкое уплотнение Microseal B (BioRad Cat# MSB-1001 или эквивалент).
- 7.6. Клейкая фольгированная прокладка Microseal F (BioRad Cat# MSF-1001 или эквивалент) – **Дополнительно**.
- 7.7. Наконечники для пипеток, стерильные, с фильтром: 20 мкл, 200 мкл и 1000 мкл (Rainin Cat# 30389225, 30389239 & 30389212 или эквивалент).
- 7.8. Пробирки для анализа Qubit™ (Fisher Scientific Cat# Q32856 или эквивалент (прозрачные, тонкостенные 0,5 мл пробирки для ПЦР)).
- 7.9. Бассейны для растворов, стерильные (Fisher Scientific Cat# 13-681-504 или эквивалент).

## 8. ОБОРУДОВАНИЕ:

- 8.1. Ведерки/контейнеры для льда.
- 8.2. Invitrogen™ DynaMag™ -96 Магнит с боковыми бортиками (Fisher Scientific Cat# 12-027 или эквивалент).
- 8.3. Микроцентрифуга для быстрого вращения.
- 8.4. Микропипетки объемом от 1 мкл до 1000 мкл. Одноканальные и многоканальные (объемом 20 мкл и 100 мкл).  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Рекомендуется использовать два набора пипеток: один для работы с предварительно амплифицированным продуктом и реагентами, другой - для работы с амплифицированным продуктом и реагентами после ПЦР.*
- 8.5. Центрифуга для микропланшетов.
- 8.6. Флуорометр Qubit™ 4.0 (старые версии 2.0 или 3.0) или эквивалент для количественного определения dsDNA.
- 8.7. Термоциклер с подогреваемой крышкой, совместимый с 96-луночным ПЦР-планшетом объемом 0,2 мл.
- 8.8. Вортекс.

9. **ПРОЦЕДУРА:** Контрольный список подготовки ДНК Illumina (PNL35.W3 ) можно использовать во время подготовки библиотек в лаборатории в качестве записи о том, какие шаги были выполнены. Этот контрольный список также позволяет рассчитать объемы мастер-миксов. Краткое руководство (PNL35.JA1) с описанием метода подготовки библиотеки также доступно в качестве лабораторного справочника по процедуре подготовки библиотеки. Рабочая тетрадь по подготовке ДНК (PNL35.W1) может использоваться для планирования серий секвенирования (на iSeq, MiniSeq, MiSeq или NextSeq), включая назначение индексов, а также может быть распечатана и использована в лаборатории для записи партий реагентов и другой специфической информации о сериях. Рабочая книга для отслеживания индексов (PNL35.W4) может использоваться для присвоения индексов и для инвентаризации.

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** *Единственные безопасные точки остановки в процедуре - после этапа*

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 5 из 24

амплификации (9.4.), после очистки амплифицированных библиотек (9.5.) и после разведения до 4 нМ (9.6.).

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** При желании все этапы многоканального перемешивания в этом протоколе можно заменить использованием шейкера для пластин (1600 об/мин в течение 1 минуты).

**ПРИМЕЧАНИЕ3:** Убедитесь, что вортекс выключен после лизиса клеток во время выделения ДНК и на всех этапах подготовки библиотек.

**ПРИМЕЧАНИЕ4:** Документально подтверждено, что на плотность кластеров может негативно повлиять использование чистящих средств на основе аммония вблизи оборудования для секвенирования, включая лабораторные столы и пипетки, используемые для подготовки библиотек. **Не используйте четвертичные аммониевые соединения или салфетки рядом с оборудованием для секвенирования или на нем!**

### 9.1. (Необязательно) Подготовьте вкладку "Подготовка библиотеки" рабочей книги Illumina DNA Prep

**ПРИМЕЧАНИЕ:** **НЕ** удаляйте строки или столбцы в рабочей книге PNL35.W1! Это может привести к нарушению многих формул и таблиц поиска. Имеется множество строк для информации об образце; строки, которые не будут использоваться, можно скрыть с помощью функции "Скрыть" в Excel. Рабочая книга оформлена в следующей цветовой гамме:

- Белые поля должны быть заполнены
- Темно-серые поля необязательны для заполнения
- Синие поля содержат формулы, которые автоматически заполняются и не подлежат изменению
- Желтые индексные лунки указывают на то, что были выбраны дублирующие индексы
- Красные индексные лунки указывают на то, что были выбраны CD-индексы с индексами v2 и/или v3

9.1.1. Введите идентификатор цикла, используя формат PulseNet lab ID-Instrument ID-run start date: labID-MXXXX-YYMMDD. (например, CDC-M3235-240512).

9.1.2. Введите дату подготовки библиотеки, специалиста по подготовке библиотеки, тип/химию набора для секвенирования из выпадающего меню, дату секвенирования и специалиста по секвенированию.

9.1.3. Введите государственные ключи (идентификатор, введенный в поле "Ключ" базы данных PulseNet).

**ПРИМЕЧАНИЕ: Важно!** Имена Fastq-файлов будут назначены на вкладке Sample Sheet в соответствии с этим State Key и Run ID. Эти поля будут объединены для создания уникального префикса для результирующих fastq-файлов (например, Sample1-CDC-M3235-240512).

9.1.4. Введите оценку размера генома (на основе таблицы 1 ниже) для каждого организма в столбец E рабочей книги.

Организм	Предполагаемый размер генома (Мб)	Минимальное покрытие
<i>E. coli</i> u <i>Shigella</i> spp.	5	40x
<i>Salmonella</i> spp.	5	30x
<i>Vibrio cholerae</i>	4	40x
<i>Vibrio</i> spp.	5	40x
<i>Listeria monocytogenes</i>	3	20x
<i>Campylobacter</i> spp.	1.6	20x

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 6 из 24

<b><i>Cronobacter</i> spp.</b>	<b>4.5</b>	<b>40x</b>
<b><i>Yersinia</i> spp.</b>	<b>5</b>	<b>40x</b>

Таблица 1. Предполагаемый размер генома (в Мб) по организмам

9.1.5. Убедитесь, что количество изолятов в прогоне соответствует мощности используемого прибора и набора реагентов. Рекомендуемая загрузка ДНК для каждой из платформ секвенирования Illumina и картриджей, одобренных для использования в PulseNet, приведена в Таблице 2 ниже. Отдельные лаборатории, обладающие опытом и имеющие постоянную концентрацию библиотек и размеры фрагментов, могут превысить рекомендуемую нагрузку ДНК и при этом достичь требуемых минимальных уровней покрытия (Таблица 1) для всех изолятов в прогоне. Сумма размеров геномов (в Мб) для образцов в прогоне будет отображена в рабочей книге и равна предполагаемой нагрузке ДНК в прогоне.

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Более низкая рекомендуемая нагрузка ДНК для прогонов, содержащих *E. coli*, *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Cronobacter* spp. или *Yersinia* spp. обусловлена тем, что эти организмы требуют более высокого покрытия (40x) для последующих анализов по сравнению с другими организмами (20x или 30x). Поэтому для этих организмов требуется большее количество считываний/данных, полученных в ходе секвенирования, чтобы удовлетворить требованиям к покрытию.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** PulseNet ни при каких обстоятельствах не принимает последовательности, сгенерированные с параметрами циклирования ниже 300 циклов (2 x 150).

Набор для секвенирования (циклов)	Загрузка ДНК (Мб) без 40x организмов	Нагрузка ДНК (Мб) Запуски, содержащие 40x организмов
<b>MiSeq</b>		
v2 300	90	90
v2 500	100	100
v3 600	200	175
Micro (300)	35	30
Nano (500)	13	13
Nano (300)	13	10
<b>MiniSeq</b>		
Средний выход	60	60
Высокая производительность	100	100
<b>iSeq</b>		
iSeq v2	35	25

Таблица 2. Расчетная емкость загрузки ДНК (в Мб) для наборов реагентов Illumina.

9.1.6. Определите, какие индексы будут использоваться, и введите положение лунки индексной пластины (из индексной пластины). Лунку индексного планшета можно ввести вручную, выбрать из выпадающего списка или скопировать из рабочего листа отслеживания индексов.

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Рекомендуется не использовать одни и те же пары индексов в двух последовательных прогонах на одном секвенсоре, чтобы уменьшить количество переносов. Для резервирования/отслеживания использованных и доступных индексов

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 7 из 24

можно использовать рабочие листы отслеживания индексов, PNL35.W4.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Индексы CD и UD нельзя объединять в одном прогоне. Также не рекомендуется совмещать IDT для индексов Illumina DNA/RNA UD с индексами Illumina DNA/RNA UD.

**ПРИМЕЧАНИЕ3:** настоятельно рекомендуется использовать UD-индексы для этой процедуры; они имеют меньший скачок индекса в приборах, использующих узорчатые проточные кюветы (NextSeq, MiniSeq, iSeq), и сбалансированы по цвету, поскольку все последовательности индексов уникальны.

9.1.7. Введите объем исходной ДНК (рекомендуется 10 мкл), который будет добавлен в каждую лунку в начале процесса подготовки библиотеки.

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** PulseNet стандартизировал начальный объем ДНК до 10 мкл; однако рекомендуемое количество исходной ДНК для Illumina составляет 100-500 нг. При желании отдельные лаборатории могут корректировать объемы исходной ДНК, чтобы обеспечить попадание в этот диапазон.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Минимальный объем исходной ДНК составляет 2 мкл. Если ДНК слишком концентрирована, выполните разбавление, чтобы объем входной ДНК превысил 2 мкл, и продолжайте.

9.1.8. Вкладка "Подготовка ДНК" рабочей тетради теперь может быть распечатана для использования в лаборатории.

**9.2. Разбавление и маркировка исходной ДНК: На этих этапах ДНК фрагментируется, маркируется адаптерными последовательностями и связывается с BLT. Важно, чтобы бусины были хорошо взвешены на всех этапах процедуры.**

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Убедитесь, что ДНК, идущая на подготовку библиотеки, прошла проверку качества. Значение 260/280 должно составлять от 1,75 до 2,05. Дополнительную информацию см. в PNL33.

9.2.1. Дайте BLT (из холодильника) и ТВ1 (из морозильника) дойти до комнатной температуры.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Убедитесь, что BLT не заморожен и всегда хранится в вертикальном положении, чтобы бусины всегда оставались погруженными в буфер.

9.2.2. Наклейте этикетку на 96-луночный ПЦР-планшет или эквивалент с идентификатором прогона.

9.2.3. Добавьте воду молекулярного класса в каждую лунку с образцом (общий объем исходного материала для анализа - 30 мкл; объем воды - 20 мкл, если будет добавлено 10 мкл ДНК; объем автоматически рассчитывается и отображается в рабочей тетради).

9.2.4. Добавьте ДНК в воду молекулярного класса (в соответствии с объемом, указанным в рабочей книге, обычно 10 мкл) и хорошо перемешайте, осторожно пипетируя примерно 5-10 раз.

9.2.5. Вortexируйте BLT в течение **минимум** 10 секунд и проверьте правильность суспензии бусин; при необходимости повторите. Не центрифугируйте.

9.2.6. Перемешайте vortexом ТВ1 и выполните быстрое вращение.

9.2.7. Приготовьте мастер-смесь для мечения:

Реагент	Объем на образец
ТВ1	10 мкл
BLT	10 мкл

Таблица 3: Объемы реагентов на образец для мастер-смеси для мечения

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Количество подготавливаемых образцов можно ввести в контрольный

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 8 из 24

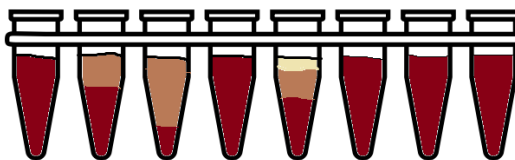
*список Illumina DNA Prep, PNL35.W3 ("контрольный список"), и объемы мастер-миксов будут автоматически рассчитаны с учетом избытка 2 образцов, уже включенных в расчет.*

9.2.8. Хорошо перемешайте мастер-смесь для мечения.

9.2.9. Добавьте 20 мкл мастер-смеси для мечения в каждую лунку с образцом.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Если одновременно готовится много образцов (т.е. более 8), может потребоваться периодически перемешивать мастер-смесь для мечения, чтобы убедиться, что она не оседает на этом этапе.*

9.2.10. Осторожно перемешайте смесь пипеткой, повторно взвешивая бусины (рекомендуется использовать многоканальную пипетку для перемешивания). Перед инкубацией проверьте лунки, чтобы убедиться в однородности образцов и мастер-смеси. Дополнительную информацию см. на рисунке 1 ниже.



**Рисунок 1.** Пример гомогенных и негомогенных лунок для образцов. Лунки 1, 4, 6, 7 и 8 хорошо перемешаны. Не должно быть цветовых полос ("закатов") снизу вверх по лункам. В лунках 2, 3 и 5 наблюдается такое оседание, и их следует повторно перемешать перед инкубацией.

9.2.11. Запечатайте планшет с помощью Microseal B (или эквивалентного материала) и инкубируйте его при 55°C в течение 15 минут, затем выдержите 10°C в термоциклере с крышкой, нагретой до 100°C (объем - 50 мкл).

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Рекомендуется предварительно запрограммировать термоциклер для этой цели.*

**9.3. Очистка меченой ДНК:** ДНК (теперь помеченная адаптерами и связанная с BLT) будет промыта перед амплификацией.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *При желании для следующих этапов промывки можно использовать глубоколоночный планшет MIDI. Это может улучшить формирование гранул и снизить риск перекрестного загрязнения. Образцы необходимо перенести в 96-луночный ПЦР-планшет с бортиком для проведения этапов в термоциклере.*

9.3.1. Убедитесь, что TSB находится при комнатной температуре, и проверьте отсутствие осадка (если осадок выпал, прогрейте его при 37°C в течение 10 минут или до растворения и перемешайте вихрем).

9.3.2. Добавьте 10 мкл TSB к каждому образцу.

9.3.3. Осторожно пипетируйте, чтобы перемешать. Проверьте лунки, чтобы убедиться в однородности образцов и мастер-смеси перед инкубацией. См. рисунок 1.

9.3.4. Запечатайте планшет с помощью Microseal B или эквивалентного материала.

9.3.5. Инкубируйте при 37°C в течение 15 минут и выдержите при 10°C на термоциклере с крышкой, предварительно нагретом до 100°C.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Рекомендуется предварительно запрограммировать термоциклер для этой цели.*

9.3.7. После того как образцы достигнут температуры 10°C, извлеките планшет из термоциклера и выполните быстрый спин.

9.3.8. Поместите на магнит на 3 минуты (или пока бусины не образуют плотную гранулу).

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Если через 3 минуты плотная гранула не образуется, осторожно*

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 9 из 24

*отберите образцы, которые не образовали гранулу, и дайте им побыть на магните еще 3 минуты.*

9.3.9. Удалите и выбросьте надосадочную жидкость.

9.3.10. Снимите планшет с магнита и добавьте 100 мкл TWB непосредственно к гранулам.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *При желании для промывки TWB можно использовать бассейн для растворов и многоканальную пипетку.*

9.3.11. Осторожно пипетируйте (во избежание вспенивания), чтобы перемешать до полного ресуспендирования бусин.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Пипетируйте осторожно. Может произойти некоторое вспенивание, но следует избегать чрезмерного вспенивания TWB, так как вспенивание может привести к потере образца.*

9.3.12. Поместите обратно на магнит на 3 минуты (или пока бусины не образуют плотную гранулу).

9.3.13. Удалите и выбросьте надосадочную жидкость.

9.3.14. Снимите с магнита и осторожно добавьте 100 мкл TWB непосредственно к гранулам.

9.3.15. Осторожно перемешайте пипеткой (не допуская вспенивания) до полного ресуспендирования бусин.

9.3.16. Поместите обратно на магнит на 3 минуты (или пока бусины не образуют плотную гранулу).

9.3.17. Удалите и выбросьте надосадочную жидкость.

9.3.18. Снимите с магнита, добавьте 100 мкл TWB непосредственно к бусинам и осторожно пипетируйте для ресуспендирования.

9.3.19. Поместите обратно на магнит на 3 минуты, позволяя TWB оставаться в лунках (чтобы предотвратить высыхание бусинок), и переходите к этапам амплификации.

**9.4. Амплификация меченой ДНК: Индексы добавляются к меченой ДНК, и происходит амплификация. Во время ПЦР ДНК будет высвобождаться из VLT-бусин.**

9.4.1. Разморозьте EPM на льду и разморозьте индексы при комнатной температуре.

9.4.2. Перед использованием размороженного EPM проведите короткое вортексирование и быстрое вращение.

9.4.3. Приготовьте мастер-смесь для ПЦР:

Реагент	Объем на образец
EPM	20 мкл
Вода молекулярного класса	20 мкл

Таблица 4: Объемы реагентов на образец для мастер-микса ПЦР.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Количество подготавливаемых образцов можно ввести в контрольный список Illumina DNA Prep, и объемы мастер-миксов будут рассчитаны автоматически, при этом избыток в 2 образца уже включен в расчет.*

9.4.4. Вортекс и быстрое вращение мастер-смеси для ПЦР.

9.4.5. Удалите TWB из лунок.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Удаление TWB очень важно, так как он может помешать проведению ПЦР. Рекомендуется использовать пипетку небольшого объема для удаления всех остатков TWB. Оставшаяся на лунках пена не окажет негативного влияния на библиотеку.*

9.4.6. Снимите с магнита и сразу же добавьте 40 мкл мастер-смеси для ПЦР к каждому образцу.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Рекомендуется убедиться, что каждая гранула погружена или смочена мастер-смесью, прежде чем переходить к следующей лунке, и добавить мастер-смесь во*

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 10 из 24

*все лунки до смешивания, чтобы избежать высыхания бусин.*

- 9.4.7. Аккуратно пипетируйте, чтобы хорошо перемешать, обеспечивая ресуспендирование гранул.
- 9.4.8. Добавьте индексы к образцам:
- 9.4.8.1. Каждая лунка индексного планшета содержит уникальную индексную пару в одноразовом объеме. Добавьте 10 мкл соответствующей индексной пары из лунки индексного планшета в каждую лунку образца, как указано в рабочей книге (PNL35.W1).
- 9.4.8.2. После использования/прокалывания лунок их **необходимо запечатать** с помощью лабораторной ленты или Microseal F или эквивалента для предотвращения перекрестного загрязнения индексов.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Рекомендуется проколоть фольгу нужной лунки на индексной пластине новым наконечником пипетки, а затем использовать свежий наконечник пипетки для удаления индексов из лунок.*
- 9.4.9. Пипетируйте не менее 10 раз для перемешивания.
- 9.4.10. Осмотрите лунки, чтобы убедиться, что все образцы однородны. Этот шаг имеет решающее значение для эффективного индексирования и последующего извлечения продукта. См. рисунок 1.
- 9.4.11. Запечатайте планшет с помощью Microseal B или эквивалентного материала, поместите его в термоциклер и выполните следующие запрограммированные настройки с подогреваемой крышкой (100°C):
- Шаг 1: 68°C в течение 3 минут
  - Шаг 2: 98°C в течение 3 минут
  - Шаг 3: 5 циклов
    - 98°C в течение 45 секунд
    - 62°C в течение 30 секунд
    - 68°C в течение 2 минут
  - Шаг 4: 68°C в течение 1 минуты
  - Шаг 5:
    - Выдержите при 10°C
    - Общий объем: 50 мкл.
- 9.4.12. Центрифугируйте планшет при 280 x g в течение 1 минуты.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Это безопасная точка останова. Планшет можно запечатать Microseal B или эквивалентным средством и хранить при 2-8°C или оставить в термоциклере при 10°C на 3 дня.*

**9.5. Очистка и отбор по размеру амплифицированных библиотек: Эта процедура очистки с использованием двух бусин предназначена для очистки и отбора библиотек по размеру. Целевые размеры фрагментов составляют 800-1000 п.н.**

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** *Перечисленные ниже шаги очень важны для эффективного отбора по размеру, извлечения продуктов и, соответственно, создания кластеров и секвенирования. Всегда проверяйте наконечники пипеток на правильность объема и убедитесь, что бусины не были случайно аспирированы на этапах, где удаляется супернатант. Если бусины были случайно аспирированы или гранулы бусин были нарушены, дайте гранулам вновь сформироваться и повторите шаг. Также важно убедиться, что бусины хорошо суспендированы на всех этапах "пипетирования для смешивания", как описано ниже.*

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 11 из 24

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Размер целевого фрагмента 800-1000 п.н. был оптимизирован для протокола PulseNet (вместо размера фрагмента 500 п.н., на который ориентирована оригинальная процедура подготовки ДНК Illumina), чтобы лучше облегчить использование химии для секвенирования с 500 циклами.

9.5.1. Доведите RSB до комнатной температуры (из замороженного состояния) и перемешайте вихрем.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** RSB находится в коническом сосуде объемом 50 мл. Для более быстрого оттаивания рекомендуется аликвотировать и замораживать меньшие объемы после первого открытия.

9.5.2. Если планшет был извлечен из холодильной камеры, центрифугируйте его при 280 x g в течение 1 минуты.

9.5.3. Поместите планшет на магнит на 5 минут (или пока бусины не образуют плотную гранулу).

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Если через 5 минут в лунках не образуются плотные гранулы, осторожно ресуспендируйте их и дайте время для образования плотной гранулы.

9.5.4. Перенесите 45 мкл надосадочной жидкости (теперь содержащей ДНК) в новые лунки.

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** При желании для этапов с 9.5.5. по 9.5.26. можно использовать MIDI-планшет. Это может улучшить гранулирование бисера и уменьшить тенденцию к срыву бисера с магнита во время удаления конечного продукта на этапе окончательного элюирования.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Если во время мечения и ПЦР произошла потеря образца, важно поддерживать соответствующее соотношение мастер-смеси IPB и ДНК (1,88x) для восстановления библиотеки нужной длины. Отмерьте и перенесите как можно больше полученного супернатанта и добавьте соответствующий объем мастер-смеси IPB из таблицы 5 ниже. **Не корректируйте последующий объем исходного IPB в протоколе, так как это негативно скажется на выходе восстановления продукта.** Если для переноса доступно менее 30 мкл образца, не продолжайте отбор по размеру, а повторите подготовку библиотеки.

Объем ДНК, извлеченной после мечения (мкл)	Объем добавляемой мастер-смеси IPB (мкл)
40	75.2
35	65.8
30	56.4

Таблица 5. Скорректированные объемы мастер-смеси IPB в случае потери образца.

9.5.5. Для полного ресуспендирования бисера несколько раз проведите вихревое смешивание и инвертируйте бульон IPB.

9.5.6. Приготовьте мастер-микс IPB:

Реагент	Объем на образец
IPB	40,8 мкл
Вода молекулярного класса	44,2 мкл

Таблица 6: Объемы реагентов на образец для мастер-микса IPB

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Количество подготавливаемых образцов можно ввести в контрольный список подготовки ДНК, и объемы мастер-микса будут рассчитаны автоматически, при этом избыток в 2 образца уже будет включен в расчет.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 12 из 24

- 9.5.7. Снимите планшет с образцами с магнита.
- 9.5.8. Тщательно перемешайте мастер-смесь IPB и добавьте 85 мкл в каждый образец (или соответствующий объем из Таблицы 5 выше, если применимо).
- 9.5.9. Пипетируйте для смешивания не менее 10 раз; рекомендуется использовать многоканальный дозатор.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Будьте осторожны при смешивании, так как объем будет > 100 мкл.*
- 9.5.10. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 9.5.11. Поместите на магнит на 3 минуты (или пока бусины не образуют плотную гранулу).
- 9.5.12. Во время инкубации перемешивайте IPB в вихревом режиме.
- 9.5.13. После инкубации, не снимая планшет с магнита, перенесите 125 мкл надосадочной жидкости (содержащей ДНК) в новые лунки (самые длинные фрагменты ДНК останутся).  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Если объем IPB был изменен из-за потери продукта, объем надосадочной жидкости, перенесенной в новые лунки, будет меньше. Перенесите как можно больше надосадочной жидкости.*
- 9.5.14. Снимите планшет с магнита и добавьте в супернатант 15 мкл хорошо взвешенного **исходного ИПБ** (соотношение неразбавленного бисера и ДНК 0,12).  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Обязательно добавляйте из пробирки с неразбавленным IPB, а не из ранее приготовленной мастер-смеси IPB. Случайное использование мастер-смеси IPB резко снизит выход.*
- 9.5.15. Аккуратно пипетируйте не менее 10 раз, чтобы перемешать.
- 9.5.16. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут.
- 9.5.17. Разведите достаточное количество свежего 80 % этанола для всех образцов:

Реагент	Объем на образец	Пример: 20 образцов
100% этанол	0,4 мл	8 мл
Молекулярная вода	0,1 мл	2 мл

Таблица 7: Объемы реагентов на образец для 80% этанола.

- 9.5.18. Поместите пластину с образцами на магнит на 3 минуты (или пока бусины не образуют плотную гранулу, а надосадочная жидкость не очистится).
- 9.5.19. Удалите и выбросьте надосадочную жидкость (нужные библиотеки связаны с бусинами; самые короткие библиотеки в надосадочной жидкости отбрасываются).
- 9.5.20. Выполните описанные ниже действия (9.5.20.1-9.5.20.3) дважды, всего две промывки:
- 9.5.20.1. Пока пластина находится на магните, добавьте 170 мкл свежего 80% этанола.  
**ПРИМЕЧАНИЕ1:** *Не добавляйте непосредственно к гранулам бусин, не перемешивайте и не снимайте с магнита во время промывки.*  
**ПРИМЕЧАНИЕ2:** *При желании для этанола можно использовать бассейн для растворов.*
- 9.5.20.2. Инкубируйте в течение 30 секунд.
- 9.5.20.3. Удалите и отбросьте супернатант.
- 9.5.21. После второй промывки при необходимости удалите излишки этанола с помощью пипетки небольшого объема.
- 9.5.22. Дайте бусинам высохнуть на воздухе в течение 3-5 минут.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Не допускайте пересушивания или растрескивания бусин. Рекомендуется выбирать меньшее время сушки. Если наблюдается растрескивание, немедленно ресуспендируйте бусины, как описано ниже, независимо от времени сушки.*
- 9.5.23. Снимите с магнита и добавьте 32 мкл RSB. Рекомендуется быстро добавить RSB в каждую гранулу образца, а затем вернуться и перемешать многоканальной пипеткой после того, как

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 13 из 24

все гранулы будут смочены.

9.5.24. Пипетируйте осторожно и тщательно перемешивайте.

9.5.25. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 2-5 минут.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Более длительная инкубация (5-10 минут) предпочтительна для оптимального выхода и восстановления более длинных библиотек. При низком выходе (менее 10 нг/мкл) время инкубации RSB может быть увеличено до 8 минут.

9.5.26. Поместите на магнит на 3 минуты (или пока надосадочная жидкость не станет прозрачной).

9.5.27. Перенесите 30 мкл надосадочной жидкости в новые лунки (или в лунки нового планшета) - это и есть конечный продукт.

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Если для этого шага используется ПЦР-планшет с бортиком, гранулы могут соскользнуть с магнита. Чтобы предотвратить аспирацию бисера, допустимо уменьшить объем восстановления до 25 мкл.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** На этом этапе для отдельных библиотек можно выполнить этап количественного определения (набор Qubit dsHS или эквивалентный) и при желании записать результаты в Рабочую книгу. См. PNL33 для получения конкретных инструкций по работе с Qubit. Проверка концентрации библиотек после очистки рекомендуется для новых пользователей набора Illumina DNA Prep и для устранения неполадок. Идеальный выход библиотек составляет 10-20 нг/мкл. Успешное секвенирование библиотек с выходом менее 10 нг/мкл возможно, но свидетельствует о неэффективной подготовке библиотеки. Концентрация библиотек, значительно превышающая 20 нг/мкл, также указывает на вероятную ошибку в процессе подготовки библиотеки, и ее следует повторить.

**ПРИМЕЧАНИЕ3:** Качество отдельных библиотек можно также проверить с помощью фрагментного анализа, особенно для новых пользователей набора Illumina DNA Prep, для устранения неполадок или при мультиплексировании библиотек из нескольких партий препаратов для прибора для секвенирования с высокой пропускной способностью. Средний размер фрагмента должен составлять 800-1000 п.н., а график распределения фрагментов должен отображать плотный хорошо сформированный пик. Библиотеки с очень маленькими или большими средними размерами фрагментов, очень широкими пиками или двойными пиками должны быть повторно подготовлены.

**ПРИМЕЧАНИЕ4:** Это безопасная точка останова. Планшет можно запечатать Microseal B или аналогичным средством и хранить при температуре -20°C не более 30 дней в соответствии с рекомендациями Illumina. Более длительное хранение возможно, но повторные циклы замораживания-размораживания библиотек приведут к потере выхода.

## 9.6. Пул библиотек

9.6.1. Внесите по 5 мкл каждой библиотеки в новую лунку, за исключением случаев, указанных ниже в таблице 8, и хорошо перемешайте пипеткой.

Организм	Прибор	Объем пула (мкл)
<i>Campylobacter</i>	MiSeq, MiniSeq	2.5
<i>Campylobacter</i>	iSeq	2.0
<i>Listeria</i>	iSeq	2.0

Таблица 8. Исключения из объема объединения 5 мкл для библиотек Illumina DNA Prep

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Более низкие объемы объединения необходимы для достижения более сбалансированной работы. Это поможет избежать чрезмерного покрытия из-за малого размера генома и более низких требований к покрытию.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 14 из 24

- 9.6.2. Количественно определите пул, используя набор Qubit dsHS или аналогичный. Инструкции по работе с Qubit см. в СОП PNL33.
- 9.6.3. Дополнительно: проведите фрагментный анализ для определения среднего размера фрагментов пула.
- 9.6.4. Введите концентрацию (нг/мкл) для пула в соответствующую ячейку Рабочей книги.
- 9.6.5. Рассчитайте молярность (нМ) пула:

(Показания Кубита нг/мкл/ (660 г/моль x 1000bp)) x 10<sup>6</sup>

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Рабочая книга автоматически рассчитает и отобразит это значение.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Формула в рабочей книге основана на предполагаемом среднем размере фрагмента в 1000 пар оснований (синим цветом выше), который является оптимальным для 500 циклов секвенирования (и отклоняется от оригинальной СОП компании Illumina). Если в лабораториях после подготовки библиотеки образуются фрагменты, размер которых значительно отличается от 1000 п.н., они могут соответствующим образом скорректировать эту формулу, поскольку это позволит точнее определить концентрацию библиотеки и разбавление до загрузочной концентрации.

Например, если анализ фрагментов показывает, что средняя длина библиотеки составляет около 800 п.н., то формула будет выглядеть следующим образом: (Qubit reading ng/μl/ (660g/mol x 800bp)) x 10<sup>6</sup>, поэтому ячейку для расчета молярности необходимо изменить на "(PoolConcentration/(660\*800))\*10<sup>6</sup>". При необходимости обратитесь за помощью по адресу [PulseNetNGSLab@cdc.gov](mailto:PulseNetNGSLab@cdc.gov).

- 9.6.6. Рассчитайте объем (мкл) пула, необходимый для получения 50 мкл 4 нМ пула:  
(200/молярность пула) = объем пула для разбавления

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Рабочая книга автоматически рассчитает и отобразит это значение.

- 9.6.7. Рассчитайте необходимый объем (мкл) разбавителя RSB:  
50 - объем бассейна = объем требуемого РСБ

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Рабочая книга автоматически рассчитает и отобразит это значение.

- 9.6.8. В новой лунке разбавьте пул до 4 нМ, добавив рассчитанный объем пула библиотек к рассчитанному объему RSB.

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Теперь объединенные библиотеки готовы к секвенированию, либо планшет можно запечатать Microseal B или эквивалентным средством и хранить при температуре -20°C не более 48 ч. Если вы продолжаете секвенирование, перейдите к соответствующему СОП для секвенирования на приборах, чтобы получить инструкции (PNL38, PNL39, PNL40) по денатурации и/или разбавлению пула до нужной концентрации загрузки. SOP для секвенирования NextSeq еще разрабатывается, но в приложении PNL35-3 описаны шаги, необходимые для использования вкладки шаблона импорта образцов в PNL35.W1 для создания листа образцов для NextSeq.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Чтобы включить норовирус или циклоспору в цикл секвенирования PulseNet, обратитесь к приложениям PNL35-1 и PNL35-2, соответственно, за инструкциями по добавлению библиотек норовируса и циклоспору в пул бактериальных библиотек размером 4 нМ.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

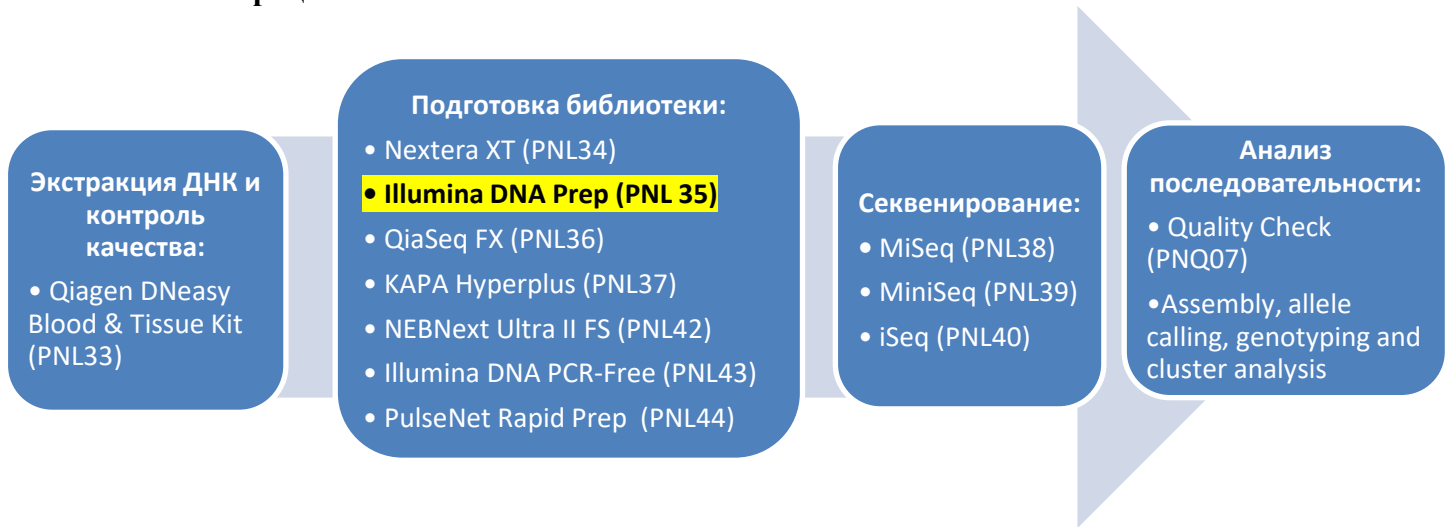
Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 15 из 24

**10. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ КАРТЫ:**

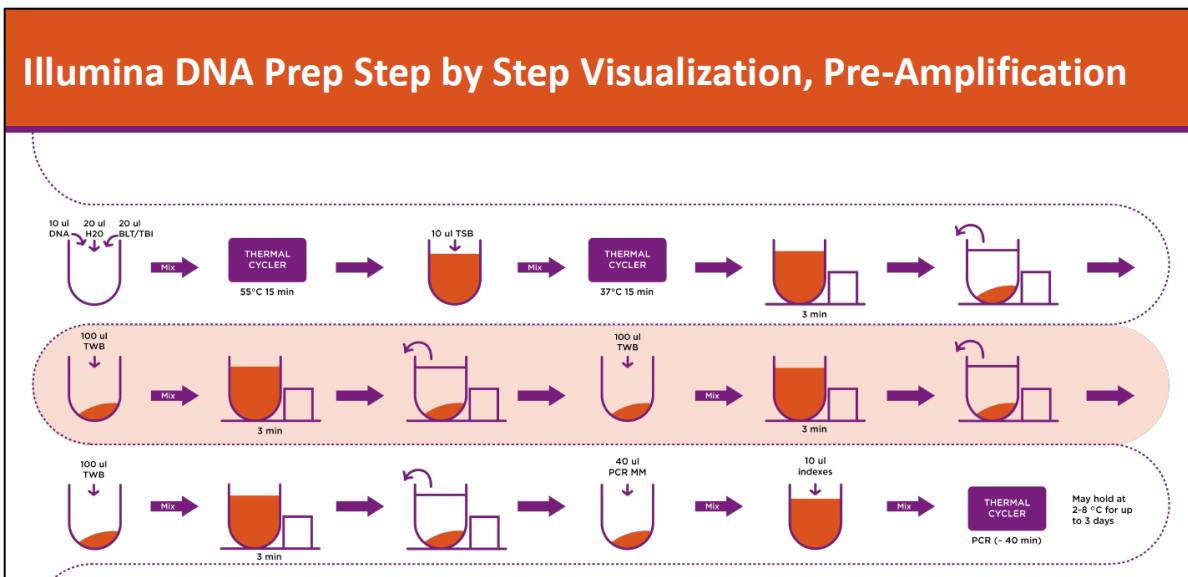
**10.1. Рабочие процессы PulseNet WGS:**



**10.2. Рабочий процесс подготовки библиотек Illumina DNA Prep:**



**10.3. Подробная визуализация рабочего процесса подготовки библиотеки Illumina DNA Prep**



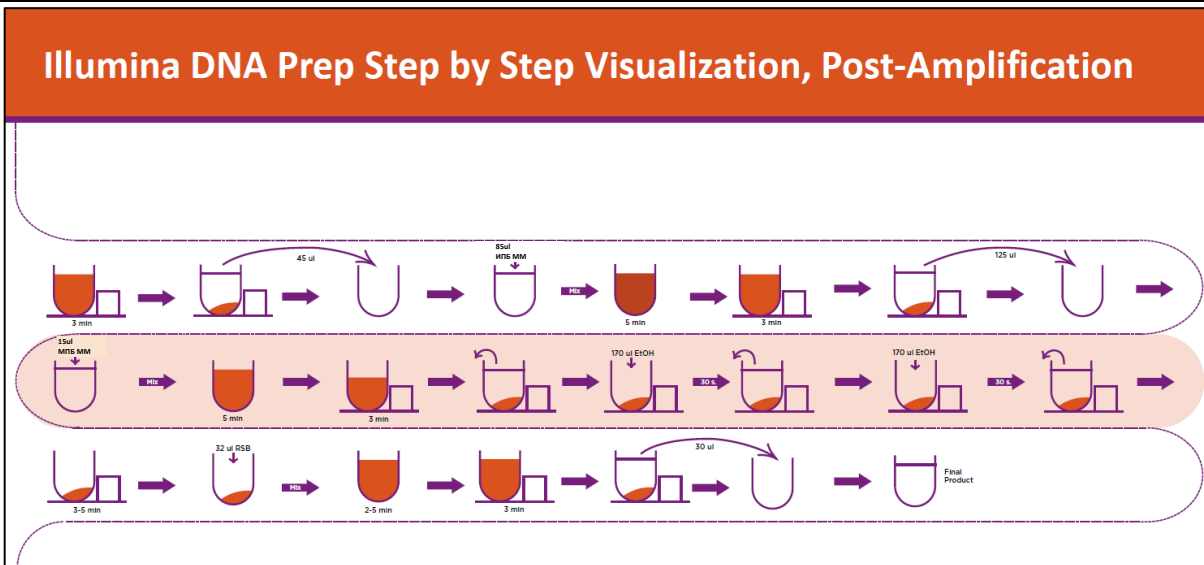
**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 16 из 24



## 11. СОПУТСТВУЮЩИЕ ДОКУМЕНТЫ:

Номер документа	Название
PNL33	СОП по экстракции ДНК и контролю качества
PNL38	Секвенирование на приборе MiSeq SOP
PNL39	Секвенирование на MiniSeq SOP
PNL40	Секвенирование на iSeq SOP
PNQ07	СОП по контролю качества данных последовательностей Illumina
PNL35.W1	Illumina DNA Prep Workbook, 96 CD/UD Indexes, отдельные листы образцов для MiSeq LRM, MiniSeq LRM и iSeq LRM, а также шаблон импорта образцов для NextSeq LRM
PNL35.W3	Контрольный список подготовки ДНК Illumina
PNL35.W4	Рабочий лист шаблона отслеживания индекса подготовки ДНК Illumina
PNL35.JA1	Краткое руководство по подготовке ДНК Illumina Должностная инструкция
VGB.NV.METHOD.002	Протокол RT-PCR для амплификации полноразмерных геномов Norovirus GI1
AMD.DR.C.001	SOP по генотипированию вспышки циклоспорины в штате

## 12. ПОЛЕЗНЫЕ ДОКУМЕНТЫ:

- 12.1. Illumina, Inc. Index Adapters Pooling Guide. (Doc.# 1000000041074 v13). February 2024.  
<https://support-docs.illumina.com/SHARE/IndexAdaptersPooling/Content/SHARE/FrontPages/IndexAdapterPooling.htm>
- 12.2. Illumina, Inc. Illumina DNA Prep Checklist (Doc.# 1000000033561 v05). June 2020.  
[https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/illumina\\_prep/illumina-prep-checklist-1000000033561-05.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/illumina_prep/illumina-prep-checklist-1000000033561-05.pdf)
- 12.3. Illumina, Inc. Illumina DNA Prep Reference Guide (Doc.# 1000000025416 v09). June 2020.  
[https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry\\_documentation/illumina\\_prep/illumina-dna-prep-reference-guide-1000000025416-v09.pdf](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/illumina_prep/illumina-dna-prep-reference-guide-1000000025416-v09.pdf)

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 17 из 24

[reference-guide-1000000025416-09.pdf](https://www.illumina.com/reference-guide-1000000025416-09.pdf)

12.4. Graphic 1 (basic design): Ko, Julie. PCR Tube. The Noun Project.

<https://thenounproject.com/search/?q=pcr&i=1702287>

12.5. Illumina, Inc. Customer Notification. November 10, 2021.

<https://support.illumina.com/bulletins/2019/09/impact-of-ammonium-based-cleaning-products-on-sequencing-run-per.html>

### 13. КОНТАКТЫ:

13.1. Учетная запись для устранения неполадок в PulseNet NGS Lab: [PulseNetNGSLab@cdc.gov](mailto:PulseNetNGSLab@cdc.gov)

### 14. ИЗМЕНЕНИЯ:

14.1. **01/28/19:** Новый документ

14.2. **04/09/20:** Добавлены примечания, основанные на отзывах и опыте PHL, добавлена таблица 7, добавлены рабочие процессы и информация о iSeq/MiniSeq. Сделано несколько приложений в виде отдельных рабочих тетрадей и добавлено краткое руководство.

14.3. **03/30/2021:** Обновлен SOP с новым названием набора Nextera DNA Flex: Illumina® DNA Prep. Обновлены каталожные номера и добавлен IDT для индексов Illumina UD. Обновлен раздел ссылок. Добавлено приложение PNL35-1 для инструкций по проведению комбинированных прогонов с PulseNet-организмами и вирусными ампликонами, а также добавлена схема рабочего процесса для этой процедуры.

14.4. **02/01/2023:** Обновлены каталожные номера и добавлены примечания к наборам для подготовки библиотек и индексов, которые устарели по сравнению с Illumina. Добавлена формулировка, объясняющая все существенные отклонения от СОП компании Illumina, а также формулировка, облегчающая отклонения от этого СОП, например, использование большей емкости загрузки ДНК, чем минимальная, рекомендованная PulseNet. Добавлены инструкции по объединению библиотек для iSeq. Добавлен PNL35-2 для инструкций по проведению комбинированных прогонов с организмами PulseNet и ампликонами *Cyclospora*, а также добавлена схема рабочего процесса для этой процедуры. Обновлены рабочие книги с учетом изменений в индексных наборах (PNL35.W1, PNL35.W4), добавлен лист с образцами MiniSeq LRM в PNL35.W1, добавлен контрольный список MiniSeq в PNL35-W3 и добавлен лист с образцами LRM3 в PNL35.W2. Обновлен PNL35.JA1, чтобы включить использование IPB.

14.5. **06/27/2024:** Обновлены каталожные номера и добавлены примечания для наборов с индексом, которые будут сняты с производства. Удалена Microseal A из процедуры, поскольку Microseal B лучше предотвращает потерю образца из-за испарения во время работы термоциклера. В Таблицу 1 добавлены требования к минимальному охвату *Cronobacter* и *Yersinia*. Удалены все ссылки на SPB. Добавлена настоятельная рекомендация использовать в данной процедуре UD-индексы вместо CD-индексов. Скорректирована Таблица 5 (компенсация потери образца при отборе размера) таким образом, что потеря образца допустима только в объеме до 20 мкл. Если образец был потерян в большем объеме, то библиотеку необходимо пересобирать. Добавлен фрагментный анализ в качестве дополнительного этапа контроля качества. Рабочие книги PNL35.W1 и PNL35.W4 обновлены с учетом новых индексов Illumina DNA-RNA UD v3 и текущей версии модулей Generate FASTQ. Из PNL35.W1 удалены таблицы образцов для IEM и LRM версий ранее 3, а шаблон импорта образцов NextSeq добавлен в качестве вкладки вместе с инструкциями по его использованию в приложении PNL35-3. Вкладка Metrics в PNL35.W1 была обновлена, чтобы удалить расчет покрытия с использованием версий LRM2 или более ранних. Также добавлена подсветка образцов с неудачным покрытием на вкладке "Метрики". Рабочая книга PNL35.W2 была снята с производства. Удалены все ссылки на BioNumerics.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С  
ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 18 из 24

**15. ПОДПИСИ ПОД УТВЕРЖДЕНИЕМ:**

Утверждено: \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_  
Персонал ОК/КК

Утверждено: \_\_\_\_\_ N/A \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_ NA \_\_\_\_\_  
Руководитель группы реагирования и управления вспышками PulseNet

Утверждено \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_  
Технический руководитель группы PulseNet WGS

Утверждено \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_  
Руководитель группы по надзору за вспышками заболеваний PulseNet

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 19 из 24

**16. ПРИЛОЖЕНИЯ:**

**Приложение PNL35-1. Объединение организмов PulseNet и ампликонов норовируса в одном цикле секвенирования**

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Нет необходимости снижать нагрузку на ДНК бактерий. Библиотеки вирусных ампликонов можно добавлять в прогоны секвенирования PulseNet, которые считаются "полными прогонами" для выбранного набора для секвенирования.

1. Подготовьте ампликоны (максимум 48 образцов), как описано в VGB.NV.METHOD.002 RT-PCR Protocol for Amplification of Full-Length Norovirus GI and GII Genomes.
2. Подготовьте библиотеки секвенирования из ампликонов образцов, как описано в PNL35.
3. Соберите в пул равные объемы библиотек и разбавьте до 4 нМ. Для разбавления пула до 4 нМ следуйте расчетам, приведенным в таблице 9.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Расчеты автоматизированы в рабочей книге PNL35.W1.

	Пример расчета	Уравнения
Концентрация пула (значение Qubit, нг/мкл):	10.6	
Молярность (нМ) = (концентрация/(660 г/моль x 400 п.н.) x 10 <sup>6</sup> ):	40.15	=(Концентрация пула/(660*400))*10 <sup>6</sup>
Объем пула для разбавления (мкл) = (нМ)(х)=(4 нМ)(50 мкл):	4.98	=4*50/молярность
Объем RSB для разбавления (мкл) = 50 - объем пула:	45.02	=50-объем пула

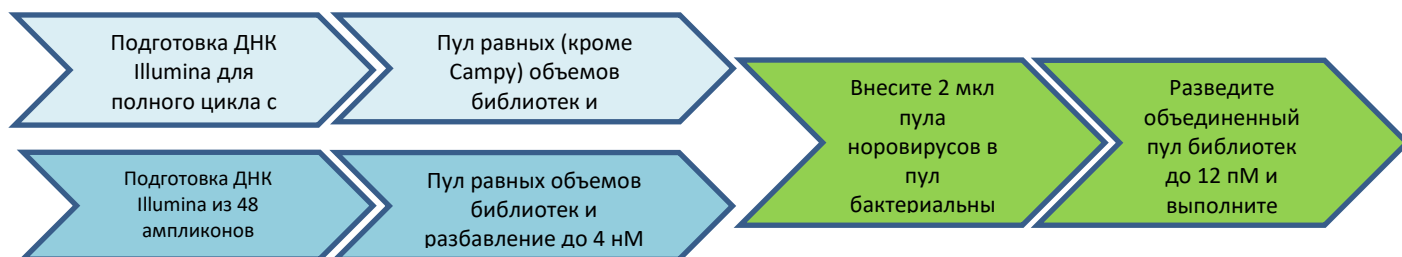
Таблица 9. Расчеты для разбавления пула норовируса до 4 нМ

4. Внесите 2 мкл ампликонного пула библиотек с объемом 4 нМ в пул бактериальных библиотек с объемом 4 нМ.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Внесение вирусного ампликона не оказывает существенного влияния на молярность пула бактериальных библиотек.

5. Приступайте к секвенированию на MiSeq, следуя инструкциям в PNL38.
  - 5.1. Для образцов норовируса перед ключами состояний необходимо добавить префикс "noro\_", чтобы легко отличить образцы норовируса от образцов PulseNet.
  - 5.2. При выборе индекса убедитесь, что все пары индексов (бактериальный и норовирусный) уникальны для данного цикла и не использовались в предыдущем цикле на этом приборе.

**Рабочий процесс для комбинированных прогонов секвенирования PulseNet/Norovirus**



**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 20 из 24

**Приложение PNL35-2. Объединение организмов PulseNet и ампликонов Cyclospora в одном цикле секвенирования**

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Нет необходимости снижать нагрузку на ДНК бактерий. Библиотеки ампликонов Cyclospora можно добавлять в прогоны секвенирования PulseNet, которые считаются "полными прогонами" для выбранного набора для секвенирования.

1. Выделите ДНК Cyclospora, подготовьте ампликоны (максимум 24 образца) и библиотеки ДНК для секвенирования, как описано в AMD.DR.C.001 State Cyclospora Outbreak Genotyping SOP.
2. Наберите равные объемы библиотек, измерьте концентрацию и распределение по размерам и разбавьте до 4 нМ. Следуйте расчетам в Таблице 10 для разбавления пула до 4 нМ.

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Расчеты автоматизированы в рабочей книге PNL35.W1.

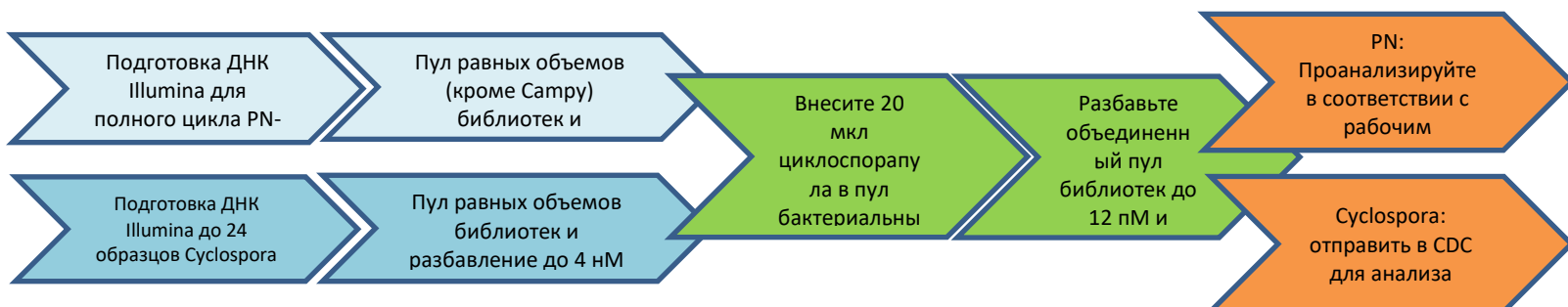
**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Распределение фрагментов пула по размерам обычно варьируется в пределах 300-350 п.н. Рекомендуется определять размер фрагмента для каждого прогона.

	Пример расчета	Уравнения
Концентрация пула (значение Qubit, нг/мкл):	6.72	
Молярность (нМ) = (концентрация/(660 г/моль x средний размер библиотеки в п.н.) x 10 <sup>6</sup> ):	25.45	=(Концентрация пула/(660*400))*10 <sup>6</sup>
Объем пула для разбавления (мкл) = (нМ)(x)=(4 нМ)(50 мкл):	7.86	=4*50/молярность
Объем RSB для разбавления (мкл) = 50 - объем пула:	42.14	=50 - Объем пула

Таблица 10. Расчеты для разбавления пула Cyclospora до 4 нМ

3. Внесите 20 мкл 4 нМ пула библиотек Cyclospora в 4 нМ пул бактериальных библиотек.
4. Приступайте к секвенированию на MiSeq, следуя инструкциям в PNL38.
  - 4.1. Для именования образцов Cyclospora на вкладке Library Prep рабочей книги следуйте стандартному формату, изложенному в SOP AMD.DR.C.001, шаг 4.9.1.
  - 4.2. При выборе индекса убедитесь, что все пары индексов (бактериальный и Cyclospora) уникальны для данного цикла и не использовались в предыдущем цикле на этом приборе.

**Рабочий процесс для комбинированных прогонов секвенирования PulseNet/Cyclospora**



### Приложение PNL35-3: Настройка шаблона импорта образцов NextSeq для создания листа образцов NextSeq

1. Убедитесь, что данные в столбцах **Sample ID\***, **Well Position\*** и **Project** (если применимо) правильно отформатированы на вкладке NextSeq\_Import\_Sample\_Template в PNL35.W1. Данные из вкладки Library Prep должны автоматически заполнить эти столбцы:
  - a. **Идентификатор образца\*** должен иметь следующий формат: *Sample1-LabID-sequencer ID-YYMMDD*
  - b. **Позиция лунки\*** должна содержать местоположение лунки индексного планшета (например, A-A01).
  - c. Данные о **проекте** берутся из столбца Project ID на вкладке Library Prep и являются необязательными. Если оставить этот столбец пустым, то по умолчанию в BaseSpace будет использоваться идентификатор проекта.
2. Сохраните эту вкладку (NextSeq\_Import\_Sample\_Template) как файл .csv для импорта в BaseSpace.
3. Войдите в BaseSpace и выберите "New Run" и "Run Planning" из выпадающего меню, как показано на рис. 2:

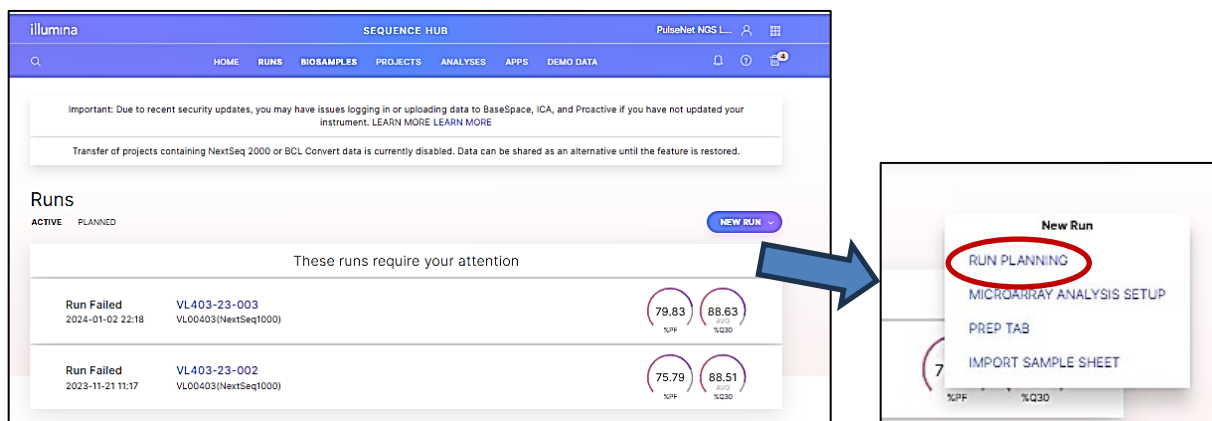


Рисунок 2: Выбор "Новый запуск"> "Планирование запуска" для импорта шаблона пробы.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 22 из 24

4. После ввода имени прогона, платформы прибора и местоположения вторичного анализа (локальное или BaseSpace), как показано на рис. 3, нажмите "Далее".

The screenshot shows the 'Create a Run' form with the following fields and values:

- Run Name\*:** VL403-24-005
- Run Description:** (empty text box)
- Instrument Platform\*:** NextSeq 1000/2000
- Secondary Analysis\* ?:**  BaseSpace Storage and compute iCredit charges may apply.  Local
- Library Tube ID:** (empty text box)

Рисунок 3: Назначение параметров прогона

5. Конфигурация (рис. 4):

- Настройте приложение для DRAGEN BCL Convert. **Убедитесь, что эта версия соответствует той, что установлена на вашем приборе.**
- Укажите используемый набор для подготовки библиотеки и набор адаптеров для индексов.  
**ПРИМЕЧАНИЕ: Не выбирайте отдельные наборы индексов (например, Illumina DNA-RNA UD Indexes Set A Tagmentation), поскольку в этой рабочей книге создается запись Well Position, которая включает идентификатор индексной пластины в Well Position (A-A01). Это обозначение совместимо с комбинированным набором адаптеров для индексов, указанным в BaseSpace как "Illumina (или IDT-ILMN) DNA-RNA Indexes Set A B C D Tagmentation only". Если вы выберете отдельные наборы индексов для набора индексных адаптеров (т.е. набор A), это изменит формат шаблона импорта образцов и выдаст ошибку, указывающую на недопустимое положение лунок.**
- После завершения нажмите "Далее".

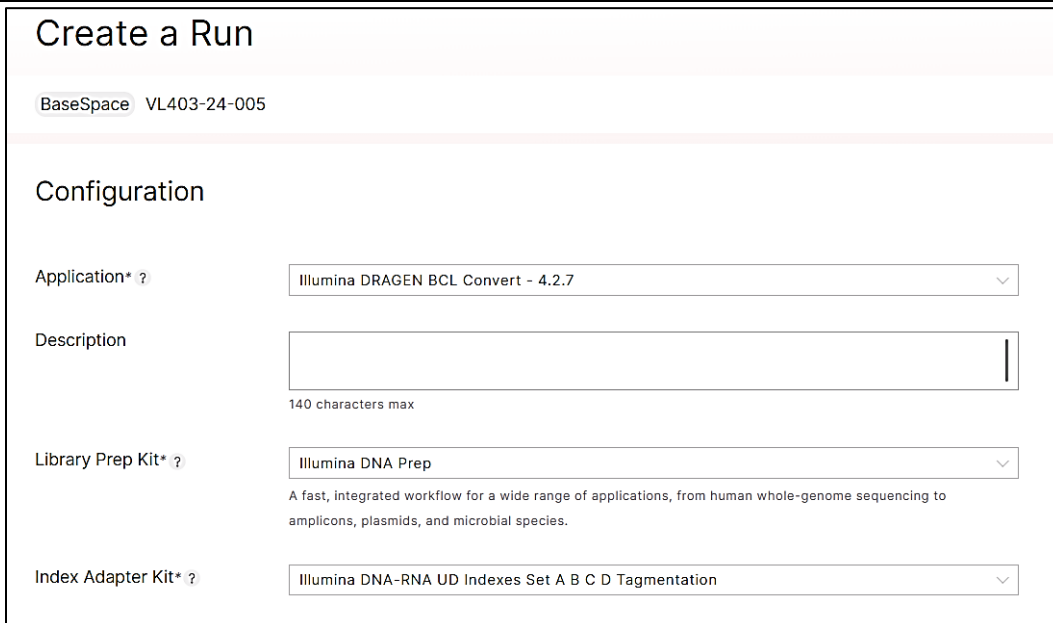
**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 23 из 24



**Create a Run**

BaseSpace VL403-24-005

**Configuration**

Application\* ?

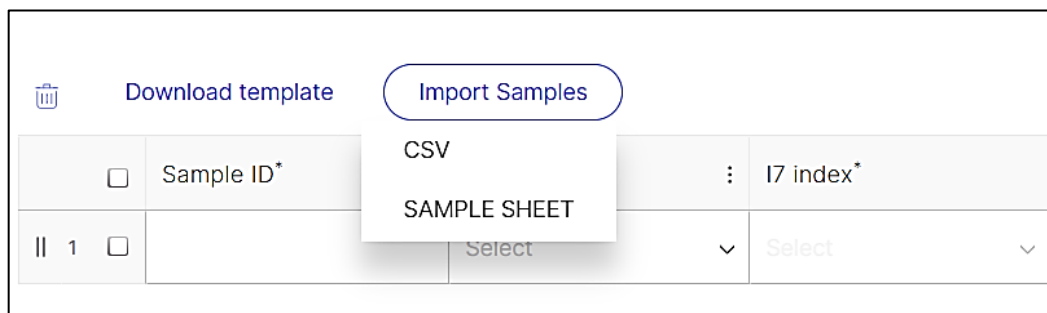
Description   
140 characters max

Library Prep Kit\* ?   
A fast, integrated workflow for a wide range of applications, from human whole-genome sequencing to amplicons, plasmids, and microbial species.

Index Adapter Kit\* ?

**Рисунок 4:** Конфигурация приложения для прогона и наборов

- Убедитесь, что информация для **индексных чтений, длины чтения и циклов переопределения** верна, и выберите **"Import Samples"** и **"CSV"** для импорта файла NextSeq\_Import\_Samples\_Template.csv, который был создан на вкладке NextSeq\_Import\_Samples\_Template в PNL35.W1 (рис. 5).



Download template **Import Samples**

Sample ID\* : I7 index\*

SAMPLE SHEET

Select Select

**Рисунок 5:** Импорт файла NextSeq\_Import\_Samples\_Template.csv

- Необходимые поля должны быть заполнены, как показано ниже на рис. 6.

Sample ID*	Well Position*	I7 index*	Index 1*	I5 index*	Index 2*	Project
2013L-5214	A-C01	UDP0003	CGTCTCATAT	UDP0003	TATAGTAGCT	
2013L-5351	A-E01	UDP0005	GACGAGATTA	UDP0005	ACATTATCCT	
2013L-5356	A-F06	UDP0046	AGATCCATTA	UDP0046	ATCTCTACCA	
2013L-5357	A-E07	UDP0053	GGAATTGTAA	UDP0053	AGCACATCCT	

**Рисунок 6:** Подтверждение импорта образцов/индексов

- В разделе **Analysis Setting** оставьте **AdapterRead1 и 2** и **BarcodeMismatchesIndex1 и 2** пустыми как настройки по умолчанию (рис. 7) и нажмите **"Next"**.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА ПОДГОТОВКИ БИБЛИОТЕКИ ДНК С ПОМОЩЬЮ НАБОРА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ДНК ILLUMINA®**

Док. № PNL35

Ver. No. 05

Дата вступления в силу:

Страница 24 из 24

Analysis Setting

AdapterRead1 ?

AdapterRead2 ?

BarcodeMismatchesIndex1 ?

BarcodeMismatchesIndex2 ?

Back

Рисунок 7: Настройки анализа

9. Просмотрите информацию о прогоне, созданную, как показано на рис. 8, и выберите **Save as Draft** или **Save as Planned**. Это приведет к созданию листа образцов в BaseSpace. Теперь вы можете войти в BaseSpace на приборе, выбрать сконфигурированный прогон и загрузить прибор для секвенирования.

Create a Run

Run Review

Run Name	test	Edit
Instrument Platform	NextSeq 1000/2000	
Read Lengths	Read 1	Index 1
	151	10
		Index 2
		10
		Read 2
		151
Secondary Analysis	BaseSpace	

Configuration: Illumina DRAGEN BCL Convert - 4.2.7 [Edit](#)

Library Prep Kit	Illumina DNA Prep
Index Adapter Kit	Illumina DNA-RNA UD Indexes Set A B C D Tagmentation
Override Cycles	Y151,I10,I10,Y151
Samples	66 samples

Рисунок 8: Просмотр информации о прогоне