1. **Мета:** Дана процедура описує стандартизований лабораторний протокол підготовки бібліотеки ДНК для кишкових бактеріальних організмів з використанням набору Illumina® DNA Prep для подальшого секвенування на платформі Illumina, що забезпечує міжлабораторне порівняння результатів секвенування та оптимізує виведення і якість даних секвенування.

2. **СФЕРА ЗАСТОСУВАННЯ:** Для використання лабораторіями, сертифікованими PulseNet WGS, при підготовці бібліотек з ДНК кишкових організмів з використанням набору Illumina® DNA Prep kit для секвенування на платформах Illumina для подання даних секвенування до мережі PulseNet. Лабораторії можуть змінювати цю процедуру за необхідності для використання в своїх лабораторіях після валідації згідно з настановами своєї лабораторії.
   ПРИМІТКА1: *Інструкції щодо поєднання ампліконів Norovirus і Cyclospora в одному циклі з організмами PulseNet наведені в додатках PNL35-1 і PNL35-2 відповідно.*
   ПРИМІТКА 2: *Дана СОП відрізняється від протоколу, наданого компанією Illumina, оскільки оригінальний протокол Illumina був оптимізований для секвенування 2 x 150 (300c). Протокол мережі PulseNet був оптимізований для секвенування 2 x 250 (500c). Якщо ваша лабораторія дотримується оригінальної СОП від компанії Illumina, робочі книги, що надаються разом з PulseNet SOP, не будуть генерувати точні розрахунки.*

3. **ВИЗНАЧЕННЯ:**
   3.1. **BaseSpace:** Хмарне обчислювальне середовище Illumina для аналізу, управління та зберігання даних секвенування наступного покоління, включаючи обмін даними.
   3.2. **BLT:** Bead-Linked Transposome - намистинна транспозома.
   3.3. **CD Index:** CD індекс.
   3.4. **CSV:** Значення, розділені комами (файл) або розділені комами (файл).
   3.5. **ДНК:** Дезоксирибонуклеїнова кислота.
   3.6. **dsDNA:** Дволанцюгова ДНК.
   3.7. **EPM:** Покращена суміш для ПЛР.
   3.8. **Fastq:** текстовий формат файлу для зберігання послідовності та відповідних оцінок якості.
   3.9. **GHS:** Гармонізована на глобальному рівні система.
   3.10. **HS:** Висока чутливість.
   3.11. **IPB:** очищувальні намистини Illumina.
   3.12. **LRM:** Локальний менеджер запуску.
   3.13. **Mb:** Мега база.
   3.14. **Нг:** Нанограм.
   3.15. **нМ:** Наномолярний.
   3.16. **ПЛР:** Полімеразна ланцюгова реакція.
   3.17. **ЛГЗ:** Лабораторія громадського здоров'я.
   3.18. **PN:** Мережа PulseNet.
   3.19. **ЗІЗ:** Засоби індивідуального захисту.
   3.20. **PulseNet Central:** Команда PulseNet в CDC, що складається з Групи реагування та управління спалахами PulseNet (PulseNet@cdc.gov) та Основної лабораторної діяльності WGS (PulseNetNGSlab@cdc.gov).
   3.21. **PulseNet/OutbreakNet SharePoint**: Закритий веб-додаток для спільної роботи, що використовується для спілкування між учасниками PulseNet.
   3.22. **КЯ:** Контроль якості.
   3.23. **RSB:** Буфер ресуспензії.
   3.24. **SDS:** Паспорт безпеки.
   3.25. **СОП:** Стандартна операційна процедура.
   3.26. **TB1:** Буфер тегування 1.

3.27. **TSB:** Буфер зупинки тегів.
3.28. **TWB:** Буфер промивання тегів.
3.29. **UD Index:** Унікальний подвійний індекс.
3.30. **ПГС:** Повногеномне секвенування.

4. ОБОВ'ЯЗКИ:

4.1. **Лабораторія громадського здоров'я PulseNet:**
- 4.1.1. Підготовка бібліотек ДНК і, за необхідності, проведення контролю якості для наступних ПГС.
- 4.1.2. Пересіювання всіх ізолятів, які не відповідають пороговим значенням якості.
- 4.1.3. Інформування PulseNet Central, за необхідності, про будь-які ускладнення з лабораторними протоколами або підозри на проблеми з реагентами.

4.2. **Команда PulseNet Central:**
- 4.2.1. Виконання додаткового аналізу якості послідовності, щоб забезпечити зворотній зв'язок і підтримку в усуненні недоліків для ЛГЗ, якщо це необхідно.
- 4.2.2. Повідомлення ЛГЗ, якщо якісь із поданих послідовностей не відповідають порогам якості.
- 4.2.3. За необхідності повідомляти ЛГЗ про будь-які підозри щодо проблем з реагентами.
- 4.2.4. Регулярна підтримка та перегляд СОП і їх публікація на SharePoint.

5. БЕЗПЕКА:

5.1. **Попередження з біобезпеки:** Цей документ описує поводження з ДНК та пов'язаними з нею продуктами і не описує найкращі практики поводження з біологічними інфекційними матеріалами.

5.2. **Попередження щодо хімічної безпеки:** Під час роботи з потенційно небезпечними хімічними речовинами вживайте належних заходів обережності та використовуйте відповідні засоби індивідуального захисту. Переконайтеся, що хімікати, використані контейнери та невикористаний вміст утилізуються відповідно до місцевих та державних стандартів безпеки. **Додаткову інформацію див. у відповідних паспортах безпеки.**

- 5.2.1. Illumina® Набір для підготовки ДНК:
  - 5.2.1.1. TSB: Категорія 1 GHS за пошкодження очей/подразнення і шкідливий для водних організмів.
  - 5.2.1.2. TB1: Категорія 4 за гострою токсичністю (пил/туман), категорія 2A за подразненням на очі та категорія 1B за репродуктивною токсичністю. Містить N, N=диметилформамід.
  - 5.2.1.3. EPM: Категорія 4 за гострою пероральною токсичністю та категорія 1 за токсичністю для окремих органів. Містить тетраметиламонію хлорид.
- 5.2.2. Етанол легкозаймистий (категорія горючості GHS 2).

6. РЕАКТИВИ:

6.1. Illumina® Набір для тегування DNA Prep (M) (будь-який з наведених нижче):
- 6.1.1. 96 зразків, з IPB, Illumina Cat# 20060059
- 6.1.2. 24 зразки, з IPB, Illumina Cat# 20060060

Компоненти набору:

- Намистини + буфери. Зберігати при температурі від 15 до 30°C. **ПРИМІТКА***: на зовнішній етикетці вказано зберігання при температурі 2-8°C, але на всіх флаконах з компонентами вказано зберігання при температурі від 15 до 30°C.*

  IPB **(зберігання у вертикальному положенні)**
  TSB
  TWB

- ПЛР + буфери. Зберігати при температурі від -25 до -15°C.
  RSB
  TB1
  EPM
- Намистини з маркуванням (M). Зберігати при температурі 2-8°C.
  BLT (зберігати вертикально)

6.2. Індекси: виберіть 6.2.1, 6.2.2 або 6.2.3.

ПРИМІТКА 1: *Необхідний(і) набір(и) індексів залежить від пропускної здатності лабораторії та бажаного рівня мультиплексування. Рекомендується не використовувати одну і ту ж пару індексів у двох послідовних циклах на одному приладі, щоб запобігти перенесенню результатів від циклу до циклу.*

ПРИМІТКА2: *Індекси CD та UD* ***не можна*** *змішувати в одному циклі.*

ПРИМІТКА 3: *IDT для індексів ДНК/РНК Illumina та індекси ДНК/РНК Illumina* ***не можна*** *змішувати в одному циклі.*

ПРИМІТКА4: *Індекси UD мають адаптери для 10 пар основ, тому кількість циклів зчитування індексів на приладі має бути встановлена на 10 (з 8 для індексів CD).*

6.2.1. Nextera ДНК-індекси для компакт-дисків. Зберігати при температурі від -25°C до -15°C.
96 Dual Index, формат пластини (96 зразків, Illumina Cat# 20018708)

6.2.2. IDT для індексів ДНК/РНК Illumina UD. Зберігати при температурі від -25°C до -15°C.
ПРИМІТКА: *Ці набори індексів будуть зняті з виробництва: останнє замовлення - 29 січня 2025 року або до вичерпання запасів.*

6.2.2.1. Набір A, Тагментація (96 індексів, 96 зразків, Illumina Cat# 20027213)
6.2.2.2. Набір B, Тагментація (96 індексів, 96 зразків, Illumina Cat# 20027214)
6.2.2.3. Набір C, Тагментація (96 індексів, 96 зразків, кат. № Illumina 20042666)
6.2.2.4. Набір D, Тагментація (96 індексів, 96 зразків, кат. № Illumina 20042667)

6.2.3. Індекси ДНК/РНК Illumina UD. Зберігати при температурі від -25°C до -15°C.
6.2.3.1. Набір A, Тагментація (96 індексів, 96 зразків, кат. № Illumina 20091654)
6.2.3.2. Набір B, Тагментація (96 індексів, 96 зразків, кат. № Illumina 20091656)
6.2.3.3. Набір C, Тагментація (96 індексів, 96 зразків, кат. № Illumina 20091658)
6.2.3.4. Набір D, Тагментація (96 індексів, 96 зразків, кат. № Illumina 20091660)

6.3. Етанол, молекулярний, 95-100% (Fisher Scientific Cat# BP2818-500 або еквівалент).

6.4. Етанол, лабораторний, 70% або еквівалент для дезінфекції (Fisher Scientific Cat# 04-355-305 або еквівалент).

6.5. Вода, молекулярна (Fisher Scientific Cat# BP24701 або еквівалент).

6.6. Invitrogen™ Qubit™ Набір для аналізу ДНК HS: оберіть 6.6.1. або 6.6.2.

6.6.1. Набір концентрованих реагентів (100 аналізів, Fisher Scientific Cat# Q32851 **або** 500 аналізів, Fisher Scientific Cat# Q32854) з наступними компонентами:
- Реагент dsDNA HS, компонент A (кімнатна температура, захищати від світла).
- Буфер dsDNA HS, компонент B (кімнатна температура).
- Стандартний dsDNA HS №1, компонент C (≤ 4°C).
- Стандартний dsDNA HS №2, компонент D (≤ 4°C).

6.6.2. 1x готовий до використання набір реагентів (100 аналізів, Fisher Cat# Q33230 **АБО** 500 аналізів Fisher Scientific Cat# Q33231) з наступними компонентами (2-8°C):
- Робочий розчин dsDNA HS, компонент A (кімнатна температура, захищати від світла)
- Стандартний dsDNA HS №1, компонент B (≤ 4°C)
- Стандартний dsDNA HS №2, компонент C (≤ 4°C)

7. ПОСТАЧАННЯ:

7.1. 96-лункові ПЛР-планшети, з бортиками, з твердим покриттям, низькопрофільні, тонкостінні

(BioRad Cat# HSP-9601 або еквівалент)

7.2. Планшети з глибокими лунками для зберігання "MIDI", 96 лунок (Fisher Scientific Cat# AB-0859 або еквівалент**) – додатково.**

7.3. Лід.

7.4. Мікроцентрифужні пробірки, 1,5 мл, стерильні (Fisher Scientific Cat# 05-408-129 або еквівалент).

7.5. Адгезивна пломба Microseal B (BioRad Cat# MSB-1001 або еквівалент).

7.6. Пломба з клейкої фольги Microseal F (BioRad Cat# MSF-1001 або еквівалент**) – додатково.**

7.7. Наконечники для піпеток, стерильні, фільтровані: об'ємом 20 мкл, 200 мкл та 1000 мкл (Rainin Cat# 30389225, 30389239 та 30389212 або еквівалент).

7.8. Qubit™ пробірки для аналізу (Fisher Scientific Cat# Q32856 або еквівалент (прозорі, тонкостінні пробірки для ПЛР об'ємом 0,5 мл)).

7.9. Ємності для розчину, стерильні (Fisher Scientific Cat# 13-681-504 або еквівалент).

8. ОБЛАДНАННЯ:

8.1. Відра/контейнери для льоду.

8.2. Invitrogen™ DynaMag™ -96 Магніт з бічною спідницею (Fisher Scientific Cat# 12-027 або еквівалент).

8.3. Мікроцентрифуга для швидкого обертання.

8.4. Мікропіпетки об'ємом від 1 мкл до 1000 мкл. Одноканальні та багатоканальні (об'ємом 20 мкл та 100 мкл).
ПРИМІТКА: *Пропонується два набори піпеток: один для роботи з попередньо ампліфікованим продуктом і реагентами, а інший - для роботи з ампліфікованим продуктом і реагентами після ПЛР.*

8.5. Мікропланшетна центрифуга.

8.6. Флуориметр Qubit™ 4.0 (старіші версії 2.0 або 3.0) або еквівалент для кількісного визначення dsDNA.

8.7. Термоциклери з кришкою з підігрівом, сумісні з 96-лунковими 0,2 мл ПЛР-планшетами

8.8. Вортекс.

9. ПРОЦЕДУРА: Контрольний список Illumina DNA Prep (PNL35.W3) можна використовувати під час підготовки бібліотеки в лабораторії для запису виконаних етапів. Цей контрольний список також дозволяє розрахувати об'єми майстер-міксів. Короткий посібник (PNL35.JA1) з описом методу підготовки бібліотеки також доступний в якості лабораторного довідника для процедури підготовки бібліотеки. Робочий зошит з підготовки ДНК (PNL35.W1) можна використовувати для планування циклів секвенування (на iSeq, MiniSeq, MiSeq або NextSeq), включаючи призначення індексів, а також роздрукувати і використовувати в лабораторії для запису партій реагентів та іншої інформації для конкретного циклу. Робочий зошит для відстеження індексів (PNL35.W4) можна використовувати для присвоєння індексів і для цілей інвентаризації.

ПРИМІТКА 1: *Єдиними безпечними точками зупинки в процедурі є етап ампліфікації (9.4.), етап очищення ампліфікованих бібліотек (9.5.) і етап розведення до 4 нМ (9.6.).*

ПРИМІТКА2: *Усі етапи багатоканального змішування в цьому протоколі можна замінити використанням шейкера для пластин (1600 об/хв протягом 1 хвилини) за бажанням.*

ПРИМІТКА 3: *Переконайтеся, що вортекс вимкнений після лізису клітин під час екстракції ДНК і на всіх етапах підготовки бібліотеки.*

ПРИМІТКА4: *Задокументовано і спостерігається, що на щільність кластерів може негативно впливати використання миючих засобів на основі амонію поблизу обладнання для секвенування, включаючи лабораторні столи та піпетки, що використовуються для підготовки бібліотеки.* ***Не використовуйте сполуки четвертинного амонію або серветки поблизу обладнання для секвенування або на ньому!***

9.1. (Необов'язково) Підготуйте вкладку "Library Prep" (Підготовка бібліотеки) робочого зошита Illumina DNA Prep.

ПРИМІТКА: ***Не*** *видаляйте рядки або стовпці в робочій книзі PNL35.W1! Це може порушити роботу багатьох формул і пошукових таблиць. Є багато рядків, доступних для зразків інформації; будь-які рядки, які не будуть використовуватися, можна приховати, використовуючи функцію "Сховати" в Excel. Робоча книга оформлена в наступній кольоровій гамі:*

- *Білі поля повинні бути заповнені*
- *Темно-сірі поля необов'язкові для заповнення*
- *Сині поля містять формули, які автоматично заповнюються, і їх не слід змінювати*
- *Жовті індексні поля вказують на те, що було вибрано дублікати індексів*
- *Червоні індексні лунки вказують на те, що CD-індекси були відібрані з індексами v2 та/або v3*

9.1.1. Введіть ідентифікатор циклу у форматі ідентифікатор лабораторії PulseNet - ідентифікатор приладу - дата початку циклу: labID-MXXXX-YYMMDD. (наприклад, CDC-M3235-240512).

9.1.2. Введіть дату підготовки бібліотеки, фахівця з підготовки бібліотеки, тип/хімію набору для секвенування зі спадного меню, дату секвенування та фахівця з секвенування.

9.1.3. Введіть ключі стану (ідентифікатор, введений у полі "Ключ" бази даних PulseNet).

ПРИМІТКА: Важливо! *Імена файлів Fastq будуть призначені на вкладці Sample Sheet відповідно до цього ключа стану та ідентифікатора циклу. Ці поля будуть об'єднані для створення унікального префікса для результуючих файлів fastq (наприклад, Sample1-CDC-M3235-240512).*

9.1.4. Внесіть оцінку розміру геному (на основі таблиці 1 нижче) для кожного організму в колонку E робочого зошита.

Організм	Розрахунковий розмір геному (Мб)	Мінімальне охоплення
***E. coli ma Shigella* spp.**	**5**	**40x**
***Salmonella* spp.**	**5**	**30x**
Vibrio cholerae	**4**	**40x**
***Vibrio* spp.**	**5**	**40x**
Listeria monocytogenes	**3**	**20x**
***Campylobacter* spp.**	**1.6**	**20x**
***Cronobacter* spp.**	**4.5**	**40x**
***Yersinia* spp.**	**5**	**40x**

Таблиця 1. Розрахунковий розмір геному (в Мб) за організмами.

9.1.5. Переконайтеся, що кількість ізолятів у циклі відповідає ємності приладу та набору реагентів, що використовуються. Рекомендоване навантаження ДНК для кожної з платформ секвенування Illumina та картриджів, валідованих для використання в PulseNet, наведено в таблиці 2 нижче. Окремі лабораторії, що мають досвід і стабільні концентрації бібліотек і розміри фрагментів, можуть перевищувати рекомендоване навантаження ДНК, досягаючи при цьому необхідних мінімальних рівнів покриття (Таблиця 1) для всіх ізолятів в циклі. Сума розмірів геномів (в Мб) для зразків у циклі буде відображена в робочому зошиті і дорівнюватиме оціненому навантаженню ДНК для циклу.

ПРИМІТКА 1: *Нижче рекомендоване навантаження ДНК для циклів, що містять E. coli, Shigella* spp.*, Vibrio* spp.*, Cronobacter* spp. *або Yersinia* spp. *пов'язано з тим, що ці організми вимагають більшого охоплення (40x) для подальшого аналізу, ніж інші організми (20x або*

30x). Тому для цих організмів необхідна більша кількість зчитувань послідовностей/даних, що генеруються в процесі секвенування, щоб задовольнити вимоги до охоплення.
ПРИМІТКА2: ***PulseNet ніколи і ні за яких обставин не приймає послідовності, згенеровані з параметрами циклічності нижче 300 циклів (2 x 150).***

Набір для секвенування (цикли)	Навантаження ДНК (Мб) працює без організмів 40x	Цикли навантаження ДНК (Мб), що містять організми 40x
MiSeq		
v2 300	**90**	**90**
v2 500	**100**	**100**
v3 600	**200**	**175**
Мікро (300)	**35**	**30**
Нано (500)	**13**	**13**
Нано (300)	**13**	**10**
MiniSeq		
Середній вихід	**60**	**60**
Висока продуктивність	**100**	**100**
iSeq		
iSeq v2	**35**	**25**

Таблиця 2. Розрахункова ємність ДНК (в Мб) для наборів реагентів Illumina.

9.1.6. Визначте, які індекси будуть використовуватися, і введіть позицію лунки індексного планшета (з індексного планшета). Лунку індексного планшета можна ввести вручну, вибрати зі спадного списку або скопіювати з робочого аркуша відстеження індексів.
ПРИМІТКА 1: *Рекомендується не використовувати однакові пари індексів у двох послідовних циклах на одному секвенсорі, щоб зменшити кількість переносів. Робочі аркуші відстеження індексів, PNL35.W4, можна використовувати для резервування/відстеження використаних і доступних індексів.*
ПРИМІТКА2*: Індекси CD і UD не можна комбінувати в одному циклі. Також не рекомендується поєднувати IDT для індексів Illumina ДНК/РНК UD з індексами Illumina ДНК/РНК UD.*
ПРИМІТКА 3: *наполегливо рекомендується використовувати індекси UD для цієї процедури; вони мають менше стрибків індексу в приладах, що використовують проточні кювети з патерном (NextSeq, MiniSeq, iSeq), і є збалансованими за кольором, оскільки всі індексні послідовності є унікальними.*

9.1.7. Введіть об'єм вхідної ДНК (рекомендовано 10 мкл), який потрібно додати в кожну лунку на початку процесу приготування бібліотеки.
ПРИМІТКА 1: *PulseNet стандартизував початковий об'єм ДНК до 10 мкл; однак рекомендована кількість вхідної ДНК для Illumina становить 100-500 нг. Окремі лабораторії можуть змінювати об'єми вхідної ДНК, щоб переконатися, що ДНК знаходиться в межах цього діапазону, за бажанням.*
ПРИМІТКА2: *Мінімальний об'єм вхідної ДНК становить 2 мкл. Якщо ДНК занадто концентрована, виконайте розведення, щоб об'єм вхідної ДНК перевищив 2 мкл, і продовжуйте.*

9.1.8. Вкладку "Підготовка ДНК" робочого зошита тепер можна роздрукувати для використання в лабораторії.

9.2. <u>Розведення та мічення вхідної ДНК</u>: ДНК фрагментують і мітять адаптерними послідовностями та зв'язують з BLT під час цих етапів. Важливо, щоб намистини були добре суспендовані на всіх етапах процедури.

ПРИМІТКА: *Переконайтеся, що ДНК, яка йде на підготовку бібліотеки, пройшла оцінку якості. Значення 260/280 має бути в межах від 1,75 до 2,05. Дивіться PNL33 для отримання додаткової інформації.*

9.2.1. Дозвольте BLT (з холодильника) і TB1 (з морозильної камери) дійти до кімнатної температури.

ПРИМІТКА: *Переконайтеся, що BLT ніколи не заморожується і завжди зберігається у вертикальному положенні, щоб намистини завжди залишалися зануреними в буфер.*

9.2.2. Позначте 96-лунковий ПЛР-планшет або його еквівалент ідентифікатором циклу (Run ID).

9.2.3. Додайте молекулярну воду в кожну лунку для зразка (загальний об'єм вхідних даних для аналізу становить 30 мкл; об'єм води становить 20 мкл, якщо буде додано 10 мкл ДНК; об'єм автоматично розраховується і відображається в робочому зошиті).

9.2.4. Додайте ДНК до молекулярної води (відповідно до об'єму, вказаного в робочому зошиті, зазвичай 10 мкл) і добре перемішайте, обережно виконуючи розкапування приблизно 5-10 разів.

9.2.5. Прокрутіть BLT протягом **щонайменше** 10 секунд і перевірте належну суспензію намистин; повторіть, якщо необхідно. Не центрифугувати.

9.2.6. Перемішайте на вортексі TB1 і виконайте швидке віджимання.

9.2.7. Підготуйте майстер-мікс для тагментації:

Реагент	Об'єм на зразок
TB1	10 мкл
BLT	10 мкл

Таблиця 3: Об'єми реагентів на зразок для майстер-суміші для тагментації

ПРИМІТКА: *Кількість зразків, що готуються, можна ввести в контрольний список Illumina DNA Prep, PNL35.W3 ("контрольний список"), і об'єми еталонної суміші будуть автоматично розраховані з урахуванням надлишку 2 зразків, вже включених в розрахунок.*

9.2.8. Добре перемішайте майстер-суміш для тагментації вортексом.

9.2.9. Додайте 20 мкл еталонної суміші для тагментації в кожну лунку зі зразками.

ПРИМІТКА: *Якщо одночасно готується багато зразків (тобто більше 8), може знадобитися повторне перемішування майстер-мікстури для мічення, щоб запобігти її осіданню під час цього етапу.*

9.2.10. Обережно перемішайте піпеткою, ресуспендуючи намистини (рекомендується використовувати багатоканальну піпетку для перемішування). Перед інкубацією огляньте лунки, щоб переконатися, що зразки та еталонна суміш однорідні. Додаткову інформацію див. на рисунку 1 нижче.

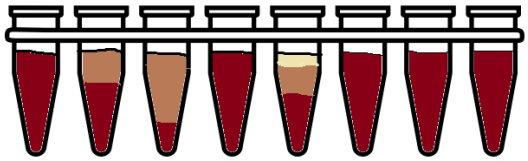


Рисунок 1. Приклад однорідного та неоднорідного зразків. Лунки 1, 4, 6, 7 і 8 добре перемішані. Не повинно бути кольорових смуг ("заходів сонця") від низу до верху лунок. У лунках 2, 3 і 5 спостерігається осадження, і їх слід повторно перемішати перед інкубацією.

9.2.11. Закрийте планшет мікрогерметиком B (або еквівалентним) та інкубуйте планшет при 55°C протягом 15 хвилин, після чого витримайте 10°C на термостаті з кришкою, нагрітою до 100°C (об'єм 50 мкл).
ПРИМІТКА: *Рекомендується попередньо запрограмувати термоцикл для цієї мети.*

9.3. <u>Очищення тагментованої ДНК</u>: ДНК (тепер помічена адаптерами і зв'язана з BLT) буде відмита перед ампліфікацією.
ПРИМІТКА: *За бажанням, для наведених нижче етапів промивання можна використовувати планшет з глибокими лунками MIDI. Це може покращити формування пелетів і зменшити ризик перехресної контамінації. Зразки потрібно буде перенести на 96-лунковий ПЛР-планшет з бортиком для етапів термоциклювання.*

9.3.1. Переконайтеся, що TSB має кімнатну температуру, і переконайтеся у відсутності осаду (якщо осад випав, прогрійте при 37°C до 10 хвилин або до розчинення і змішування на вортексі).
9.3.2. Додайте 10 мкл TSB до кожного зразка.
9.3.3. Обережно додавайте дозатором для перемішування. Перед інкубацією огляньте лунки, або переконатися, що зразки та еталонна суміш однорідні. Див. Рисунок 1.
9.3.4. Запечатайте планшет мікропломбою B або еквівалентним матеріалом.
9.3.5. Інкубуйте при 37°C протягом 15 хвилин і витримуйте при 10°C на термостаті з кришкою, попередньо нагрітою до 100°C.
ПРИМІТКА: *Рекомендується попередньо запрограмувати термоцикл для цієї мети.*
9.3.7. Після того, як зразки досягнуть 10ºC, вийміть пластину з термоциклера і виконайте швидке обертання.
9.3.8. Помістіть на магніт на 3 хвилини (або поки намистина не сформує щільну гранулу).
ПРИМІТКА: *Якщо через 3 хвилини щільна гранула не утворилася, обережно піпетуйте зразки, які не утворили гранулу, і залиште їх на магніті на 3 хвилини.*
9.3.9. Видаліть та викиніть надосадову рідину.
9.3.10. Зніміть пластину з магніту і додайте 100 мкл TWB безпосередньо до гранули.
ПРИМІТКА*: За бажанням, для промивання TWB можна використовувати ємність для розчину та багатоканальну піпетку.*
9.3.11. Обережно (щоб уникнути піноутворення) перемішати піпеткою до повного ресуспендування намистини.
ПРИМІТКА: *Піпетуйте з обережністю. Може виникнути деяке піноутворення, але слід уникати надмірного піноутворення TWB, оскільки піноутворення може призвести до втрати зразка.*
9.3.12. Знову помістіть на магніт на 3 хвилини (або поки намистина не сформує щільну гранулу).
9.3.13. Зніміть і викиньте надосадову рідину.
9.3.14. Зніміть з магніту і обережно додайте 100 мкл TWB безпосередньо до гранули.
9.3.15. Обережно перемішати піпеткою (уникаючи піноутворення) до повного ресуспендування бісеру.
9.3.16. Знову покладіть на магніт на 3 хвилини (або поки намистина не сформує щільну гранулу).

9.3.17. Видалити та викинути надосадову рідину.

9.3.18. Зніміть з магніту, додайте 100 мкл TWB безпосередньо до намистини і обережно піпетуйте, щоб ресуспендувати.

9.3.19. Знову помістіть на магніт на 3 хвилини, залишаючи TWB у лунках (щоб запобігти висиханню намистини), а потім переходьте до етапу ампліфікації.

9.4. <u>Ампліфікація тагментованої ДНК:</u> Індекси додаються до тагментованої ДНК, і відбувається ампліфікація. Під час ПЛР ДНК буде вивільнятися з намистин BLT.

9.4.1. Відтаювання EPM на льоду та індекси відтавання при кімнатній температурі.

9.4.2. Перед використанням розморожений EPM короткочасно прокрутити на вортексі та швидко віджати.

9.4.3. Приготуйте майстер-мікс для ПЛР:

Реагент	Об'єм на зразок
EPM	20 мкл
Молекулярна вода	20 мкл

Таблиця 4: Об'єми реагентів на зразок для майстер-міксу ПЛР.

ПРИМІТКА: *Кількість зразків, що готуються, можна ввести в контрольний список Illumina DNA Prep, і об'єми еталонної суміші будуть автоматично розраховані з урахуванням надлишку 2 зразків, які вже включені в розрахунок.*

9.4.4. Використання вортексу і швидкого обертання майстер-суміші для ПЛР.

9.4.5. Видалити TWB з лунок.

ПРИМІТКА: *Видалення TWB є дуже важливим, оскільки воно може перешкоджати проведенню ПЛР. Рекомендується використовувати піпетку невеликого об'єму для видалення всіх залишків ДНК. Будь-яка піна, що залишилася на лунках, не матиме негативного впливу на бібліотеку.*

9.4.6. Зніміть з магніту і негайно додайте 40 мкл майстер-суміші для ПЛР до кожного зразка.

ПРИМІТКА: *Рекомендується переконатися, що кожна гранула занурена або змочена майстер-міксом, перш ніж переходити до наступної лунки, а також додавати майстер-мікс в усі лунки перед змішуванням, щоб уникнути висихання намистин.*

9.4.7. Акуратно перемішайте піпеткою, щоб забезпечити ресуспензію гранул.

9.4.8. Додайте індекси до зразків:

9.4.8.1. Кожна лунка індексного планшета містить унікальну пару індексів в об'ємі одноразового використання. Додайте 10 мкл відповідної пари індексів з лунки індексного планшета в кожну лунку зразка, як зазначено в робочому зошиті (PNL35.W1).

9.4.8.2. Після використання/проколювання лунок вони **повинні бути запечатані** за допомогою лабораторної стрічки або Microseal F або еквівалентного матеріалу, щоб запобігти перехресній контамінації індексу.

ПРИМІТКА: *Рекомендується проколоти фольгу потрібної лунки на індексному планшеті новим наконечником піпетки, а потім використовувати свіжий наконечник піпетки для видалення індексів з лунок.*

9.4.9. Перемішати піпеткою мінімум 10 разів, щоб змішати.

9.4.10. Огляньте лунки, щоб переконатися, що всі зразки однорідні. Цей крок має вирішальне значення для ефективного індексування та подальшого відновлення продукту. Див. Рис 1.

9.4.11. Запечатуйте планшет мікрогерметиком B або еквівалентним матеріалом, помістіть його в термоцикл і виконайте наступні попередньо запрограмовані налаштування з нагрітою кришкою (100°C):

Крок 1: 68°C протягом 3 хвилин
Крок 2: 98°C протягом 3 хвилин
Крок 3: 5 циклів
98°C протягом 45 секунд,
62°C протягом 30 секунд,
68°C протягом 2 хвилин
Крок 4: 68°C протягом 1 хвилини
Крок 5: Витримати при 10°C
Загальний об'єм: 50 мкл

9.4.12. Центрифугуйте планшет при 280 x g протягом 1 хвилини.
ПРИМІТКА: *Це безпечна точка зупинки. Планшет можна запечатати Microseal B або еквівалентним матеріалом і зберігати при температурі 2-8°C або залишити в термостаті при 10° C на термін до 3 днів.*

9.5. Очищення та вибір розміру ампліфікованих бібліотек: Ця процедура подвійного очищення призначена для очищення та вибору розміру бібліотек. Цільові розміри фрагментів складають 800-1000 п.н.

ПРИМІТКА 1: *Наведені нижче кроки є критично важливими для ефективного вибору розміру, відновлення продукту, а отже, генерації кластерів і секвенування. Завжди перевіряйте правильність об'єму наконечників піпеток і переконайтеся, що на етапах видалення надосадової рідини не було випадково аспіровано жодної гранули. Якщо намистина була випадково аспірована або гранула намистини була порушена, дайте гранулі знову сформуватися і повторіть крок. Важливо також переконатися, що гранули добре успендовані на всіх етапах перемішування, як описано нижче.*

ПРИМІТКА2: *Розмір цільового фрагмента 800-1000 п.н. було оптимізовано для протоколу PulseNet (замість розміру фрагмента 500 п.н., який використовувався в оригінальній процедурі Illumina DNA Prep), щоб полегшити використання хімічних реагентів для секвенування 500 циклів.*

9.5.1. Доведіть RSB до кімнатної температури (із замороженого) і перемішайте вортексом.
ПРИМІТКА: *RSB знаходиться в конічному контейнері об'ємом 50 мл. Для швидшого розморожування рекомендується відбирати та заморожувати менші об'єми після першого відкриття.*

9.5.2. Якщо планшет дістали з холодильника, центрифугуйте його при 280 x g протягом 1 хв.

9.5.3. Помістіть тарілку на магніт на 5 хвилин (або поки намистина не сформує щільну гранулу).
ПРИМІТКА: *Якщо через 5 хвилин у лунках не утворилися щільні гранули, обережно ресуспендуйте їх і дайте час для формування щільної гранули.*

9.5.4. Перенесіть 45 мкл надосадової рідини (яка тепер містить ДНК) у нові лунки.
ПРИМІТКА 1: *За бажанням, для кроків 9.5.5-9.5.26 можна використовувати MIDI-планшет. Це може покращити гранулювання намистин і зменшити тенденцію до відриву намистин від магніту під час видалення кінцевого продукту на останньому етапі елюювання*.

ПРИМІТКА2: *Якщо під час тагментації та ПЛР сталася втрата зразка, важливо підтримувати відповідне співвідношення майстер-міксу IPB до ДНК (1,88x) для відновлення відповідної довжини бібліотеки. Відміряйте і перенесіть якомога більше*

отриманого супернатанту і додайте відповідний об'єм майстер-міксу IPB з таблиці 5 нижче. ***Не коригуйте подальший об'єм вихідного IPB пізніше в протоколі, оскільки це негативно вплине на вихід продукту.*** *Якщо для перенесення доступно менше 30 мкл зразка, не продовжуйте підбір розміру, а повторіть підготовку бібліотеки.*

Об'єм ДНК, відновленої після тагментації (мкл)	Об'єм суміші IPB Master, що додається (мкл)
40	75.2
35	65.8
30	56.4

Таблиця 5. Скориговані об'єми майстер-міксу IPB у випадку втрати зразків.

9.5.5. Кілька разів перемішайте і переверніть масу IPB, щоб повністю ресуспендувати намистини.
9.5.6. Підготуйте **майстер-мікс IPB**:

Реагент	Об'єм на зразок
IPB	40,8 мкл
Молекулярна вода	44,2 мкл

Таблиця 6: Об'єми реагентів на зразок для майстер-міксу IPB

ПРИМІТКА: *Кількість зразків, що готуються, можна ввести в контрольний список DNA Prep, і об'єми еталонної суміші будуть автоматично розраховані з урахуванням надлишку 2 зразків, що вже враховані в розрахунку.*

9.5.7. Зніміть пластину зі зразком з магніту.
9.5.8. Ретельно перемішайте майстер-мікс IPB і додайте по 85 мкл до кожного зразка (або відповідний об'єм з таблиці 5 вище, якщо це можливо).
9.5.9. Піпеткою перемішати мінімум 10 разів; рекомендується використовувати багатоканальну піпетку.
ПРИМІТКА*: Будьте обережні при змішуванні, оскільки об'єм буде > 100 мкл.*
9.5.10. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 5 хвилин.
9.5.11. Помістіть на магніт на 3 хвилини (або поки намистини не сформують щільну гранулу).
9.5.12. Під час інкубації перемішуйте масу IPB.
9.5.13. Після інкубації, не виймаючи планшет з магніту, перенесіть 125 мкл надосадової рідини (що містить ДНК) у нові лунки (найдовші фрагменти ДНК залишаються позаду).
ПРИМІТКА: *Якщо об'єми IPB були змінені через втрату продукту, об'єм надосадової рідини, що переноситься в нові лунки, буде меншим. Перенесіть якомога більше надосадової рідини.*
9.5.14. Зніміть планшет з магніту і додайте 15 мкл добре суспендованого **IPB** до надосадової **рідини** (співвідношення нерозведених немастини до ДНК 0,12).
ПРИМІТКА: *Переконайтеся, що ви додаєте з пробірки нерозведений IPB, а не попередньо приготовану майстер-суміш IPB. Випадкове використання майстер-суміші IPB різко знизить вихід продукту.*
9.5.15. Обережно проведіть піпетування щонайменше 10 разів, щоб перемішати.
9.5.16. Інкубуйте при кімнатній температурі протягом 5 хвилин.
9.5.17. Розведіть достатньо свіжого 80% етанолу для всіх зразків:

Реагент	Об'єм на зразок	Приклад: 20 зразків
100% етанол	0,4 мл	8 мл
Молекулярна вода	0,1 мл	2 мл

Таблиця 7: Об'єми реагентів на зразок для 80% етанолу.

9.5.18. Помістіть планшет зі зразком на магніт на 3 хвилини (або поки намистини не утворить щільну гранулу, а надосадова рідина не стане прозорою).

9.5.19. Видаліть і відкиньте надосадову рідину (потрібні бібліотеки прив'язані до намистин; найкоротші бібліотеки в надосадової рідині відкидаються).

9.5.20. Виконайте наведені нижче дії (9.5.20.1. - 9.5.20.3.) двічі, загалом для двох промивань:

9.5.20.1. Поки планшет знаходиться на магніті, додайте 170 мкл свіжого 80% етанолу.
ПРИМІТКА1*: Не додавайте безпосередньо до гранул намистини, не змішуйте і не виймайте з магніту під час етапів промивання.*
ПРИМІТКА 2: *За бажанням, для етанолу можна використовувати посудину для розчину.*

9.5.20.2. Інкубуйте 30 секунд.

9.5.20.3. Відфільтрувати і викинути надосадову рідину.

9.5.21. Після другого промивання за допомогою піпетки невеликого об'єму видаліть надлишок етанолу, якщо це необхідно.

9.5.22. Дайте намистинам висохнути на повітрі 3-5 хвилин.
ПРИМІТКА: *Не допускайте пересушування або розтріскування намистин. Бажано, щоб час сушіння був меншим. Якщо спостерігається розтріскування, негайно знову суспендуйте намистини, як описано нижче, незалежно від часу осушування.*

9.5.23. Зніміть з магніту і додайте 32 мкл RSB. Рекомендується швидко додати RSB до кожної гранули зразка, потім повернутися і перемішати багатоканальною піпеткою після того, як всі гранули будуть змочені.

9.5.24. Акуратно і ретельно перемішати піпеткою.

9.5.25. Інкубуйте при кімнатній температурі 2-5 хвилин.
ПРИМІТКА: *Довша інкубація (5-10 хвилин) є кращою для оптимального виходу та відновлення довших бібліотек. Якщо вихід низький (менше 10 нг/мкл), час інкубації RSB можна збільшити до 8 хвилин.*

9.5.26. Помістіть на магніт на 3 хвилини (або поки надосадова рідина не стане прозорою).

9.5.27. Перенесіть 30 мкл надосадової рідини в нові лунки (або в лунки на новому планшеті) - це кінцевий продукт.
ПРИМІТКА 1: *Якщо для цього кроку використовується ПЛР-планшет з бортиком, гранула може зісковзнути з магніту. Щоб запобігти аспірації гранул, можна зменшити об'єм відновлення до 25 мкл.*
ПРИМІТКА 2: *На цьому етапі для окремих бібліотек можна виконати кількісне визначення (за допомогою набору Qubit dsHS або еквівалентного набору) і за бажанням записати результати в робочу книгу. Дивіться PNL33 для отримання детальних інструкцій щодо роботи з Qubit. Перевірка концентрації бібліотеки після очищення рекомендується новим користувачам набору Illumina DNA Prep та з метою пошуку і усунення несправностей. Ідеальний вихід бібліотеки становить 10-20 нг/мкл. Успішне секвенування бібліотек з виходом нижче 10 нг/мл можливе, але вказує на неефективну підготовку бібліотеки. Концентрація бібліотеки, що значно перевищує 20 нг/мл, також вказує на ймовірну помилку в процесі підготовки бібліотеки, і його слід повторити.*
ПРИМІТКА3*: На цьому етапі якість окремих бібліотек також можна перевірити за*

допомогою фрагментного аналізу, особливо для нових користувачів набору Illumina DNA Prep, з метою пошуку та усунення несправностей або при мультиплексуванні бібліотек з декількох партій підготовки для високопродуктивного приладу секвенування. Середній розмір фрагмента повинен становити 800-1000 п.н., а графік розподілу фрагментів повинен мати щільний добре сформований пік. Бібліотеки з дуже малими або великими середніми розмірами фрагментів, дуже широкими піками або подвійними піками слід підготувати повторно.

ПРИМІТКА 4: *Це безпечна точка зупинки. Планшет можна запечатати за допомогою Microseal B або еквівалентного матеріалу і зберігати при -20°C до 30 днів відповідно до рекомендацій Illumina. Більш тривале зберігання можливе, але повторні цикли заморожування-розморожування бібліотек призведуть до втрати виходу.*

9.6. Бібліотеки пулів

9.6.1. Внесіть по 5 мкл кожної бібліотеки в нову лунку, за винятками, зазначеними нижче в Таблиці 8, і перемішайте піпеткою.

Організм	Інструмент	Об'єм об'єднання (мкл)
Campylobacter	MiSeq, MiniSeq	2.5
Campylobacter	iSeq	2.0
Listeria	iSeq	2.0

Таблиця 8. Винятки щодо об'єму об'єднання 5 мкл для бібліотек Illumina DNA Prep

ПРИМІТКА: *Для досягнення більш збалансованої роботи потрібно використовувати менші обсяги пулів. Це допоможе запобігти надмірному покриттю через малий розмір геному та менші вимоги до охоплення.*

9.6.2. Проведіть кількісну оцінку пулу за допомогою набору Qubit dsHS або еквівалентного набору. Інструкції з експлуатації Qubit див. у SOP PNL33.

9.6.3. Додатково: виконати аналіз фрагментів, щоб визначити середній розмір фрагмента в пулі.

9.6.4. Введіть концентрацію (нг/мкл) для пулу у відповідну комірку робочого зошита.

9.6.5. Розрахуйте молярність (нМ) пулу:
(Показник Qubit нг/мкл/ (660 г/моль x 1000 п.н.)) x 10^6

ПРИМІТКА 1: *Книга автоматично обчислить і відобразить це значення.*

ПРИМІТКА2: *Формула в робочій книзі базується на припущенні, що середній розмір фрагмента становить 1000 базових пар (виділено синім кольором вище), що є оптимальним для секвенування 500 циклів (і відрізняється від оригінальної СОП Illumina). Якщо після підготовки бібліотеки лабораторії отримують фрагменти, розмір яких значно відрізняється від 1000 б.п., вони можуть відповідно скоригувати цю формулу, оскільки це зробить визначення концентрації бібліотеки і розведення до концентрації завантаження більш точним.*

*Наприклад, якщо аналіз фрагментів виявив середню довжину бібліотеки близько 800 б.п., формула буде наступною: (значення Qubit ng/µl/ (660 г/моль x 800 $п^{н.}$)) x 10^6і, відповідно, комірку для розрахунку молярності потрібно змінити на "=(PoolConcentration/(660*800))*10^6". За необхідності зверніться за допомогою до PulseNetNGSLab@cdc.gov.*

9.6.6. Розрахуйте об'єм (мкл) пулу, необхідний для отримання 50 мкл 4 нМ пулу:
(200/Молярність пулу) = об'єм пулу для розведення

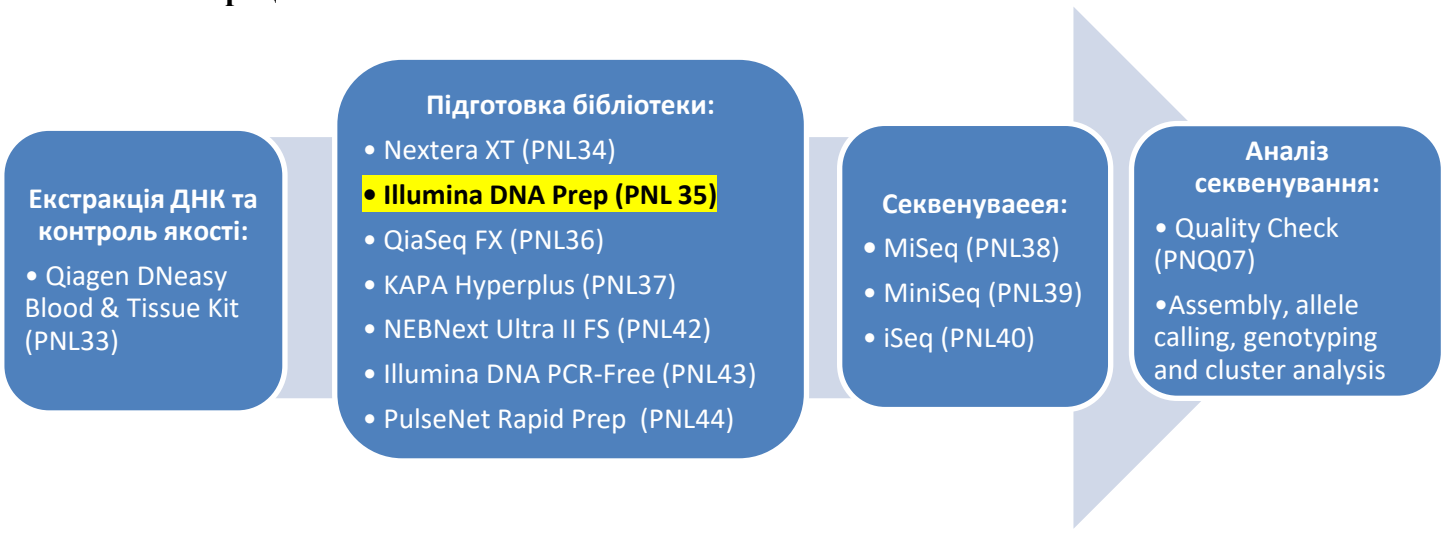
ПРИМІТКА: *Книга автоматично обчислить і відобразить це значення.*

9.6.7. Розрахуйте необхідний об'єм (мкл) розріджувача RSB:
50 - об'єм пулу = необхідний об'єм RSB
ПРИМІТКА: *Книга автоматично обчислить і відобразить це значення.*

9.6.8. У новій лунці розведіть пул до 4 нМ, додавши розрахований об'єм бібліотечного пулу до розрахованого об'єму RSB.
ПРИМІТКА 1*: Об'єднані бібліотеки тепер готові до секвенування, або планшет можна запечатати Microseal B або еквівалентним матеріалом і зберігати при -20°C не більше 48 год. Якщо ви продовжуєте секвенування, перейдіть до відповідної СОП секвенування приладу для отримання інструкцій (PNL38, PNL39, PNL40) для денатурації та/або розведення пулу до належної концентрації завантаження. СОП для секвенування NextSeq все ще розробляється, але в додатку PNL35-3 описані кроки, необхідні для використання вкладки шаблону імпорту зразка в PNL35.W1 для створення переліку зразків для NextSeq.*
ПРИМІТКА2: *Щоб включити Norovirus або Cyclospora в цикл секвенування PulseNet, зверніться до Додатків PNL35-1 і PNL35-2, відповідно, для отримання інструкцій про те, як додати бібліотеки Norovirus і Cyclospora до пулу бактеріальних бібліотек розміром 4 нМ.*

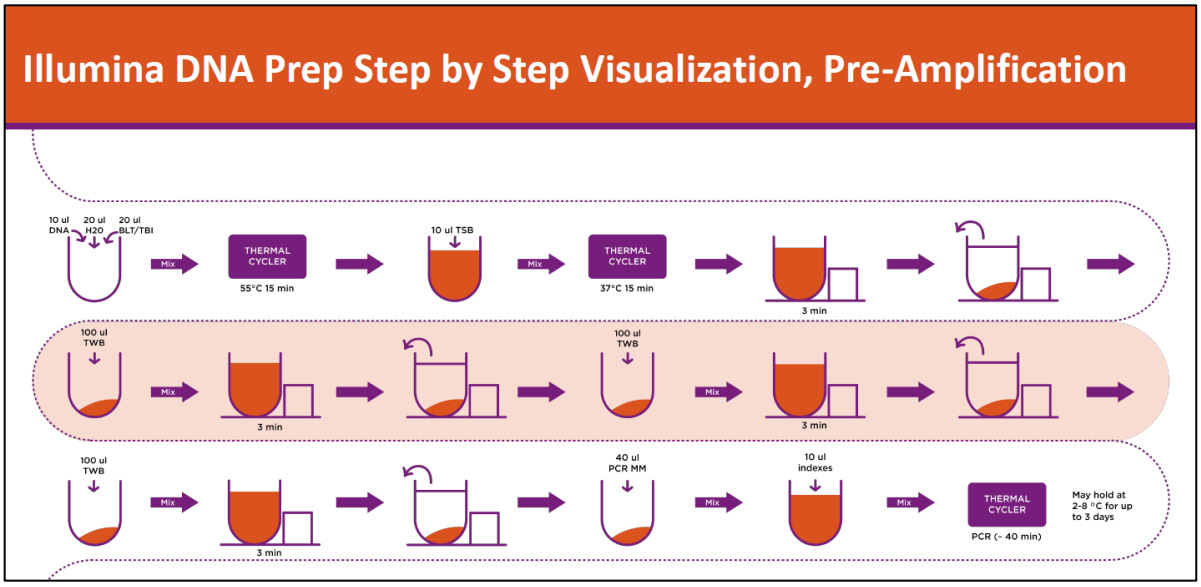
10. БЛОК СХЕМИ:

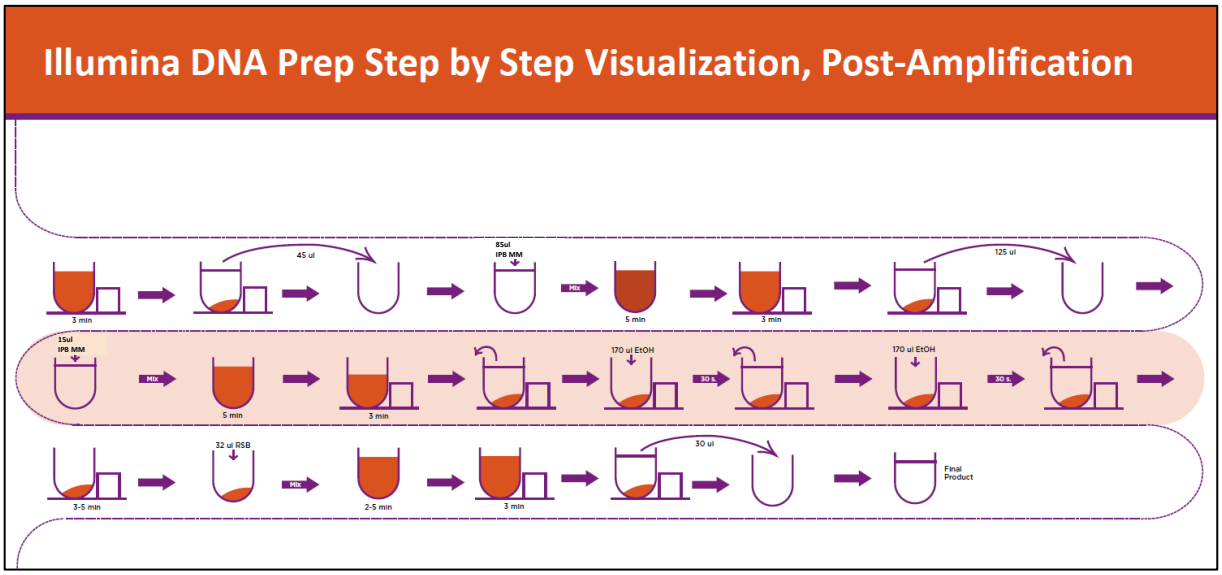
10.1. Робочі процеси PulseNet WGS:



10.2. Робочий процес підготовки бібліотеки Illumina DNA Prep:

10.3. Детальна візуалізація робочого процесу підготовки бібліотеки Illumina DNA Prep





11. ПОВ'ЯЗАНІ ДОКУМЕНТИ:

Номер документа	Назва
PNL33	СОП щодо екстракції ДНК та контролю якості
PNL38	Секвенування на MiSeq SOP
PNL39	Секвенування на MiniSeq SOP
PNL40	Секвенування на iSeq SOP
PNQ07	Illumina Sequence Data QC SOP
PNL35.W1	Робоча книга Illumina для підготовки ДНК, 96 індексів CD/UD, окремі аркуші зразків для MiSeq LRM, MiniSeq LRM та iSeq LRM, а також шаблон імпорту зразків для NextSeq LRM.
PNL35.W3	Робочий зошит контрольного списку Illumina DNA Prep
PNL35.W4	Робочий аркуш шаблону відстеження індексу ДНК-препарату Illumina
PNL35.JA1	Короткий посібник Illumina DNA Prep Посібник з експлуатації
VGB.NV.METHOD.002	Протокол RT-PCR для ампліфікації повногеномних геномів GII норовірусів
AMD.DR.C.001	Державний СОП генотипування спалаху циклоспори

12. ВИКОРИСТАНА ЛІТЕРАТУРА:

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

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-1000000025416-09.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. КОНТАКТИ:

13.1. Обліковий запис PulseNet NGS Lab для усунення несправностей: PulseNetNGSLab@cdc.gov

14. ПОПРАВКИ:

14.1. **28.01.19:** Новий документ

14.2. **04/09/20:** Додано примітки на основі відгуків та досвіду ЛГЗ, додано Таблицю 7, додано робочі процеси та інформацію про iSeq/MiniSeq. Зробили кілька додатків окремими робочими книгами та додали короткий посібник.

14.3. **03/30/2021:** Оновлено СОП з урахуванням нової назви набору Nextera DNA Flex: Illumina® DNA Prep. Оновлено каталожні номери та додано IDT для індексів Illumina UD. Оновлений розділ посилань. Додано додаток PNL35-1 з інструкціями щодо виконання комбінованих циклів з організмами PulseNet і вірусними ампліконами, а також додано схему робочого процесу для цієї процедури.

14.4. **02/01/2023:** Оновлені каталожні номери та додані примітки для наборів для підготовки та індексації бібліотек, які будуть застарілими для Illumina. Додано мову, що пояснює всі суттєві відхилення від СОП Illumina, а також мову, що полегшує роботу з відхиленнями від цієї СОП, наприклад, використання більшої ємності для завантаження ДНК, ніж мінімальна, рекомендована PulseNet. Додано інструкції з об'єднання бібліотек для iSeq. Додано PNL35-2 з інструкціями для виконання комбінованих циклів з організмами PulseNet та ампліконами Cyclospora, а також додано схему робочого процесу для цієї процедури. Оновлені робочі книги для відображення змін в індексних наборах (PNL35.W1, PNL35.W4), доданий лист зразків MiniSeq LRM до PNL35.W1, доданий контрольний список MiniSeq до PNL35-W3 і доданий лист зразків LRM3 до PNL35.W2. Оновлено PNL35.JA1, щоб включити використання IPB.

14.5. **06/27/2024:** Оновлено каталожні номери та додано примітки для індексних наборів, які будуть зняті з виробництва. Вилучено мікропробірку A з процедури, оскільки мікропробірка B краще запобігає втраті зразка через випаровування під час етапів термоциклювання. До таблиці 1 додано *Cronobacter* та *Yersinia* з їх мінімальними вимогами до охоплення. Видалили всі посилання на SPB. Додана наполеглива рекомендація використовувати UD-індекси замість CD-індексів у цій процедурі. Відкориговано таблицю 5 (компенсація за втрату зразка під час вибору розміру) таким чином, щоб втрата зразка була прийнятною лише до 20 мкл. Якщо було втрачено більше зразка, то бібліотеку потрібно перезаповнити. Додано аналіз фрагментів як додатковий крок контролю якості. Робочі книги PNL35.W1 і PNL35.W4 оновлені новими індексами Illumina DNA-RNA UD v3 і поточною версією програми Generate FASTQ Modules. З PNL35.W1 видалено таблиці зразків для IEM і LRM версій раніше 3, а шаблон імпорту зразків NextSeq додано у вигляді вкладки разом з інструкціями по його використанню в додатку PNL35-3. Вкладку Метрики в PNL35.W1 було оновлено, щоб видалити розрахунок покриття з використанням версій LRM2 або більш ранніх. Також додано підсвічування зразків з невдалим покриттям на вкладці Метрики. Робочу книгу PNL35.W2 вилучено. Видалено всі посилання на BioNumerics.

15. ПІДПИСИ:

Затверджено _____ Дата: _____
Персонал ЗЯ/КЯ

Затверджено _____ N/A_____ Дата: _____Відсутні_____
Керівник групи реагування та управління спалахами PulseNet

Затверджено _____ Дата: _____
Технічний керівник PulseNet WGS

Затверджено _____ Дата: _____
Керівник групи епіднагляду за спалахами PulseNet

16. ДОДАТКИ:

Додаток PNL35-1. Поєднання організмів PulseNet та ампліконів норовірусів в одному циклі секвенування

ПРИМІТКА: *Немає необхідності зменшувати навантаження ДНК бактеріальної ДНК. Бібліотеки вірусних ампліконів можна вводити в цикли секвенування PulseNet, які вважаються "повними циклами" для обраного набору для секвенування.*

1. Підготуйте амплікони (максимум 48 зразків), як описано в VGB.NV.METHOD.002 Протокол ПЛР для ампліфікації повнорозмірних геномів норовірусів GI та GII.
2. Підготуйте бібліотеки секвенування зі зразків ампліконів, як описано в PNL35.
3. Об'єднайте рівні об'єми бібліотек і розведіть до 4 нМ. Для розведення пулу до 4 нМ дотримуйтесь розрахунків, наведених у таблиці 9.

   ПРИМІТКА: *Розрахунки автоматизовані в робочій книзі PNL35.W1.*

	Приклад розрахунку	Формула
Концентрація пулу (значення Qubit, нг/мкл):	10.6	
Молярність (нМ) = (конц/(660 г/моль x 400 п.н.) x 10^6:	40.15	=(PoolConcentration/(660*400))*10^6
Об'єм пулу для розведення (мкл) = (нМ)(x)=(4 нМ)(50 мкл):	4.98	=4*50/Молярність
Об'єм RSB для розведення (мкл) = 50 - об'єм пулу:	45.02	=50-об'єм басейну

Таблиця 9. Розрахунки для розведення пулу норовірусів до 4 нМ

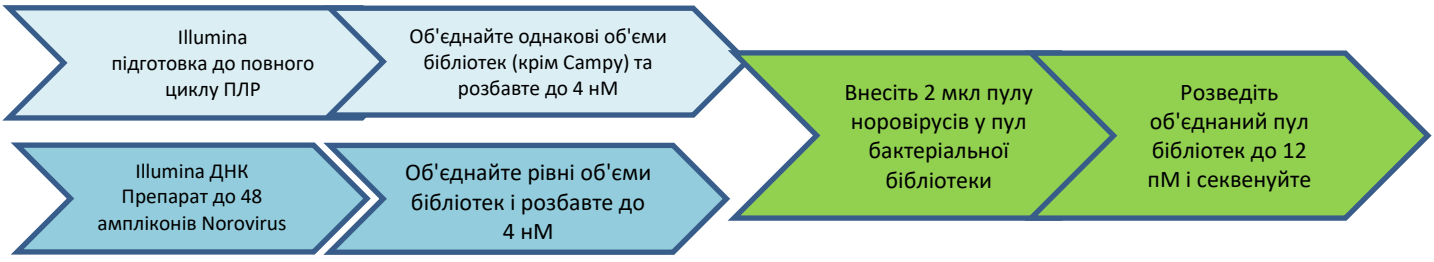
4. Внесіть 2 мкл пулу бібліотеки ампліконів 4 нМ в пул бактеріальної бібліотеки 4 нМ.

   *ПРИМІТКА***:** *Вірусний амплікон не впливає суттєво на молярність пулу бактеріальної бібліотеки.*
5. Перейдіть до секвенування на MiSeq, дотримуючись інструкцій у PNL38.

   5.1. Для зразків Norovirus перед ключами стану потрібно додати префікс "noro_", щоб легко відрізнити зразки Norovirus від зразків PulseNet.

   5.2. Для вибору індексу переконайтеся, що всі пари індексів (бактерії та норовіруси) є унікальними для даного циклу і не використовувалися в попередніх циклах на цьому приладі.

Робочий процес для комбінованих циклів секвенування PulseNet/норовірусів



Додаток PNL35-2. Поєднання ампліконів PulseNet-організмів та циклоспори в одному циклі секвенування

ПРИМІТКА: *Немає необхідності зменшувати навантаження бактеріальної ДНК. Бібліотеки ампліконів Cyclospora можна вводити в цикли секвенування PulseNet, які вважаються "повними циклами" для обраного набору для секвенування.*

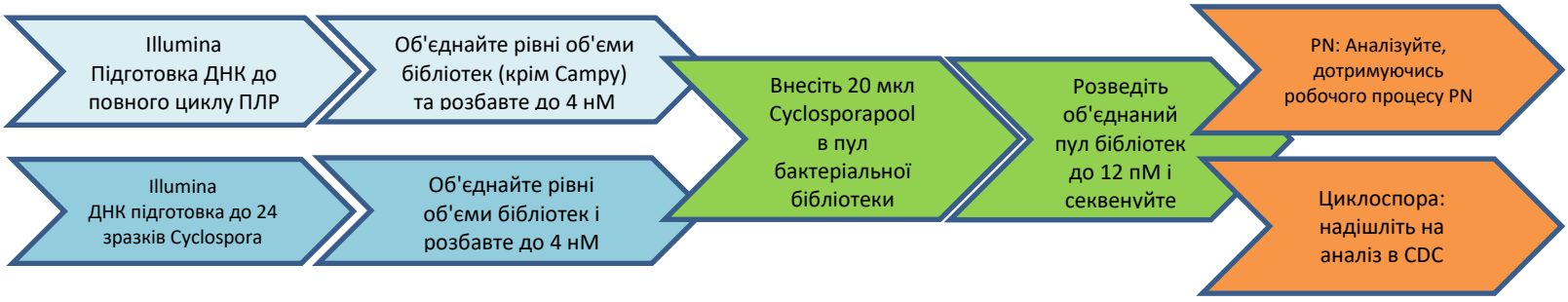
1. Виділіть ДНК циклоспори, підготуйте амплікони (максимум 24 зразки) та бібліотеки секвенування ДНК, як описано в AMD.DR.C.001 State Cyclospora Outreach Genotyping SOP.
2. Об'єднайте рівні об'єми бібліотек, виміряйте концентрацію та розподіл за розміром і розведіть до 4 нМ. Для розведення пулу до 4 нМ дотримуйтесь розрахунків, наведених у таблиці 10.
   ПРИМІТКА1: *Розрахунки автоматизовані в робочій книзі PNL35.W1*
   ПРИМІТКА2: *Розподіл розмірів фрагментів пулу зазвичай варіюється в межах 300-350 б.п. Рекомендується визначати розмір фрагмента для кожного циклу.*

	Приклад розрахунку	**Формула**
Концентрація пулу (значення Qubit, нг/мкл):	6.72	
Молярність (нМ) = (конц/(660 г/моль x середній розмір бібліотеки в п.н.) x 10^6:	25.45	=(PoolConcentration/(660*400))*10^6
Об'єм пулу для розведення (мкл) = (нМ)(x)=(4 нМ)(50 мкл):	7.86	=4*50/Молярність
Об'єм RSB для розведення (мкл) = 50 - об'єм пулу:	42.14	=50-об'єм басейну

Таблиця 10. Розрахунки для розведення пулу Cyclospora до 4 нМ

3. Внесіть 20 мкл 4 нМ пулу бібліотеки Cyclospora в 4 нМ пул бактеріальної бібліотеки.
4. Перейдіть до секвенування на MiSeq, дотримуючись інструкцій у PNL38.
   4.1. Для іменування зразків Cyclospora на вкладці "Підготовка бібліотеки" робочої книги дотримуйтесь стандартизованого формату, викладеного в СОП AMD.DR.C.001, крок 4.9.1.
   4.2. Для вибору індексу переконайтеся, що всі пари індексів (бактерії та Cyclospora) є унікальними для даного циклу і не використовувалися в попередніх циклах на цьому приладі.

Робочий процес для комбінованих циклів секвенування PulseNet/Cyclospora



Додаток PNL35-3: Налаштування шаблону імпорту зразка NextSeq для створення листа зразків NextSeq

1. Переконайтеся, що дані у стовпчиках **Sample ID***, **Well Position*** та **Project** (якщо застосовно) відформатовані правильно на вкладці NextSeq_Import_Sample_Template у файлі PNL35.W1. Дані з вкладки Підготовка бібліотеки повинні автоматично заповнити ці стовпці:
    a. **Ідентифікатор зразка*** повинен мати наступний формат: *Sample1-LabID-секвенатор ID-YYMMDD*
    b. **Well Position*** має містити розташування індексної лунки на планшеті (напр., A-A01).
    c. Дані проєкту беруться зі стовпчика Project ID на вкладці Library Prep (Підготовка бібліотеки) і є необов'язковими. Якщо його не заповнити, проєкт у BaseSpace за замовчуванням матиме ідентифікатор виконання.
2. Збережіть цю вкладку (NextSeq_Import_Sample_Template) як файл .csv для імпорту в BaseSpace.
3. Увійдіть до BaseSpace і виберіть "**Новий цикл**" та "**Планування циклу**" з випадаючого меню, як показано на рис. 2:

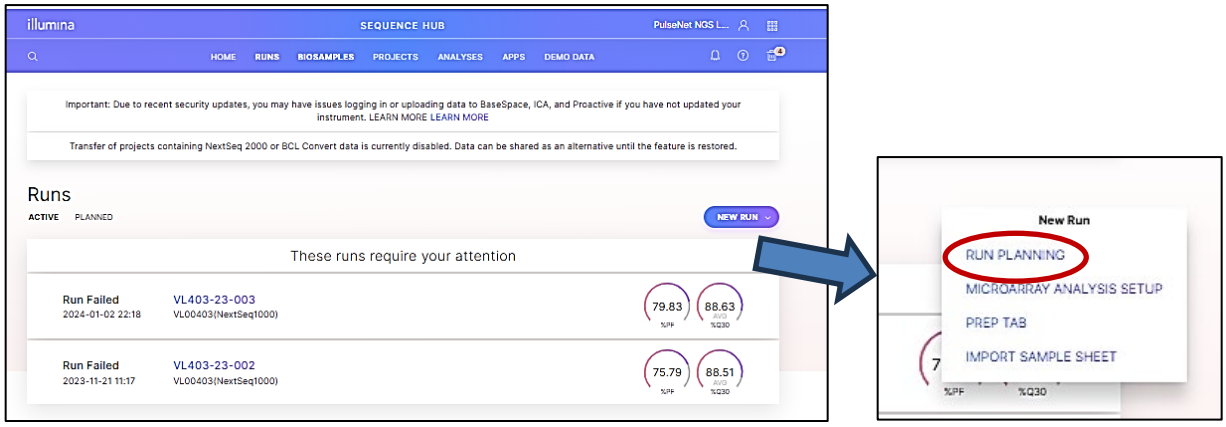


Рисунок 2: Вибір нового циклу> Планування циклу для імпорту шаблону зразка

4. Після введення **імені** циклу**, платформи приладу** та місця проведення **вторинного аналізу** (локальний або BaseSpace), як показано на рис. 3, натисніть "**Далі**".

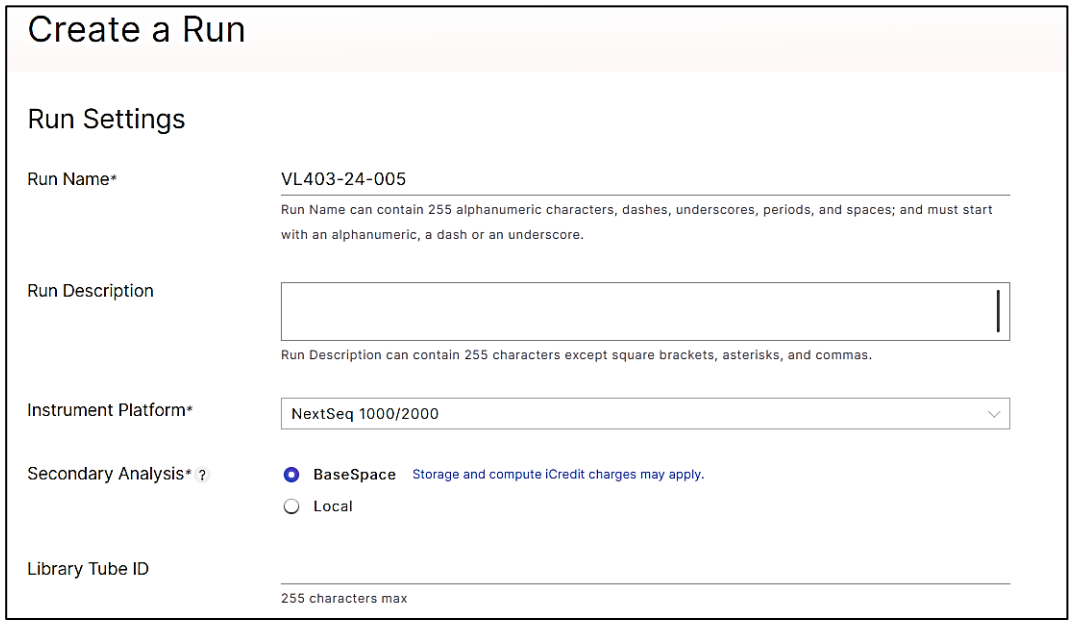


Рисунок 3: Позначення параметрів циклу (запуску)

5. Конфігурація (рис. 4):
   a. Налаштуйте програму для DRAGEN BCL Convert. **Переконайтеся, що версія програми відповідає тій, що встановлена на вашому приладі.**
   b. Позначте використаний набір для підготовки бібліотеки та набір адаптерів для індексів. **ПРИМІТКА:** ***Не вибирайте окремі набори індексів (наприклад, Illumina DNA-RNA UD Indexes Set A Tagmentation), оскільки ця робоча книга генерує запис "Позиція лунки", який включає ідентифікатор індексної позиції лунки (A-A01). Це позначення сумісне з комбінованим набором адаптерів для індексів, зазначеним у BaseSpace як "Набір індексів Illumina (або IDT-ILMN) DNA-RNA Indexes Set A B C D Tagmentation only" (тільки для тегів A B C D).*** *Якщо ви виберете окремі набори індексів для набору адаптерів індексів (тобто набір A), це змінить формат шаблону імпорту зразків і призведе до помилки, що вказує на невірне положення лунки.*
   c. Після завершення натисніть "**Далі**".

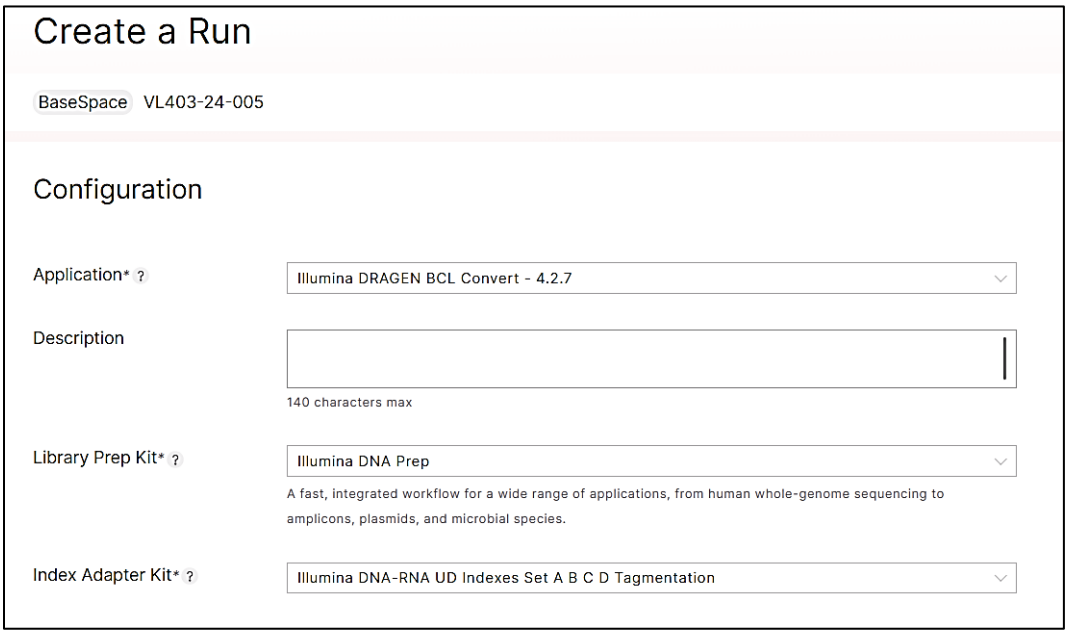


Рисунок 4: Конфігурація програми запуску та наборів

6. Переконайтеся, що інформація для **індексних зчитувань, довжин зчитувань** і **циклів перевизначення** правильна, і виберіть "**Import Samples**" і "**CSV**", щоб імпортувати файл NextSeq_Import_Samples_Template .csv, створений на вкладці NextSeq_Import_Samples_Template у файлі PNL35.W1 (Рис. 5).

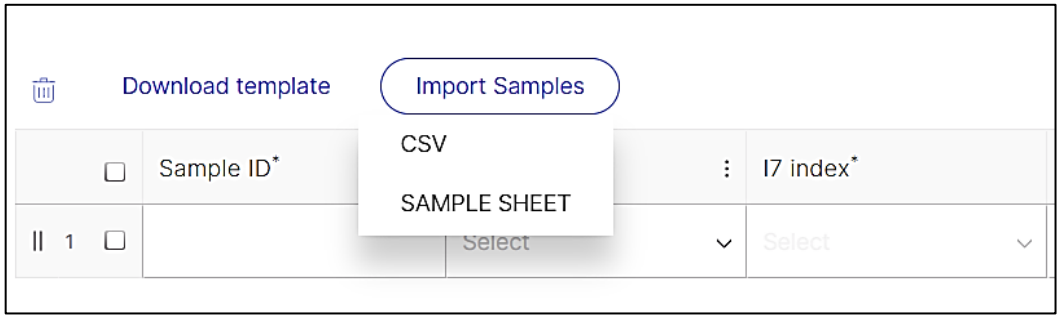


Рисунок 5: Імпорт файлу .csv NextSeq _Import_Samples_Template

7. Необхідні поля повинні бути заповнені, як показано нижче на рис. 6.

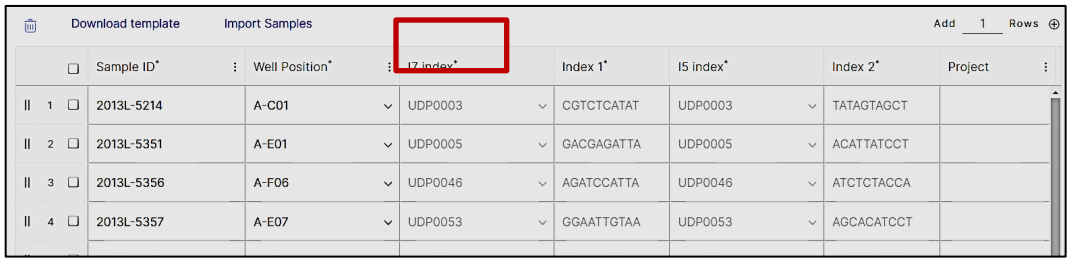


Рисунок 6: Підтвердження імпорту зразків/індексів

8. У розділі **Налаштування аналізу** залиште **AdapterRead1 і 2** та **BarcodeMismatchesIndex1 і 2** порожніми за замовчуванням (Рис. 7) і натисніть "**Далі**".

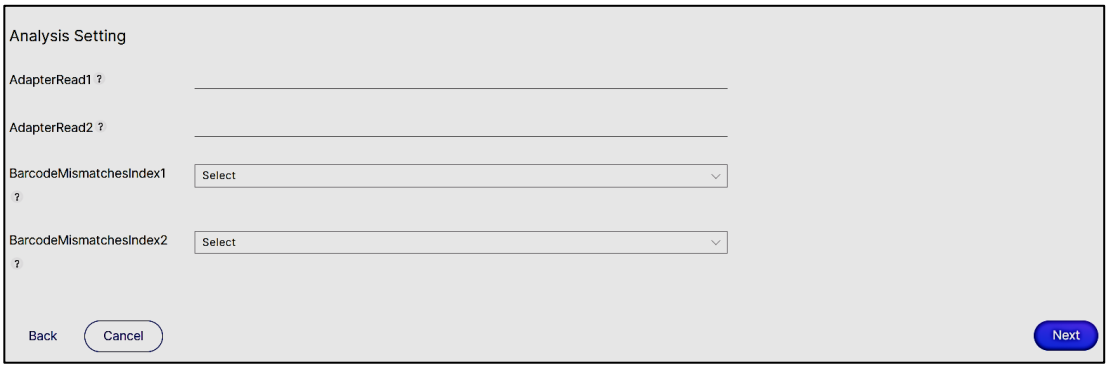


Рисунок 7: Налаштування аналізу

9. Перегляньте створену інформацію про цикл, як показано на рис. 8, і виберіть **Зберегти як чернетку** або **Зберегти як запланований**. Це призведе до створення SampleSheet в BaseSpace. Тепер ви можете увійти в BaseSpace на приладі, вибрати налаштований цикл і завантажувати прилад для проведення секвенування.

Рисунок 8: Інформація про перегляд прогону