

Pakendi infoleht

KASUTAMISEKS IN VITRO DIAGNOSTIKAS.

Sihtotstarve

TruSight™ Whole Genome on kvalitatiivne *in vitro* diagnostiline seade, mis on ette nähtud kogu genoomi sekveneerimiseks ja ühenukleotiidsete variantide, insertioonide/deletsioonide, koopiaarvu variantide, homosügootsuse käituste, lühikeste tandem-kordusekspansioonide ja verest ekstraheeritud inimese genoomse DNA mitokondriaalsete variatsioonide tuvastamiseks.

TruSight Whole Genome sisaldab analüüsi TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes ja juhised analüüsirakenduse TruSight Whole Genome Analysis Application kasutamiseks. Seade on ette nähtud kasutamiseks koos ühilduvate allavoolu iduliinirakendustega *in vitro* diagnostiliste analüüsides väljatöötamiseks ning kvalifitseeritud laboritöötajate ja analüüsi arendajate poolt.

TruSight Whole Genome on ette nähtud kasutamiseks NovaSeq™ 6000Dx Instrument.

Kokkuvõte ja seletus

TruSight Whole Genome on järgmise põlvkonna sekveneerimisanalüüs, mis kasutab märgistamis põhise PCR-i teegi ettevalmistust, alustades perifeersest täisverest ekstraheeritud genoomsest DNA-st (gDNA) ning sekveneerimisest ja esmasest analüüsist Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument.

Sekundaarne analüüs tehakse kaasasolevas ja nõutavas TruSight Whole Genome Analysis Application tarkvaras Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx ning see hõlmab demultipleksimist, joendamist GrCh38/hg38 inimese referentsgenoomiga ja variantide nimetamist, samuti annotatsiooni ja kvaliteedikontrolli (QC) mõõdikute spetsifikatsioonide rakendamist, [Tabel 1](#)-s, et tagada analüütiline toimivus. Analüüsi väljundid hõlmavad käituse ja proovi kvaliteedikontrolli aruandeid ning genoomi variandi nimetamise vormingu (VCF) faile kasutamiseks ühilduva allavoolu kolmanda taseme analüüsi ja aruandluse tarkvaraga.

TruSight Whole Genome hindab laialdaselt inimese genoomi kodeerivaid ja mittekodeerivaid piirkondi. Variantide hindamine hõlmab väikeste variantide, koopiaarvu variantide (CNV-d), homosügootsuse (ROH) ja lühikese tandeemi korduse (STR) ekspansioonide tuvastamist. Lisaks tuvastab TruSight Whole Genome SMN1 c.840C alleeli (NM_000344.3:c.840C>T) puudumise, mis võib viidata SMN1 geeni deletsioonile või SMN1/SMN2 geenikonversioonile.^{1,2} SMN1 c.840C alleeli bialleelne kadu põhjustab ligikaudu 95% spinaalse lihaskatroofia (SMA) juhtudest.³

[Tabel 2](#) annab teavet variantitüüpide kohta, mida on valideeritud TruSight Whole Genome-ga.

Tabel 1 TruSight Whole Genome kvaliteedimõõdikute spetsifikatsioonid

Väljundi tüüp	Mõõdik	Spetsifikatsioon
Sekveneerimiskäituse kvaliteedikontroll	Kokku % \geq Q30	$\geq 85,0$
FASTQ kvaliteedikontroll	Saagis proovi kohta (bps)	$\geq 90\,000\,000\,000$
Prooviteegi kvaliteedikontroll	Keskmine autosoomne katvus	$\geq 35,0$
	Üle 20-kordse katvusega autosoomide protsent	$\geq 93,94$
	Normaliseeritud katvus 60% kuni 79% GC bini	$0,82 \leq x \leq 1,13$
	Normaliseeritud katvus 20% kuni 39% GC bini	$0,97 \leq x \leq 1,06$
	Keskmine mitokondriaalne katvus	$\geq 500,0$
	Q30 aluste protsent	$\geq 85,0$
	Hinnanguline proovi saastumine	$\leq 0,005$

Tabel 2 Tuvastatud variandid, mille on valideerinud TruSight Whole Genome

Variandi tüüp	Kinnitatud variandi tuvastamine
Väikesed variandid	Ühe nukleotiidi variandid (SNV-d), lühikesed insertsioonid/deletsioonid (1–31 bp)
Koopiaarvu variandid (CNV-d)	≥ 10 kb võimendused ja kaod
Homosügootsuse käitused (ROH)	≥ 500 kb
Mitokondriaalsed SNV-d	% heteroplasmaatiline, kui $\geq 4,75\%$
Lühikesed tandemi korduse (STR) laiendused	Sihtotstarbelised lookused (AFF2, AR, ATN1, ATXN1, ATXN10, ATXN2, ATXN3, ATXN7, ATXN8OS, C9ORF72, CACNA1A, CBL, CNBP, CSTB, DIP2B, DMPK, FMR1, FXN, GLS, HTT, JPH3, NIPA1, NOP56, NOTCH2NL, PABPN1, PHOX2B, PPP2R2B ja TBP)
SMN1 variant	NM_000344.3:c.840C/T

Protseduuri põhimõtted

TruSight Whole Genome on ette nähtud PCR-i vabade teekide ettevalmistamiseks inimese terve genoomi sekveneerimisandmete saamiseks. Analüüs algab perifeersest inimese täisverest ekstraheeritud kvantifitseeritud genoomsest DNA-st teekide ettevalmistamisega, hõlmab sekveneerimist ja analüüsi NovaSeq 6000Dx Instrument seadmel TruSight Whole Genome Analysis Application, ning lõpeb variantide nimetamise ja annotatsiooniga.

TruSight Whole Genome protseduur koosneb järgmistest sammudest:

- **Partii planeerimine ja käituse loomine** – enne teegi ettevalmistamise alustamist on tungivalt soovitatav partii kavandada ja käitada. Teekide ettevalmistuspartii võib valmistada kuni 24 prooviteeki. Proovide arvu põhjal võib kasutada erinevaid läbivooluküveti konfiguratsioone (6-kordne S2 ja 16-kordne S4). Teegikatsuti ID, proovide nimed ja vastav indekseerimine salvestatakse käituse planeerimise ja käituse loomise ajal. Lisateavet käituse loomise kohta vt Analüüsi TruSight Whole Genome Analysis Application Guide rakendusjuhend (dokument nr 200049931). Järgige teegi ettevalmistamise töövooteostamisel kavandatud partiid.
- **Protokolli ettevalmistamine** – mõned reaktiivid on külmutatud ja need tuleb viia toatemperatuurile. Lühikese töövooteostus on võimalik samal päeval lõpetada ettevalmistus ja alustada sekveneerimist. Seega võib kavandatud käituste jaoks mõeldud sekveneerimise kulutarvikuid sulatada ka selle etapi jooksul. Kvantifitseeritud genoomse DNA proovid sulatatakse ja lahjendatakse optimeeritud DNA sisendi jaoks.
- **Teegi ettevalmistamine**
 - **Genoomilise DNA märgistamine** – kasutab DNA sisendi märgistamiseks Bead-Linked Transposomes PCR-Free'd (BLT-PF). Märgistamise ajal on gDNA killustatud, adapteritega märgistatud ja BLT-PF magnetgraanulite pinnal immobiliseeritud.
 - **Märgistusjärgne puhastus** – puhastab adapteriga märgistatud DNA ja BLT-PF eemaldab peatamispuhvri ligaadi indeksite ettevalmistamiseks.
 - **Ligaadi indeksid** – lisab teekidele unikaalsed topeltindeksid multipleksimise võimaldamiseks. Teostab tühimiku pikendamise ja elueerib üheaheelalised DNA teegid helmestest.
 - **Suuruse valimine ja teekide puhastamine** – graanulite puhastamise protseduur kahepoolse suuruse valimisega eemaldab fragmendid, mis on liiga väikesed ja liiga suured, et saavutada fragmendi keskmine pikkus umbes 450 bp, vahemik ~360 kuni 550 bp.
 - **Pooli- ja denaturatsiooniteegid** – BLT-PF isenormaliseerimisfunktsioon, mis võimaldab mahu järgi puulimist ilma qPCR-i või muu normaliseerumiseta. Iga teegi määratud maht puulitakse vastavalt iga käituse plaanile ja denatureeritakse 0,2N NaOH-ga (lahjendatud HP3). Seejärel kantakse denatureeritud puul üle NovaSeq 6000Dx teegikatsutisse ID-ga, mis vastab kavandatud käitusele.
- **Sekveneerimine ja analüüs** – S2 ja/või S4 konfiguratsioonis olevad kulutarvikud laaditakse NovaSeq 6000Dx Instrument-isse, sh seotud NovaSeq 6000Dx teegikatsuti(d) koos puulitud teekidega. Laadimisel skannitakse teegikatsuti ID ja kui see sisestatakse käituse planeerimise ajal, kasutatakse seda vastava planeeritud käituse valimiseks. Muul juhul tuleb seotud plaaniline käitus käsitsi valida. Puulitud teegid lisatakse kogumisse ja klasterdatakse läbivooluküvetile, seejärel sekveneeritakse seadmes NovaSeq 6000Dx sünteesi abil (SBS-meetod). SBS-meetod kasutab pöörduva terminaatormeetodit, et tuvastada fluorestsentsmärgistusega üksiknukleotiidi alused nende inkorporeerimisel kasvavatesse DNA-ahelatesse. Real-Time Analysis (RTA) analüüsib kujutist ja nimetab alused ning määrab iga sekveneerimistsükli igale alusele kvaliteediskoori. Esmase analüüsi andmed edastatakse Illumina DRAGEN serverisse automaatselt. Demultipleksimine ja DRAGEN analüüs tehakse automaatselt, kasutades TruSight Whole Genome Analysis Application. Selle analüüsi osana vaadatakse iga käitus ja prooviteegi kehtivus üle, kasutades [Kvaliteedikontrollid leheküljel 31](#) kirjeldatud analüütilisi mõõdikuid, ning tulemused esitatakse

konsolideeritud ja üksikutes prooviaruannetes. Kehtivate prooviteekide puhul luuakse märkustega genoomi variandi nimetamise vormingu (VCF) failid. Lisateavet analüüsi töövoogu kohta vt Analüüsi TruSight Whole Genome Analysis Application Guide rakendusjuhend (dokument nr 200049931).

Protseduuri piirangud

- Kasutamiseks *in vitro* diagnostikas.
- TruSight Whole Genome ühildub inimese perifeersest täisverest saadud genoomse DNA-ga.
- Analüüs ei sisalda reaktiive DNA ekstraheerimiseks ega kvantifitseerimiseks. Analüütiliste testide tulemused, sealhulgas [Segavad ained leheküljel 36](#), on saadud täisverega, kasutades representatiivseid DNA ekstraheerimiskomplekte ja DNA kvantifitseerimiskomplekte. Kõik diagnostilised testid, mis on välja töötatud kasutamiseks koos TruSight Whole Genome-ga, nõuavad täielikku valideerimist kõigi valitud DNA ekstraheerimiskomplekti ja DNA kvantifitseerimiskomplekti toimimise aspektide jaoks.
- Analüüs on konfigureeritud ja testitud järgmises tabelis näidatud proovi kordsuse ja indeksikomplektide suhtes.

Teegi ettevalmistuspartii suurus	Kordsus	Käituse konfiguratsioon	Indekseerimine
6, 12, 18 või 24 proovi	6-kordne	1–4 S2 käitust	S2 komplekt 1 kuni 4
16 proovi	16-kordne	1 S4 käitus	S4 komplekt 1 või 2
22 proovi	16-kordne + 6-kordne	1 S4 käitus + 1 S2 käitus	S4 komplekt 1 või 2, S2 komplekt 1 kuni 4 (ei kasutata S4 puhul)

- Analüüs ei jõusta positiivse proovi jälgimist. Kuigi tarkvara teatatud kokkuvõtlikku ploidsset kvaliteedikontrolli tulemust võib valikuliselt kasutada proovivahetuste tuvastamiseks, ei tuvasta see mees-mees vahetust ega mees-naine vahetust.
- Analüüs võimaldab valideerimist ainult genoomi VCF-failide väljundini. Kõik diagnostilised testid, mis on välja töötatud kasutamiseks koos TruSight Whole Genome-ga, nõuavad täielikku valideerimist kõigi valitud tootmisahela järgmiste rakenduste aspektide jaoks.
- Analüüs ei esita variandi nimetamisi proovide puhul, mis kvaliteedikontrolli nurjuvad.
- Analüüs määratleb kõrged usaldustasemed ainult SNV-de ja insertioonide/deletsioonide 1–5 bp puhul rangete kriteeriumide tõttu, mida kasutatakse genoomikonteksti määramiseks kindla varianditüübi suure usaldusena [Väikeste variantide usaldusastme määramine leheküljel 37](#).
- Analüüsi eesmärk on hinnata CNV-sid kogu teatatavas genoomis, olenemata genoomi kontekstist, ja see välistab piirkonnad, millel on omadused, mis peegeldavad referentsgenoomi piiranguid, nagu tsentromeerid, telomeerid ja populatsioonides eraldavad tavalised CNV-d.
- Analüüsi toimivust ei hinnatud koopiaarvu variantide puhul, mis olid alla 10 kb.

- Analüüs ei kajasta translokatsioone, ümberpööramisi ega tasakaalustatud ümberkorraldusi.
- Analüüsi toimivust ei hinnatud mitokondriaalse DNA (mtDNA) sisestuste ega deletsioonide suhtes.
- Analüüs esitab ainult tulemused jaotises loetletud STR-lookuste kohta Tabel 2. Kui tõelised STR ekspansioonide pikkused ületavad umbes 135 bp, on täheldatud pikkus sageli lühikeste lugemite tehniliste piirangute tõttu tõelise pikkuse alahinnang, kusjuures see mõju on FMR1 puhul veelgi suurem. Kui tõeline STR-i pikkus ületab fragmendi mediaanpikkuse (~330 bp), siis on STR-i pikkus hinnanguline platoo.
- Analüüs ei näita SMN1 või SMN2 koopianumbrit.
- Analüüs ei esita väiteid tuvastatud variantide patogeensuse kohta.

Toote komponendid

TruSight Whole Genome koosneb järgmistest osadest:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (kataloogi nr 20093209) ja
- TruSight Whole Genome Analysis Application (kataloogi nr 20106190, paigaldanud koolitatud Illumina personal)

Reaktiivid

Komplekti kuuluvad reaktiivid

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, PN 20072256

Reaktiivi nimi	Kogus	Täidetud maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF)	1	460 µl	Magnethelmed Streptavidin Magnetic Beads, mis on seotud transposoomidega puhverdatud vesilahuses.	-25 °C kuni -15 °C
Extension Ligation Mix (ELM)	1	1,6 ml	Ligaas, DNA polümeraas ja dNTP-d puhverdatud vesilahuses.	-25 °C kuni -15 °C
2N NaOH (HP3)	1	400 µl	2N naatriumhüdroksiidi (NaOH) lahus.	-25 °C kuni -15 °C

Reaktiivi nimi	Kogus	Täidetud maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	290 µl	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab magneesiumsoola ja dimetüülformamiidi.	-25 °C kuni -15 °C

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, PN 20072257

Reaktiivi nimi	Kogus	Täidetud maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	41 ml	Puhverdatud vesilahus, mis sisaldab pesuainet ja soola.	15°C kuni 30°C
Resuspension Buffer (RSB)	1	20 ml	Puhverdatud vesilahus.	15°C kuni 30°C
Cleanup Beads (CB)	1	10 ml	Tahke faasi paramagnetilised helmed puhverdatud vesilahuses.	15°C kuni 30°C
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	1,4 ml	Pesuaine lahus vees.	15°C kuni 30°C
Neutralization Buffer (NB)	1	450 µl	Tris-HCl lahus.	15°C kuni 30°C

TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, PN 20072258

Reaktiivi nimi	Kogus	Täidetud maht	Toimeained	Säilitustemperatuur
UDI PCR-Free (32 Indexes)	1	37 µl	Ainulaadsed kahekordsed (UD) indeksadapterid, mis on paigutatud plaadile.	-25 °C kuni -15 °C

Vajalikud tarvikud, mis ei kuulu komplekti

- 100% etanool (200 proof), molekulaarbioloogilisel tasemel
- Sertifitseeritud RNAasi-/DNAasivaba vesi
- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 tsüklit) (kataloogi nr 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 tsüklit) (kataloogi nr 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (kataloogi nr 20062292)
- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (kataloogi nr 20062293)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (kataloogi nr 20062290)

- NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (kataloogi nr 20062291)

Säilitamine ja käsitlemine

- Toatemperatuur tähendab temperatuurivahemikku 15 °C kuni 30 °C.
- Kui mõni komplekti TruSight Whole Genome Dx Library Prep pakend või sisu on kahjustatud või rikunud, võtke ühendust Illuminaklienditeenindusega.
- Reaktiivid on stabiilsed kuni komplekti etiketidel märgitud aegumiskuupäevani, kui neid hoiustatakse ettenähtud viisil. Säilitamistingimusi vt jaotisest [Komplekti kuuluvad reaktiivid leheküljel 5](#). Hoidke analüüsi komponente ettenähtud temperatuuril ja ärge kasutage aegunud reaktiive. Ärge kasutage analüüsikomponente teistest partiidest. Partii on märgitud komplekti etiketidel.
- Muutused reaktiivide välimuses võivad tähendada, et materjalide seisukord on halvenenud. Välimuse füüsilise muutuse korral (nt reaktiivi ilmsed värvimuutused või hägusus) ärge reaktiive kasutage. Sademe täheldamise korral ST2 puhul kuumutage 37 °C juures 10 minutit ja segage seejärel keerisseguril, kuni sade lahustub.
- Analüüsi TruSight Whole Genome Dx Library Prep stabiilsust on hinnatud ja toimivust kinnitatud külmutatud katsuti kuni nelja kasutuse jaoks, kui neid kasutuse vahel külmutatakse.

Seadmed ja materjalid

Vajalikud seadmed, mis ei kuulu komplekti

Enne analüüsi alustamist kontrollige seadmete kalibratsiooni.

Seadmed	Tarnija
Keerissegur, mis suudab saavutada 3000 p/min, lame põhi või tops	Üldine laboritarnija
Mikroproovi inkubaator on kalibreeritud temperatuuri täpsuse ±2 °C tagamiseks	SciGene, kataloogi nr 1057-30-O (või samaväärne)
Mikroproovide inkubaator koos vahedetailiga 96 süvendiga MIDI-plaatide jaoks	Illumina, kataloogi nr BD-60-601
Mikrotsentrifuug	Üldine laboritarnija
96 süvendiga mikroplaadi tsentrifuug	Üldine laboritarnija

Seadmed	Tarnija
Plaadi raputi järgmiste tehniliste andmetega: <ul style="list-style-type: none"> • Võib raputada kiirusel 1800 p/min • Orbiidi konstandi segamine 2 mm • Segamise täpsus ± 25 p/min 	VWR, kataloogi nr 1808-0506 (või samaväärne toode)
Tihenduskiil või -rull	Üldine laboritarnija
Magnetalus järgmiste spetsifikatsioonidega: <ul style="list-style-type: none"> • Mõeldud paramagnetiliste helmeste sadestamiseks/eraldamiseks • Magnetid asuvad aluse küljel, mitte põhjal • 96 süvendiga MIDI-plaatide jaoks 	Thermo Fisher Scientific, kataloogi nr AM10027 (või samaväärne)
NovaSeq 6000Dx Instrument	illumina, kataloogi nr 20068232
Täpsuspipetid (ühekanalilised): <ul style="list-style-type: none"> • 10 µl • 20 µl • 200 µl • 1000 µl 	Üldine laboritarnija
Täpsuspipetid (8-kanalilised): <ul style="list-style-type: none"> • 20 µl • 200 µl 	
Veenduge, et pipetid oleksid regulaarselt kalibreeritud ja täpsed 5% ulatuses märgitud mahust	
Automaatpipettija	Üldine laboritarnija

Vajalikud, kuid komplekti mittekuuluvad materjalid

Enne protokolliga alustamist veenduge, et teil oleksid olemas vajalikud materjalid.

Protokoll on loetletud toodete abil optimeeritud ja valideeritud. Alternatiivsete materjalide kasutamise korral ei ole võrreldav jõudlus garanteeritud.

Materjalid	Tarnija
5 ml seroloogilised pipetid	Üldine laboritarnija
10 ml seroloogilised pipetid	Üldine laboritarnija

Materjalid	Tarnija
Adhesiivtihendid 96 süvendiga plaatidele järgmiste spetsifikatsioonidega. <ul style="list-style-type: none"> Kooritavad, läbipaistev polüester Tugev adhesiiv, mis talub mitut temperatuurimuutust vahemikus –40 °C kuni 110 °C. DNaasi-/RNAasivaba 	Üldine laboritarnija
Mikrotsentrifuugi katsutid, nukleasivabad (1,5, 1,7 või 2,0 ml, kui pole märgitud 0,5 ml-ks)	Üldine laboritarnija
Nukleasivabad reaktiivimahutid, 50 ml või sellega võrdväärne (PVC, ühekordne kaev)	Üldine laboritarnija
15 ml koonilised katsutid	Üldine laboritarnija
50 ml koonilised katsutid	Üldine laboritarnija
20 µl aerosoolikindlad pipetiotsakud	Üldine laboritarnija
200 µl aerosoolikindlad pipetiotsakud	Üldine laboritarnija
1000 µl aerosoolikindlad pipetiotsakud	Üldine laboritarnija
96 süvendiga hoiuplaadid, 0,8 ml (MIDI-plaadid)	Thermo Fisher Scientific, osa nr AB-0859 või samaväärne
96 süvendiga PCR-plaadid, 0,2 ml (polüpropüleen, vaba RNA-st/DNA-st, vähese siduvusega)	Üldine laboritarnija
Jäämahuti ja jää	Ei kohaldata
Kvantifitseeritud genoomse DNA proovid	Ei kohaldata

Proovimaterjalide kogumine, transportimine ja säilitamine



ETTEVAATUST!

Käsitsege kõiki proovimaterjale potentsiaalselt nakkusohtlikena.

- Järgige inimvereproovide kogumisel, transportimisel, säilitamisel ja töötlemisel ohutusprotseduure, sh isikukaitsevahendite kasutamist.
- Täisvere transport peab vastama riigi, föderaal-, osariigi ja kohalikele eeskirjadele etioloogiliste ainete transportimise kohta.

- Koguge 2–5 ml perifeerset täisverd EDTA katsutitesse ja säilitage temperatuuril 2–8 °C kuni viis nädalat enne ekstraheerimist.
- Ei ole täheldatud kahjulikku mõju analüüsi toimivusele täisvere proovide puhul, mille bilirubiini, hemoglobiini, triglütseriidide, biotiini või EDTA sisaldus on suurenenud. Vt segavaid aineid.
- TruSight Whole Genome ühildub müügil olevate ekstraheerimiskomplektide ja protokollidega, mis sobivad kasutamiseks järgmise põlvkonna sekveneerimises (NGS). Vt [DNA ekstraheerimismeetodi hindamine leheküljel 35](#).
- TruSight Whole Genome ühildub DNA-ga, mis on elueeritud Tris-i puhverdatud lahuses, mis sisaldab ≤ 10 mM EDTA-d, näiteks 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 (TE).
- Soovitav on DNA elueerimine ja säilitamine TE-s. Stabiilsuse tagamiseks vältige säilitamist vees.

DNA sisendi soovitused

- Enne TruSight Whole Genome analüüsi alustamist kvantifitseerige täisverest ekstraheeritud genoomne DNA, kasutades mis tahes fluoromeetrilist kvantifitseerimismeetodit, mis kasutab nukleiinhappega seonduvaid värvaineid. Soovitav on konkreetse teegi ettevalmistuspartii ja sekveneerimiskäituse jaoks ette nähtud proovide gDNA kvantifitseerida koos, et võimaluse korral kõrvaldada partiidevaheline varieeruvus, või kasutada protsessi kontrole, et tagada $\leq 25\%$ DNA kvantifitseerimise partiidevahelise varieeruvus.
- Vältige väikeste proovimahtude ($< 2 \mu\text{l}$) pipettimist, et tagada DNA täpne kvantifitseerimine ja sisestamine.
- TruSight Whole Genome Dx Library Prep vajab piisavalt DNA-d, et küllastada BLT-PF helmeid teegi saagikuse tõhusaks isenormaliseerimiseks ja optimaalseks toimimiseks. Erinevate kvantifitseerimismeetodite tulemuste varieeruvuse tõttu pakub järgmine tabel kolme kvantifitseerimismeetodi jaoks soovitatavat DNA sisendit, et tagada analüüsi optimaalne toimivus. Muude kvantitatiivsete meetodite kasutamine võib nõuda optimeerimist. Vt jaotist [DNA sisendi tundlikkus leheküljel 35](#).

Kvantitatiivne meetod	Siht-DNA sisend (ng)	Minimaalne DNA varude kontsentratsioon
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	280	11,2 ng/ μl
Qubit dsDNA Broad-Range (BR) Assay Kit	280	11,2 ng/ μl
AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit	350	14 ng/ μl

Oskuste soovitus

Operaatori oskusi ja analüüsi edukat rakendamist saab hinnata, viies täieliku töövoo läbi üks kord vastavalt kasutusjuhendile. Seda töövoogu saab teostada kas ühe teegi ettevalmistusega 6 proovist ja sekveneerimiskäitusega, kasutades S2 läbivooluküveti, või ühe teegi ettevalmistusega 16 proovist ja sekveneerimiskäitusega, kasutades S4 läbivooluküveti. Edu näitab käituse ja teegi kvaliteedikontrolli moodsuste läbimine, mis on TruSight Whole Genome Analysis Application tarkvara konsolideeritud aruande väljundisse salvestatud. Vt jaotist Analüüsi TruSight Whole Genome Analysis Application Guide rakendusjuhend (dokument nr 200049931).

illumina soovib kaasata perifeerses täisveres ekstraheeritud genoomse DNA proovid, mis vastavad DNA varude kontsentratsioonile ja mahu kvalifikatsioonikriteeriumidele, et näidata analüüsi edukat integreerimist ülesvoolu laboratoorsete protsessidega, nagu proovide võtmine ja säilitamine, ning DNA ekstraheerimise ja kvantifitseerimise protseduure. Kasutada võib ka müügilolevaid genoomse DNA võrdlusproove, mis on saadud ühelt inimdoonorilt, nagu NA24385/HG002 (National Institute of Standards and Technology Genome in a Bottle Consortium).

Probleemide tekkimisel vaadake soovitud toimingute kohta jaotist [Tõrkeotsing leheküljel 68](#) ja võtke ühendust illumina tehnilise toega.

Hoiatused ja ettevaatusabinõud

- Selle analüüsi mõni komponent sisaldab potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Kandke kokkupuuteriskile vastavat kaitsevarustust, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit. Käsitsege kasutatud reaktiive keemiliste jäätmetena ja utiliseerige need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel. Ohutuskaardid (SDS) leiate veebilehelt support.illumina.com/sds.html.
- Teatage kohe kõigist selle tootega seotud tõsisest juhtumitest ettevõttele illumina ning kasutaja ja patsiendi osariigi pädevale asutusele.
- Käsitsege kõiki proovimaterjale nakkusohtlikena.
- Järgige labori ettevaatusabinõusid. Ärge pipeteerige suuga. Ärge sööge, jooge ega suitsetage töökameras. Proovide ja analüüsi reaktiivide käsitsemisel kandke ühekordseid kindaid ja laborikitleid. Pärast proovide ja analüüsi reaktiivide käsitsemist peske käed põhjalikult puhtaks.
- See analüüs sisaldab polüetüleenglükooli. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi.
- See analüüs sisaldab naatriumhüdrosiidi. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi.
- Teekide valmistamise protseduurid nõuavad RNAasi-/DNAasi-vaba-keskkonda. Dekontamineerige tööalad põhjalikult RNAasi/DNAasi-inhibeeriva puhastusvahendiga.

- Kasutage nukleaasivabu mikrotsentrifuugi katsuteid, plaate, pipetiotsakuid ja mahuteid.
- Kasutage kogu analüüsi vältel kalibreeritud seadmeid. Kalibreerige seadmed kindlasti selles protokollis määratud kiiruste, temperatuuride ja mahtude järgi.
- Reaktiivi ja proovi täpseks doseerimiseks kasutage täppispipette. Kalibreerige regulaarselt vastavalt tootja spetsifikatsioonidele.
- Kasutage kindlasti analüüsi jaoks õigeid seadmeid ja määrake programmid juhiste kohaselt.
- Mikroproovide inkubaatori puhul ettenähtud temperatuurid näitavad reaktsiooni temperatuuri, mitte tingimata seadme temperatuurisätet.
- Ärge kasutage analüüsikomponente teistest TruSight Whole Genome Dx Library Prep partiidest. Partiid on märgitud karbi etiketil.
- Nõuetekohased laboritavad on vajalikud, et vältida reaktiivide, seadmete, proovide ja teekide saastumist nukleaaside ning PCR-i produktidega. Nukleaasi ja PCR-i produktiga saastumine võib põhjustada ebatäpseid ning ebausaldusväärseid tulemusi.
- Analüüsi optimaalseks toimivuseks ja säilimiseks on nõutav õige plaaditüüp. Järgige kindlasti jaotises [Kasutusjuhised leheküljel 15](#) toodud juhiseid proovide ülekandmiseks plaatide vahel.
- Ristsaastumine või proovi kadumine võib tekkida, kui plaadi tihendeid ei panda peale ega eemaldata hoolikalt (vt [Teegi ettevalmistusplaatide käsitsemine leheküljel 13](#)).
- Esitatud juhiste eiramine võib viia valetulemusteni või vähendada oluliselt teekide kvaliteeti.
- Hoidke analüüsi reaktiive või komponente ettenähtud temperatuuril.
- Ärge hoidke reaktiive härmatisevabas hoiuseadmes.
- Ärge kasutage valesti säilitatud reaktiive.
- Ärge kasutage ühtki komplekti osa pärast selle aegumiskuupäeva.
- Valmistage kasutuspäeval 0,2N NaOH (lahjendatud HP3) värske lahus ja visake ülejäanud kogus pärast kasutamist ära.
- Valmistage kasutuspäeval ette värske 80% etanool RNAasi-/DNAasivaba veega. Etanool võib absorbeerida õhust vett ja seeläbi tulemusi mõjutada. Kõrvaldage 80% etanool pärast kasutamist vastavalt kohalikele, piirkondlikele ja/või riiklikele eeskirjadele. Kasutage molekulaarbioloogia klassi etanooli.

Protседuuriga seotud märkused

Näpunäiteid ja tehnikaid

Ristsaastumise vältimine

- Proovide või reaktiivide põhisegude lisamise või ülekandmise korral vahetage *kõigi proovide* vahel otsakuid.
- Mitmekanalilise pipetiga adapterite või praimerite lisamise korral vahetage otsakuid *kõigi süvendite* vahel.

- Sulgege ja tihendage plaadid ettevaatlikult laual, et vältida proovide ristsaastumist.
- Saastumise vältimiseks on iga indeksi süvend ühekordselt kasutatav.
- Kasutage näidatud minimaalseid mahte ja ärge valage järelejäänud kogust karbist tagasi varukatsutitesse, kuna see võib põhjustada saastumist. Töövoo toetamiseks on piisavalt ruumi.
- Ärge puulige teeke erinevatest ettevalmistustest.

Pipeti täpsus

Mitmekanaliliste pipettide kasutamisel järgige alltoodud suuniseid.

- Veenduge, et kaitseotsakud sobituksid täpselt ning sobiksid mitmekanalilise pipeti kaubamärgi ja mudeliga.
- Kinnitage otsakud pöörleva liigutusega tagamaks, et kõik otsakud kinnituksid sama korralikult.
- Aspireerige kõigisse otsakutesse sama vedelikumaht.
- Pipettige viskoosseid lahuseid (BLT-PF, CB, ELM, TWB2) aeglaselt.
- Pärast väljutamist kontrollige, kas vedelik on kõigist otsakutest väljutatud.

Vahustamise vältimine

- Pipettige aeglaselt ja pöörake segamiseks ümber. Ärge keeristage ELM ja TWB2.

Käitlemise indeksiplaadid

- Läbistage fooliumtihend ainult kasutatavate indeksite jaoks.
- Käsitsege plaati servadest ja vältige fooliumtihendi puudutamist millegi muuga kui puhaste pipetiotsakutega.
- Ärge kasutage korduvalt augustatud süvendeid.
- Kõrvaldage kasutamata maht (~30 µl) pärast kasutamist indeksiplaadi augustatud süvenditest ja asetage tihend läbistatud süvendite kohale, et vältida ristsaastumist.
- Ärge asetage tihendit kasutamata süvenditele, kuna see häirib läbitorkamist.

Teegi ettevalmistusplaatide käsitlemine

- Sulgege plaat alati enne hoiustamist, raputamist, inkubeerimist või tsentrifugeerimist.
- Plaadi sulgemiseks kinnitage adhesiivne kate plaadile, kasutades tihenduskiilu või -rulli.
- Veenduge, et servad ja süvendid oleksid tihedalt suletud, et vähendada ristsaastumise ning aurustumise ohtu.
- Sulgege plaadid alati uue adhesiivse plaaditihendiga. Ärge kasutage tihendeid korduvalt.
- Asetage plaat tasasele pinnale, seejärel eemaldage tihend ettevaatlikult.
- Kui ei ole teisiti määratletud, saab toiminguid teha nii, et plaat on magnetil või sellest väljas.

Plaatidevahelised ülekanded

- Mahtude ülekandmisel plaatide vahel kandke ettenähtud maht lähteplaadi igast süvendist sihtplaadi vastavatesse süvenditesse.

Kaevud

- Reaktiivikaevusid võib kasutada näidatud juhtudel. Kasutage järgmisi juhiseid.
 - Valmistage kaev CB-ga pärast keeristamist ette. Enne teist helmeste lisamise etappi ei ole vaja CB katsutisse tagasi panna ja seda keeristada.
 - Sildistage TWB2 ja RSB kaevud segaduse vältimiseks.
 - Kõrvaldage reaktiivid, kui nii on märgitud või töövoo lõpus.
- Kasutage soovitatud mahtu. Soovitatavate mahtude hulka kuulub 1 ml ülejääk minimaalse tühimahu puhul.
- RSB ja TWB2 on pakendatud sarnastesse katsutitesse. Enne kasutamist lugege hoolikalt iga silti.

Tsentrifugimine

- Tsentrifugige ainult protseduuri näidatud etappidel, et konsolideerida vedelik või helmed süvendi põhja, et vältida proovi kadu.

Helmeste käsitlemine

- Mitte külmutada Cleanup Beads (CB).
- Helmeste pesemisel järgige alltoodud nõudeid.
 - Kasutage Stand-96 kõigi MIDI-plaatide puhul.
 - Doseerige vedelik nii, et ükski helmes ei jääks süvendi küljele kinni.
 - Hoidke plaati magnetalusel.
- Lisage alati reaktiivid süvendi keskele või põhja, häirimata helmepelletit. Ärge lisage süvendi ülaossa reaktiive.
- Pipettige helmesuspensiooni aeglaselt.
- Keerutage helmeid, kuni need on hästi hajutatud. Vedeliku värv peab olema homogeenne. Keerutage protokollis täpsustatud viisil, et tagada helmeste resuspendeerimine kasutamise ajal.
- Kui helmed ei resuspendeeru, raputage uuesti.
- Kui helmed aspireeritakse pipetiotsakutesse, väljutage need tagasi magnetalusel olevale plaadile ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
- Pärast kasutamist hoidke helmeid püstises asendis, et need oleksid puhvrise sukeldatud.

Kontrollmaterjalid

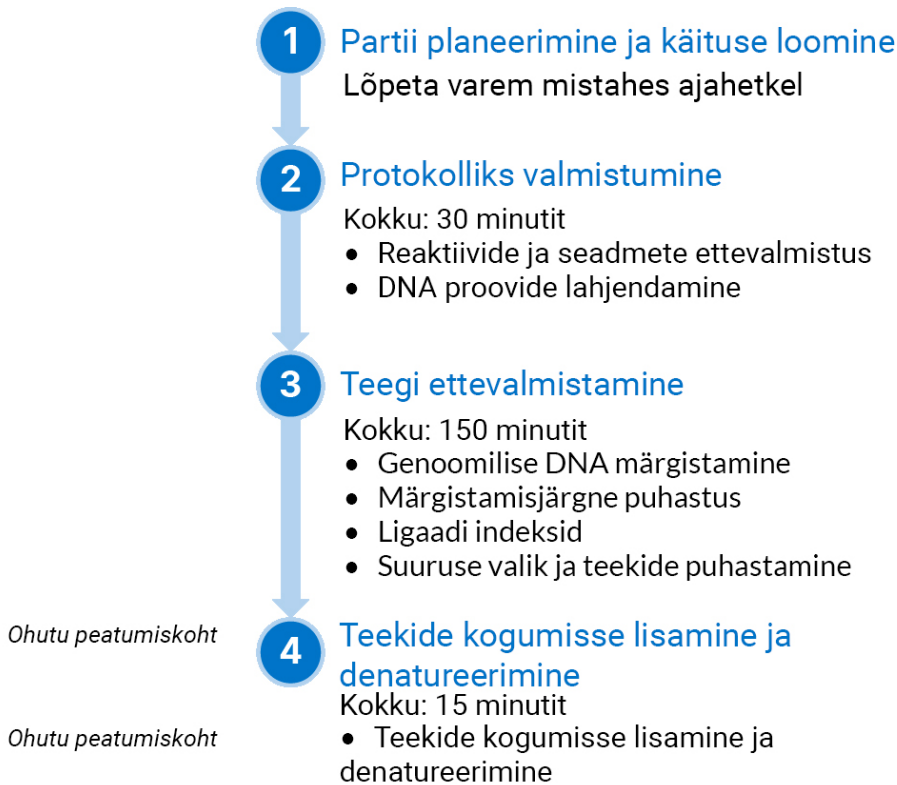
TruSight Whole Genome kasutab andmete kvalifikatsiooniks TruSight Whole Genome Analysis Application tarkvarasse sisseehitatud analüütilisi kontrole ega nõua väliste partiikontrolide kasutamist. Lisateavet mõõdikute spetsifikatsioonide kohta vt lõigust [Kvaliteedikontrollid leheküljel 31](#).

Kasutusjuhised

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Töövoog

Järgmine diagramm illustreerib TruSight Whole Genome Dx Library Prep töövoogu. Etappide vahele on märgitud ohutud peatumiskohad.

Peatumise korral tagastage ülejäänud reaktiivid algsetesse katsutitesse säilitustemperatuurile, mis on näidatud jaotises [Komplekti kuuluvad reaktiivid leheküljel 5](#). Kui jätkate, liikuge ettevalmistatud reaktiividega protokoll järgmisesse jaotisse.



Partii planeerimine ja käituse loomine

Planeerige partii prooviteekide arv ning indekseerimine ja puulimine sekveneerimiskäituste jaoks.

TruSight Whole Genome on hinnatud ja näidatud toimivus nelja komplekti indeksite puhul S2 läbivooluküveti jaoks ([Joonis 1, Tabel 4](#)) ja kahe indeksikomplekti jaoks S4 läbivooluküveti jaoks ([Joonis 2, Tabel 5](#)). Tarkvara jõustab määratud indeksikomplektide kasutamise. Ärge segage ega sobitage määratud indeksikomplektide vahel.

Sekveneerimispleksus väljaspool neid soovitusi ei ole toetatud.

S2 indeksi ja S4 indeksi komplektid toetavad kokku teegi ettevalmistuspartii suurusi 6, 12, 16, 18, 22 ja 24 proovi. Kasutage iga teegi ettevalmistuspartii suuruse [Tabel 3](#) kohta loetletud ühilduvaid indeksikomplekte.

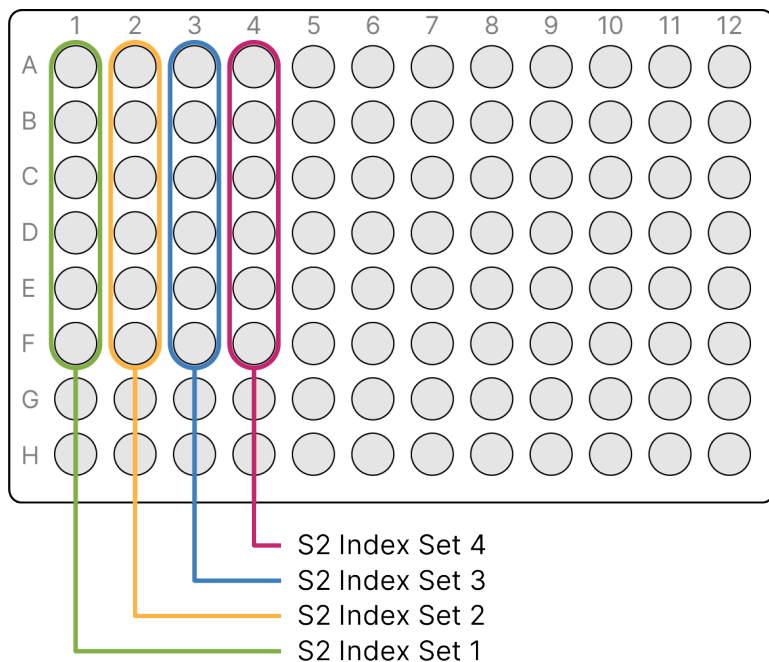
**ETTEVAATUST!**

Asetage proovid plaadile, kasutades orientatsiooni, mis vastab kavandatud indekseerimisele, st ridasid A kuni H 16-kordseks või ridasid A kuni F 6-kordseks. Lisage indekseid mitmekanalilise pipeti abil, et vältida süvendi vahelejätmist või kahe indeksikomplekti lisamist ühte proovi, mis võib vastavalt põhjustada tulemuste puudumist või valetulemusi.

Tabel 3 Indeksikomplekti valikud teegi ettevalmistuspartii jaoks

Teegi ettevalmistuspartii suurus	Indeksi komplekt	Läbivooluküveti konfiguratsioonid
6 proovi	S2 indeksikomplekt 1, 2, 3 või 4 (valige ükskõik milline 1 komplekt)	S2 × 1
12 proovi	S2 indeksikomplekt 1, 2, 3 või 4 (valige mis tahes 2 komplekti)	S2 × 2
18 proovi	S2 indeksikomplekt 1, 2, 3 või 4 (valige mis tahes 3 komplekti)	S2 × 3
24 proovi	S2 indeksikomplekt 1, 2, 3 ja 4	S2 × 4
16 proovi	S4 indeksikomplekt 1 või 2	S4 × 1
22 proovi	S4 indeksikomplekt 1 + S2 indeksikomplekt 3 või 4	S4 × 1 ja S2 × 1
	S4 indeksikomplekt 2 + S2 indeksikomplekt 1 või 2	

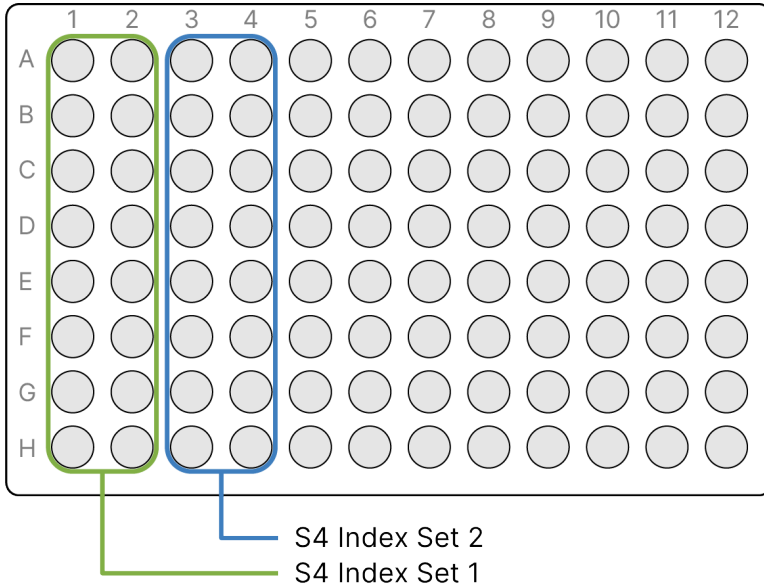
Joonis 1 Indeksiplaadi paigutus, mis näitab nelja indeksikomplekti S2 läbivooluküveti sekveneerimiseks



Tabel 4 S2 indeksi komplektid S2 läbivooluküveti jaoks

	S2 indeksikomplekt 1 (roheline)	S2 indeksikomplekt 2 (kollane)	S2 indeksikomplekt 3 (sinine)	S2 indeksikomplekt 4 (punane)
	1	2	3	4
A	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
B	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
C	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
D	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
E	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
F	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094

Joonis 2 Indeksiplaadi paigutus, mis näitab kahte indeksikomplekti S4 läbivooluküveti sekveneerimiseks



Tabel 5 S4 indeksikomplektid S4 läbivooluküveti jaoks

	S4 indeksikomplekt 1 (roheline)		S4 indeksikomplekt 2 (sinine)	
	1	2	3	4
A	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
B	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
C	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
D	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
E	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
F	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094
G	UDP0043	UDP0071	UDP0087	UDP0095
H	UDP0044	UDP0072	UDP0088	UDP0096

Salvestage kordumatu partii nimi ja prooviandmed, sh proovi ID, seotud indeksiplaadi süvendi ID (vt [Lisa A leheküljel 83](#)), teegiplat, teegiplaadi süvendi ID ja teegikatsuti ID (kui see on teada). See teave sisestatakse käituse loomise ajal.

Juhiseid käituste loomiseks rakenduses vt Analüüsi TruSight Whole Genome Analysis Application Guide rakendusjuhend (dokument nr 200049931). Salvestage käituse nimi, mida kasutada kulutarvikute laadimise ajal.



ETTEVAATUST!

Veenduge, et teegi ettevalmistusel kasutatud indeksid ja nendega seotud proovid vastaksid salvestatud ja käituse loomiseks kasutatud proovidele. Ebakõlad võivad põhjustada valedest tulemustest teatamist või tulemuste puudumist.

Protokolliks valmistumine

Reaktiivide ja seadmete ettevalmistus

Kui plaanite sekveneerida samal päeval, sulatage sekveneerimise kulutarvikud ette. Üksikasjalikke juhiseid vt NovaSeq 6000Dx Instrument tootedokumentatsioon (dokument # 200010105).

1. Eelsoojendage MIDI plaadi inserdiga mikroproovide inkubaator temperatuurini 47 °C.
2. Eemaldage karbist järgmised reaktiivid ja sulatage need järgmiselt.

Tabel 6 -25 °C kuni -15 °C säilitamine

Reaktiiv	Karbi nimi	Sulatamisjuhised
BLT-PF	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada.
ELM	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada. Seejärel hoidke jääl kuni kasutamiseni.
HP3	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada.
TB1	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada.
UD indeksid	TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes	Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada.

Tabel 7 Säilitamine temperatuuril 15 °C kuni 30 °C

Reaktiiv	Karbi nimi	Sulatamisjuhised
CB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Kasutage toatemperatuuril.
RSB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Kasutage toatemperatuuril.
ST2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Kasutage toatemperatuuril.
TWB2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Kasutage toatemperatuuril.
NB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Kasutage toatemperatuuril.

**ETTEVAATUST!**

See reaktiivide komplekt sisaldab potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Kandke kokkupuuteriskile vastavat kaitsevarustust, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit. Käsitsege kasutatud reaktiive keemiliste jäätmetena ja utiliseerige need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel. Täiendavat keskkonna-, tervise- ja ohutusteavet vaadake ohutuskaardilt (SDS) veebilehel support.illumina.com/sds.html.

DNA proovide ettevalmistamine

Valmistage ette järgmised kulutarvikud.

- Kvantifitseeritud gDNA-proovid:
 - a. Laske tootel jõuda toatemperatuurile.
 - b. Tsentrifugeerige lühidalt, et tilgad kokku koguda.
 - c. Segage keerisseguriga või pipettige segamiseks, seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
- RSB – Segage keerisseguriga või pöörake segamiseks ümber. Hoidke toatemperatuuril.
 - RSB ja TWB2 on pakendatud sarnastesse katsutitesse. Enne kasutamist lugege hoolikalt iga silti.

Protseduur

Sõltuvalt DNA sisendist, mis varieerub olenevalt kasutatavast DNA kvantifitseerimismeetodist, arvutage lahjendatud DNA proovide ettevalmistamiseks vajalikud mahud. Allpool on esitatud valemid kolme testitud DNA kvantifitseerimismeetodi kohta. Lisateavet leiate jaotisest [DNA sisendi soovitusel leheküljel 10](#) ja [Lisa B leheküljel 86](#).

Arvutused eeldavad minimaalset pipettimise mahtu 2,0 µl ja sisaldavad 10% ülejääki. Ümardamine tuleb läbi viia viimastel etappidel pärast arvutuste tegemist, kasutades täpse pipettimise tagamiseks vajalikku kümnendkoha arvu.

1. valik: 280 ng DNA sisend Quant ja Qubit laiaulatuslike kvantifitseerimismeetodite jaoks

Proovi minimaalne DNA põhikontsentratsioon on 11,2 ng/µl. Proovid < 11,2 ng/µl nurjavad tõenäolisemalt teegi kvaliteedikontrolli pärast sekveneerimist. Sõltuvalt DNA varude kontsentratsioonist kasutage arvutuste tegemiseks ühte järgmistest võrranditest.

1. DNA põhikontsentratsiooni 11,2 kuni 154,0 ng/µl puhul arvutage DNA varu maht ja vajaminev RSB, kasutades konstantina lahjendatud DNA kogumahtu 27,5 µl (25 µl pluss 10% ülejääk):
 - a. Arvutage DNA põhimaht:
 - b. Arvutage RSB põhimaht:

- c. Kontrollige arvutusi: Kinnitage arvutatud DNA põhimaht (μl) + arvutatud maht RSB (μl) = 27,5 μl , lahjendatud DNA kogumaht (konstant, 25 μl pluss 10% ülejääk).
2. Teise võimalusena arvutage DNA põhikontsentratsioonide puhul > 154,0 ng/ μl lahjendatud DNA kogumaht ja vajaminev RSB, kasutades DNA põhimahtu 2,0 μl , ning sihtlahjendatud DNA põhikontsentratsioon 11,2 ng/ μl konstantidena.
 - a. Arvutage lahjendatud DNA kogumaht:
 - b. Arvutage RSB maht:
 - c. Kontrollige arvutusi: Kinnitage lahjendatud DNA arvutatud kogumaht (μl) – arvutatud RSB maht (μl) = 2,0 μl , DNA põhimaht (konstant).

Jätkake 3. sammuga allpool.

2. võimalus: 350 ng DNA sisend täpse ülikõrge tundlikkuse kvantifitseerimismeetodi jaoks

Proovi minimaalne DNA põhikontsentratsioon on 14,0 ng/ μl . Proovid < 14,0 ng/ μl nurjavad suurema tõenäosusega teegi kvaliteedikontrolli pärast sekveneerimist. Sõltuvalt DNA varude kontsentratsioonist kasutage arvutuste tegemiseks ühte järgmistest võrranditest.

1. DNA põhikontsentratsiooni 14,0 kuni 192,5 ng/ μl puhul arvutage DNA põhimaht ja vajaminev RSB, kasutades konstandina lahjendatud DNA kogumahtu 27,5 μl (25 μl pluss 10% ülejääk):
 - a. Arvutage DNA põhimaht:
 - b. Arvutage RSB põhimaht:
 - c. Kontrollige arvutusi: Kinnitage arvutatud DNA põhimaht (μl) + arvutatud maht RSB (μl) = 27,5 μl , lahjendatud DNA kogumaht (konstant, 25 μl pluss 10% ülejääk).
2. Alternatiivselt arvutage DNA > 192,5 ng/ μl põhikontsentratsioonide puhul lahjendatud DNA kogumaht ja vajaminev RSB, kasutades konstandina DNA põhimahtu 2,0 μl .
 - a. Arvutage lahjendatud DNA kogumaht:
 - b. Arvutage RSB maht:
 - c. Kontrollige arvutusi: Kinnitage lahjendatud DNA arvutatud kogumaht (μl) – arvutatud RSB maht (μl) = 2,0 μl , DNA põhimaht (konstant).
3. Märgistage iga lahjendatud proovi jaoks uus 0,5 ml mikrotsentrifuugi katsuti.
4. Lisage eespool arvutatud RSB maht vastavasse katsutisse iga lahjendatud proovi kohta.
5. Lisage eespool arvutatud DNA kogumaht vastavasse katsutisse iga lahjendatud proovi kohta.
6. Impulss-segage keerisseguril ja tsentrifuugige seejärel lühidalt.

Teegi ettevalmistamine

Kasutage selles jaotises toodud ettevalmistusetappe reaktiivide ettevalmistamiseks.

Kui ohutut peatumiskohta pole määratud, jätkake kohe järgmise etapiga.

Ettevalmistamine

Valmistage ette järgmised kulutarvikud:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free) – Kasutage segamiseks keerissegurit. Mitme katsuti kasutamisel kasutage segamiseks keerissegurit ja seejärel kombineerige.
- TB1 (Tagmentation Buffer 1):
 - a. Kasutage segamiseks keerissegurit.
 - b. Tsentrifugeerige lühidalt.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
 - a. Kontrollige sademe suhtes. Sademe täheldamise korral kuumutage 37 °C juures 10 minutit ja segage seejärel keerisseguril, kuni sade lahustub.
 - b. Keeristage põhjalikult ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
- ELM (Extension Ligation Mix):
 - a. Segamiseks pöörake ümber. Ärge keeristage.
 - b. Hoida jääl kuni kasutamiseni.
- HP3 (2N NaOH):
 - a. Segage keerisseguril ja tsentrifugeerige seejärel lühidalt.
 - b. Hoidke toatemperatuuril.
- NB (Neutralization Buffer):
 - a. Segage keerisseguril ja tsentrifugeerige seejärel lühidalt.
 - b. Hoidke toatemperatuuril.
- CB (Cleanup Beads):
 - a. Keeristage 1 minut.
 - b. Pöörake 2–5 korda ümber ja seejärel keeristage põhjalikult resuspendeerimiseks.
- Indeksadapterid (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
 - a. Segage keerisseguril ja tsentrifugeerige seejärel lühidalt.
 - b. Hoidke toatemperatuuril.
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
 - a. Märgistage katsuti kork TWB2.
 - b. Pöörake segamiseks põhjalikult ümber.
- Mikrotsentrifuugi katsuti, mis on märgistatud kui 0,2N NaOH, kombineerige järgmised mahud 0,2N NaOH ettevalmistamiseks vastavalt kavandatud partii suurusele. Kasutage segamiseks keerissegurit.

MÄRKUS

Kui plaanite samal päeval teegid puulida ja denatureerida, valmistage ette täiendav 0,2N NaOH. Vt jaotist [Ettevalmistamine leheküljel 28](#).

Reaktiiv	6 proovi (µl)	12 proovi (µl)	16 proovi (µl)	18 proovi (µl)	22 proovi (µl)	24 proovi (µl)
HP3	30	60	80	90	110	120
RSB	270	540	720	810	990	1080

- Ühendage 15 ml koonilises katsutis järgmised mahud, et valmistada 80% EtOH vastavalt kavandatud partii suurusele. Lisatud on minimaalse kasutamise ülejääk. Kasutage segamiseks keerissegurit.

Reaktiiv	6 proovi (ml)	12 proovi (ml)	16 proovi (ml)	18 proovi (ml)	22 proovi (ml)	24 proovi (ml)
100% etanool, puhas (200 proof)	4	8	8	12	12	12
Nukleasivaba vesi	1	2	2	3	3	3



ETTEVAATUST!

See reaktiivide komplekt sisaldab potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Kandke kokkupuuteriskile vastavat kaitsevarustust, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit. Käsitsege kasutatud reaktiive keemiliste jäätmetena ja utiliseerige need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel. Täiendavat keskkonna-, tervise- ja ohutusteavet vaadake ohutuskaardilt (SDS) veebilehel support.illumina.com/sds.html.

Genoomilise DNA märgistamine

Selles etapis kasutatakse DNA märgistamiseks toodet Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF), mis fragmenteerib ja märgistab DNA adapterijärjestustega.

Kulutarvikud

- 96 süvendiga MIDI-plaat
- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free)
- Tagmentation Buffer 1 (TB1)
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2)

Protseduur

1. Veenduge, et mikroproovi inkubaator MIDI-plaadi sisestusega oleks eelkuumutatud temperatuurini 47 °C.
2. Märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat etiketiga LP1 (teegi plaat 1).
3. Määratlege ja salvestage proovisüvendi ID-d lahjendatud DNA-proovide ja reaktiivide märgistamiseks.
4. Kandke 25 µl lahjendatud proovi DNA-d igasse süvendisse.
5. Lisage igasse süvendisse 10 µl TB1.
6. Keeristage BLT-PF tugevalt 1 minut, et resuspendeerida. Ärge tsentrifugeerige. Vajadusel korrake.
7. Lisage igasse süvendisse 15 µl BLT-PF.
8. Sulgege plaat LP1 ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
9. Inkubeerige LP1 eelsoojendatud mikroproovide inkubaatoris 8 minutit temperatuuril 47 °C.

MÄRKUS Plaadil on oodata kergest kondenseerumist. Ärge tsentrifugeerige.

10. Eemaldage tihend ja lisage igasse süvendisse 10 µl ST2.
11. Sulgege ja raputage LP1 kiirusel 1800 p/min 1 minut, seejärel jätkake järgmise sammuga.

Märgistamisjärgne puhastus

Järgmised sammud loputavad lahti seondumata DNA ja vahetavad puhvrit, et valmistuda järgmiseks sammuks.

Kulutarvikud

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Kaev

Teave reaktiivide kohta

- Pipettige TWB2 aeglaselt, et vähendada vahutamist.
- RSB ja TWB2 on pakendatud sarnastesse katsutitesse. Enne kasutamist lugege hoolikalt iga silti.

Protseduur

1. Eemaldage tihend ja asetage plaat LP1 plaadi magnetilusele ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
2. Valmistage TWB2 kaev ette mahtudega vastavalt järgmisele tabelile ja märgistage kaev TWB2 selgelt. Mahud sisaldavad 1 ml ülejääki minimaalse tühimahu puhul. Hoidke kaevu hilisemateks sammudeks.

Reaktiiv	6 proovi (µl)	12 proovi (µl)	16 proovi (µl)	18 proovi (µl)	22 proovi (µl)	24 proovi (µl)
TWB2	3700	6400	8200	9100	10 900	11 800

3. Hoidke plaati LP1 magnetilusel ja eemaldage 60 µl seadistatud pipetiga kõigist süvenditest kogu supernatant, häirimata helmestepelletit, ning kõrvaldage see.

4. Kasutades mitmekanalilist pipetti, lisage igasse süvendisse 150 µl TWB2.
5. Sulgege plaat LP1 ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
6. Eemaldage tihend ja asetage plaat LP1 plaadi magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
7. Inkubatsiooni ajal pange BLT-PF tagasi külmutatud hoiule, seejärel jätkake järgmise sammuga.

Ligaadi indeksid

Selles jaotises lugeerivad kasutajad igale proovile unikaalsed kahe indeksiga adapterid vastavalt indekseerimisele, mis on kavandatud [Partii planeerimine ja kasutuse loomine leheküljel 15](#) ajal.

Kulutarvikud

- ELM (Extension Ligation Mix)
- Indeksadapterid (UDI PCR-Free (32 Indexes))
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2) kaev
- 0,2N NaOH (lahjendatud HP3)

Teave reaktiivide kohta

- Indeksplaadi süvendeid ei saa uuesti kasutada.
- Lahuse viskoossuse tõttu aspireerige ja doseerige ELM aeglaselt.
- RSB ja TWB2 on pakendatud sarnastesse katsutitesse. Enne kasutamist lugege hoolikalt iga silti.

Protseduur

1. Hoidke LP1 magnetalusel ja toimige järgmiselt.
 - a. Kasutades väärtusele 150 µl seatud pipetti, eemaldage ja visake ära kogu supernatant kõigist süvenditest.
 - b. Eemaldage 20 µl pipetiga kõigist proovisüvenditest jääk-TWB2, häirimata helmepelletit, ning kõrvaldage see.
 - c. Lisage 45 µl ELM igasse süvendisse.
 - d. Asetage indeksadapteri plaadi fooliumtihend iga kavandatud indeksisüvendi jaoks läbi P200 mitmekanalilise pipeti ja uute pipetiotsakute. Saastumise vältimiseks kasutage iga süvendi jaoks uut pipetiotsakut.
 - e. Lisage LP1 vastavatesse proovisüvenditesse 5 µl indeksadapterit vastavalt P-10 või P-20 mitmekanalilise pipetiga valitud indeksitele.
2. Sulgege plaat LP1 ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
3. Inkubeerige LP1 eelsoojendatud mikroproovide inkubaatoris 8 minutit temperatuuril 47 °C.

MÄRKUS Plaadil tihendil on oodata kergest kondenseerumist. Ärge tsentrifugeerige.

4. Inkubatsiooni ajal viige ELM tagasi külmutatud hoiule.
5. Eemaldage tihend ja asetage plaat LP1 plaadi magnetilusele ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
6. Hoidke LP1 plaati magnetilusel ja eemaldage tasemele 50 µl seatud mitmekanalise pipeti abil kõigist teegisüvenditest kogu supernatant, häirimata helmepelletit, ning kõrvaldage see.
7. Peske helmeid järgmiselt.
 - a. Lisage 150 µl TWB2 igas süvendis olevatele helmestele, kasutades mitmekanalilist pipetti.
 - b. Sulgege plaat LP1 ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
 - c. Eemaldage tihend ja asetage plaat LP1 plaadi magnetilusele ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
 - d. Hoidke plaati LP1 magnetilusel ja eemaldage tasemele 150 µl seatud mitmekanalise pipeti abil kõigist teegisüvenditest kogu supernatant, häirimata helmepelletit, ning kõrvaldage see.
8. Peske helmeid **teist** korda.
9. Kui magnetilusel on LP1, kasutage mitmekanalilist pipetti, mis on seatud väärtusele 20 µl, et eemaldada ja kõrvaldada igast süvendist jääk-TWB2, häirimata helmepelletit.
10. Lisage igasse süvendisse 45 µl eelnevalt ettevalmistatud 0,2N NaOH materjali.
11. Sulgege ja raputage LP1 kiirusel 1800 p/min 1 minut, seejärel jätkake järgmise jaotisega.

Suuruse valik ja puhastusteedid

Selles etapis kasutatakse kahepoolse suurusega teekide valikut. Esimeses etapis lisatakse Cleanup Beads elueeritud teekidele ja BLT-PF helmestele. Seejärel viiakse elueeritud üheaheelalist teeki sisaldav supernatant uude plaati, samas kui liiga suured fragmendid jäävad maha. Teises etapis lisatakse Cleanup Beads ülekantud teekidele ja eemaldatakse liiga väikesed fragmendid. Seejärel teegid elueeritakse ja kantakse lõplikule teegiplaadile (FLP).

Kulutarvikud

- 96 süvendiga MIDI-plaat
- Kaevud (3)
- PCR-plaat
- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Värskest valmistatud 80% etanool (80% EtOH)

Ettevalmistamine

1. Segage keerisseguril CB ning pöörake seejärel ümber, kuni toode on täielikult resuspendeeritud.
2. Valmistage CB kaev ette mahtudega vastavalt järgmisele tabelile ja märgistage kaev CB. Mahud on piisavad mõlemaks lisaetapiks ja sisaldavad kaevu 1 ml ülejääki, et tagada tühimaht. Täiendavate CB sammude vahel ei ole vaja segada. Helmed jäävad protseduuri ajaks hajutatuks.

Reaktiiv	6 proovi (μ l)	12 proovi (μ l)	16 proovi (μ l)	18 proovi (μ l)	22 proovi (μ l)	24 proovi (μ l)
CB	1480	1960	2280	2440	2760	2920

Protseduur

- Eemaldage tihend ja lisage 40 μ l LP1 MIDI-plaadi CB süvenditesse, mis sisaldavad BLT-PF ja 0,2N NaOH.
- Sulgege plaat LP1 ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
- Inkubeerige LP1 plaati magnetilisel plaadil 2 minutit toatemperatuuril.
- Eemaldage tihend ja asetage plaat LP1 plaadi magnetalusele ja oodake, kuni vedelik on selge (5 minutit).
- Plaadi inkubeerimise ajal märgistage uus 96 süvendiga MIDI-plaat LP2.
- Kandke* 80 μ l supernatanti LP1-st magnetalusel mitmekanalilise pipetiga LP2 vastavatesse süvenditesse.
- Lisage 40 μ l CB igasse LP2 MIDI-plaadi süvendisse.
- Sulgege plaat LP2 ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
- Visake LP1 MIDI-plaat ära.
- Inkubeerige LP2 plaati magnetalusel 2 minutit toatemperatuuril.
- Eemaldage plaat LP2 ning pange magnetalusele ja oodake, kuni vedelik on selge (5 minutit).
- Hoidke LP2 plaati magnetalusel ja eemaldage tasemele 120 μ l seatud mitmekanalise pipeti abil kõigist teegisüvenditest kogu supernatant, häirimata helmepelletit.
- Valage eelnevalt valmistatud 80% EtOH märgistatud karp ja peske magnetil LP2-ga helmeid järgmiselt.
 - Mitmekanalilise pipeti abil lisage 180 μ l 80% EtOH-d.
 - Oodake 30 sekundit.
 - Eemaldage tasemele 180 μ l seatud mitmekanalise pipeti abil kõigist proovisüvenditest kogu supernatant, häirimata helmepelletit.
- Peske helmeid **teist** korda.
- Kui magnetalusel on LP2, kasutage mitmekanalilist pipetti, mis on seatud väärtusele 20 μ l, et eemaldada ja kõrvaldada igast süvendist järelejäänud EtOH, häirimata helmepelletit.
- Kuivatage LP2 plaati 4 minutit magnetalusel õhu käes.
- Visake kasutamata 80% EtOH ja karp ära.
- Valmistage RSB kaev ette mahtudega vastavalt järgmisele tabelile ja märgistage kaev kui RSB. Mahud sisaldavad 1 ml ülejääki minimaalse tühimahu puhul.

Reaktiiv	6 proovi (μ l)	12 proovi (μ l)	16 proovi (μ l)	18 proovi (μ l)	22 proovi (μ l)	24 proovi (μ l)
RSB	1390	1780	2040	2170	2430	2560

- Lisage igas süvendis olevatele helmestele 65 μ l RSB.

20. Sulgege plaat LP2 ja raputage 1 minuti jooksul kiirusel 1800 p/min.
21. Inkubeerige plaati LP2 2 minutit toatemperatuuril.
22. Eemaldage tihend ja asetage LP2 magnetalusel ja oodake, kuni vedelik on selge (2 minutit).
23. Märgistage uus PCR-i plaat kui FLP (Lõppteegi plaat) ja lisage käituse loomisel kasutatud partii nimi.
24. *Kandke* mitmekanalise pipetiga 60 µl supernatanti LP2-st magnetalusel vastavasse FLP süvendisse.



ETTEVAATUST!

Supernatant sisaldab lõplikku teeki ja seda kasutatakse puulimise ja denatureerimise etapis. Ärge visake ära.

25. Visake kõik kaevud ära koos kaevudes olevate kasutamata reaktiividega.
26. Kõrvaldage LP2 MIDI-plaat.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral sulgege lõplikud teegiplaadid (FLP) mikrotihendiga B ja säilitage temperatuuril -25 °C kuni -15 °C kuni 14 päeva.

Teekide kogumisse lisamine ja denatureerimine

Selles jaotises loovad kasutajad [Partii planeerimine ja käituse loomine leheküljel 15](#) kavandatud puulid ning lahjendavad ja denatureerivad.

Kulutarvikud

- HP3 (2N NaOH) või 0,2N NaOH, kui see on samal päeval ette valmistatud – keeristage ja seejärel tsentrifugeerige lühidalt.
- NB (Neutralization Buffer) – Keeristage ja tsentrifugeerige seejärel lühidalt.
- RSB (Resuspension Buffer) – Keeristage või pöörake segamiseks ümber.
- Mikrotsentrifuugi katsutid (1 reaktiivi ettevalmistamiseks ja 1 iga planeeritud teegi puuli jaoks)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (PN 20062290 või PN 20062291) (1 katsuti iga planeeritud teegi puuli kohta)

Ettevalmistamine

1. Kombineerige 0,2N NaOH ettevalmistamiseks mikrotsentrifuugi katsutis järgmised mahud. Märgistage katsuti 0,2N NaOH. Kui teegi ettevalmistuse ajal valmistati ette lisa-0,2N NaOH ja protokoll viiakse läbi samal päeval, jätkake see samm vahele.

Väikeste pipettimisvigade vältimiseks valmistatakse ette lisamaht.

Reaktiiv	Iga S2 Flow Cell läbivooluküveti maht (µl)	Iga S4 Flow Cell läbivooluküveti maht (µl)
HP3	5	10

Reaktiiv	Iga S2 Flow Cell läbivooluküveti maht (µl)	Iga S4 Flow Cell läbivooluküveti maht (µl)
RSB	45	90

2. Segage keerisseguril ja tsentrifuugige seejärel lühidalt.

Protseduur

- Kui FLP-plaati hoiustati külmutatuna, valmistage see ette järgmiselt. Muul juhul liikuge 2. sammu juurde. FLP-plaat:
 - Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada.
 - Tsentrifuugige 1000 × g juures 1 minut.
 - Eemaldage tihend FLP-lt.
 - Pipettige segu 30 µl multikanalilise pipeti abil 5 kuni 10 korda.
 - Sulgege ja tsentrifuugige 1000 × g juures 1 minut.

- Valige üks järgmistest suvanditest, et puulida, denatureerida ja lahjendada teeke iga sekveneerimiseks kavandatud 6 või 16 proovi komplekti kohta.

Valik 1 Järjestage 6 teeki S2 läbivooluküvetil.

- Märgistage iga teegi puuli jaoks uus mikrotsentrifuugi katsuti, millel on kogumi nimi, näiteks ühendatud teegid (PL) 1, 2, 3 jne.
- Eemaldage tihend ja kandke 25 µl igat DNA teeki antud S2 indeksikomplektist FLP-plaadilt PL-katsutisse iga vastava kavandatud käituse jaoks vastavalt [Partii planeerimine ja käituse loomine leheküljel 15](#) ajal kavandatud sekveneerimispuulidele. Näiteks ühendage S2 indeksikomplektiga 1 ettevalmistatud teegid PL-katsutisse.
- Pange FLP plaadile adhesiivne plaaditihend ja pange plaat tagasi hoiule.
- Lisage igasse PL-katsutisse 37 µl 0,2N NaOH.
- Keeristage igat PL-katsutit segamiseks. Tsentrifuugige lühidalt.
- Inkubeerige PL-plaate 8 minutit toatemperatuuril.
- Lisage igasse PL-katsutisse 38 µl NB.
- Keeristage igat PL-katsutit segamiseks. Tsentrifuugige lühidalt.
- Kandke 225 µl denatureeritud lahjendatud teeki puhtasse NovaSeq 6000Dx teegikatsutisse.



ETTEVAATUST!

Kui see on eelnevalt määratletud, kasutatakse kavandatava käituse tuvastamiseks ja seostamiseks NovaSeq 6000Dx teegikatsuti ID-d. Veenduge, et teegikatsuti ID, kuhu puul üle kantakse, on sama teegikatsuti ID, mis on määratletud jaotises Create Run (Käituse loomine), muidu võib tekkida proovitulemuste vale seostamine. Kui plaanipärasel käitusel on määratud teegikatsuti ID, veenduge, et kasutatakse õiget katsutit. Kui seda pole eelnevalt määratud, registreerige kasutatud teegikatsuti ID ja vaadake kavandatud käitus üle, vastasel juhul tuleb seadme laadimisel käituse nime kasutades valida seotud kavandatud käitus(ed) käsitsi.

Valik 2 Järjestage 16 teeki S4 läbivooluküvetil.

- a. Märgistage uus mikrotsentrifuugi katsuti, millel on puuli nimi, näiteks puulitud teegid (PL) 1, 2, 3 jne.
- b. Eemaldage tihend ja kandke 18 µl igat DNA teeki FLP-plaadilt PL-katsutisse vastavalt [Partii planeerimine ja käituse loomine leheküljel 15](#) ajal kavandatud sekveneerimispuulidele. Näiteks ühendage teegid, kasutades S4 indeksikomplekti 1, PL-katsutisse.
- c. Pange FLP plaadile adhesiivne plaaditihend ja pange plaat tagasi hoiule.
- d. Lisage PL-katsutisse 22 µl RSB.
- e. Lisage PL-katsutisse 77 µl 0,2N NaOH.
- f. Keeristage PL-katsutit segamiseks. Tsentrifuugige lühidalt.
- g. Inkubeerige PL-katsutit 8 minutit toatemperatuuril.
- h. Lisage PL-katsutisse 78 µl NB puhvrit.
- i. Keeristage PL-katsutit segamiseks. Tsentrifuugige lühidalt.
- j. Kandke 465 µl denatureeritud lahjendatud teeki puhtasse NovaSeq 6000Dx teegikatsutisse.



ETTEVAATUST!

Kui see on eelnevalt määratletud, kasutatakse kavandatava käituse tuvastamiseks ja seostamiseks NovaSeq 6000Dx teegikatsuti ID-d. Veenduge, et teegikatsuti ID, kuhu puul üle kantakse, on sama teegikatsuti ID, mis on määratletud jaotises Create Run (Käituse loomine), muidu võib tekkida proovitulemuste vale seostamine. Kui plaanipärasel käitusel on määratud teegikatsuti ID, veenduge, et kasutatakse õiget katsutit. Kui seda pole eelnevalt määratud, registreerige kasutatud teegikatsuti ID ja vaadake kavandatud käitus üle, vastasel juhul tuleb seadme laadimisel käituse nime kasutades valida seotud kavandatud käitus(ed) käsitsi.

3. Jätkake otse sekveneerimisega, kui plaanite alustada käitust samal päeval.

OHUTU PEATUMISKOHT

Peatumise korral sulgege NovaSeq 6000Dx teegikatsuti ja hoidke seda kuni 30 päeva temperatuuril -25 °C kuni -15 °C.

Ettevalmistamine sekveneerimiseks

1. Järgige NovaSeq 6000Dx Instrument tootedokumentatsioon (dokument # 200010105) sekveneerimiseks kavandatud komplekti kulutarvikute ettevalmistusjuhiseid.
2. Kui NovaSeq 6000Dx puulitud teegiga katsutit hoiti külmutatuna, valmistage ette järgmiselt. Kui alustate otse eelmisest jaotisest, liikuge [3](#).
 - a. Laske 30 minutit toatemperatuuril sulada.
 - b. Eemaldage kork ja pipettige õrnalt viis korda, kasutades P1000 pipetti, mis on seatud 300 µl-le S4 läbivooluküveti teegi basseini jaoks, või P200 pipetti, mis on seatud väärtusele 145 µl S2 läbivooluküveti teegi puuli jaoks.

- c. Sulgege NovaSeq 6000Dx teegikatsuti ja raputage tilgad käsitsi põhja. Ärge keeristage ega tsentrifuge.
3. Kulutarvikute laadimine Lisateavet vt NovaSeq 6000Dx Instrument tootedokumentatsioon (dokument # 200010105).

Tulemuste tõlgendamine

TruSight Whole Genome on mõeldud inimese kogu genoomi sekveneerimiseks. Variante esitatakse proovide puhul, mis läbivad analüütilisi kvaliteedikontrolle (QC) kasutamiseks allavoolu kolmanda taseme analüüsi iduliinirakendustega.

- Sekveneerimise, FASTQ või proovi kvaliteedi tulemust loetakse kehtivaks ainult siis, kui kvaliteedimõõdik vastab määratud spetsifikatsioonile või ületab seda. Kui kvaliteedimõõdik on allpool määratletud spetsifikatsiooni, esitatakse toimivus kui NURJUMINE ja proovi tuleb korrata. Teavet proovi kehtivuse määramiseks kasutatavate kvaliteedimõõdikute spetsifikatsioonide kohta vt jaotisest [Kvaliteedikontrollid leheküljel 31](#).
- Proovid, mis läbivad kõik kvaliteediläved, eeldavad täpsusuuringus kirjeldatud variantide nimetamise toimivust (vt [Täpsus leheküljel 41](#)).
- Väikesed variandid on annoteeritud kõrge, keskmise või madala kindlusega, mis põhineb iga variandi tüübi eeldataval toimivusel (vt jaotist [Väikeste variantide usaldusastme määramine leheküljel 37](#)).
- Kogu variandi teabe tõlgendamise peab labori poolt valideerima esitatud analüüsi väljundfailide abil. Analüüsi TruSight Whole Genome Analysis Application Guide rakendusjuhend (dokument nr 200049931) väljundfailides esitatud teabe kirjeldust vt.

Kvaliteedikontrollid

Sekveneerimiskäitus ja proovi kehtivus määratakse automaatselt analüütiliste kontrollide abil ja need teatab TruSight Whole Genome Analysis Application (vt [Tabel 8](#) lisateavet kvaliteedikontrolli mõõdikute kohta). TruSight Whole Genome ei nõua väliste positiivsete kontrollide kasutamist.

- QC (kvaliteedikontrolli) tulemused esitatakse konsolideeritud aruandes kõigi käituse proovide kohta ja eraldi proovi kvaliteedikontrolli aruannetes. Aruanded väljastatakse tarkvara poolt analüüsikausta. Analüüsikausta asukohta (sisaldab PDF- ja JSON-aruandeid) ja käituse kausta leiate jaotisest Analüüsi TruSight Whole Genome Analysis Application Guide rakendusjuhend (dokument nr 200049931).
- Sekveneerimiskäituse kvaliteedikontrolli spetsifikatsiooni ebaõnnestumine muudab sekveneerimiskäituse kehtetuks ja peatab edasise analüüsi.
- Mis tahes proovi FASTQ või teegi spetsifikatsiooni ebaõnnestumine muudab prooviteegi kehtetuks ja takistab seotud CRAM- või VCF-failide väljastamist.
- Vastavalt kohalikele, piirkondlikele ja/või riiklikele määrustele või akrediteerimisnõuetele võib olla vajalik läbi viia täiendavaid kvaliteedikontrolli toiminguid.

Lisateavet sekveneerimiskäituste või teekide analüüside kordamise kohta vt jaotisest [Tõrkeotsing leheküljel 68](#).

Tabel 8 TruSight Whole Genome Kvaliteedikontrolli mõõdikute spetsifikatsioonide kirjeldused

	Mõõdik	Spetsifikatsioon	Kirjeldus
Sekveneerimiskäituse kvaliteedikontroll	Kokku % \geq Q30	≥ 85	Aluse kvaliteedi mõõtmine käituse tasemel. Minimaalsed spetsifikatsioonid on määratud, kuna liiga madalad %Q30 käitused ei läbi Q30 aluseid prooviteegi kvaliteedikontrollis.
FASTQ kvaliteedikontroll	Saagis proovi kohta (bps)	$\geq 90\,000\,000\,000$	Minimaalne on ~26x keskmine autosoomne katvus kolme prooviga, mis ei läbi teegi kvaliteedikontrolli analüüsiaja vähendamiseks.

	Mõõdik	Spetsifikatsioon	Kirjeldus
Prooviteegi kvaliteedikontroll	Keskmine autosoomne katvus	≥ 35	Keskmine katvus üle autosoomide. Analüüsi toimivuse tagamiseks on seatud minimaalne näit.
	Üle 20-kordse katvusega autosoomide protsent	$\geq 93,94$	Kaetuse ühtsuse mõõtmine, mis tuvastab probleemid, mis ei pruugi olla seotud GC kallutatusega. Analüüsi toimivuse tagamiseks on seatud minimaalne näit.
	Normaliseeritud katvus 60% kuni 79% GC bini	$0,82 \leq x \leq 1,13$	Kaetuse ühtsuse mõõtmine, mis tuvastab GC kallutatuse, täpsemalt katvuse kao genoomi piirkondades, kus on suurem %GC ja madalam %AT aluskoostis. Analüüsi toimivuse tagamiseks on seatud minimaalne ja maksimaalne näit.
	Normaliseeritud katvus 20% kuni 39% GC bini	$0,97 \leq x \leq 1,06$	Kaetuse ühtsuse mõõtmine, mis tuvastab GC kallutatuse, täpsemalt katvuse kao genoomi piirkondades, kus on madalam %GC ja kõrgem %AT aluskoostis. Analüüsi toimivuse tagamiseks on seatud minimaalne ja maksimaalne näit.
	Keskmine mitokondriaalne katvus	≥ 500	Mitokondriaalse kromosoomi katvus. Minimaalsed spetsifikatsioonid on seatud selleks, et tagada mitokondriaalse SNV tuvastuspiir.
	Q30 aluste protsent	≥ 85	Aluskvaliteedi mõõtmine. Analüüsi toimivuse tagamiseks on seatud minimaalne näit.
	Hinnanguline proovi saastumine	$\leq 0,005$	Tuvastab teiste proovide saastavad lugemid. Maksimaalse spetsifikatsiooni eesmärk on tagada mitokondriaalse SNV tuvastuspiir (saastumistundlikkusega variandi tüüp).

Toimivusnäitajad

Järgmised valideerimisuuringud viidi läbi [Kasutusjuhised leheküljel 15](#) kirjeldatud TruSight Whole Genome töövoos abil ning need on kavandatud tagama analüüsi vastupidavust tavaliste variatsiooniallikate suhtes ja andma soovitud järjepidevaks toimimiseks. Nendes uuringutes kasutati analüütilise kvaliteedikontrolli spetsifikatsioone, mis on esitatud dokumendis [Tabel 8](#), analüüsi eduka tulemuslikkuse võrdlusalusena ja eeldusena analüütilise variandi määramise tulemuslikkuse kindlaksmääramiseks.

Ristsaastumine

Ristsaastumise uuring viidi läbi hindamaks, kas analüüsiga ilmneb prooviteegi valmistamise käigus süvenditevahelisest saastumisest ja järjestikuste sekveneerimiskäituste korral analüüsivahelisest saastumisest tingitud valetulemusi. Ristsaastumise hindamiseks kasutati 24 vereproovi. Kaks operaatorit valmistasid kokku 24 teeki, kasutades S2 konfiguratsiooniindeksi komplekte 1–4, ja puuliti teeki sekveneeriti indeksikomplekti järjekorras ühel seadmel NovaSeq 6000Dx Instrument. Kaks operaatorit valmistasid kokku 16 teeki, kasutades S4 konfiguratsiooniindeksi komplekte 1 ja 2 kahes replikaadis, ja vahelduvate indeksikomplektidega puulitud teeki sekveneeriti samal seadmel NovaSeq 6000Dx.

Ristsaastumise hindamiseks võrreldi õigeid indeksi lugemeid külgnevate süvendite indeksi lugemitega süvenditevahelise saastumise kohta ja eelneva sekveneerimiskäitusega käitustevahelise saastumise kohta. Käituseelse saastumise määr oli $\leq 0,003178\%$ S2 puhul ja $\leq 0,002487\%$ S4 käituste puhul. Proovidevahelise saastumise hindamiseks kasutati prooviteegi kvaliteedikontrolli mõõdikut hinnangulise proovi saastumise kohta. Proovidevahelise saastumise määr oli 0,001, mis on analüüsitarkvara väikseim teatatud väärtus. Need tulemused näitavad, et teegi ettevalmistuse ja sekveneerimise töövoos on saastumise oht väike.

Kasutusaegne ja vaheline stabiilsus

Teekide ettevalmistuse reaktiivse hinnati komplekti kasutamise ajal stabiilsuse suhtes, sealhulgas mitu külmutamise ja sulatamise sündmust ning avatud katsuti stabiilsust.

Külmsulamistsükli testimiseks viidi külmutatud komponentidele läbi viis külmutus-sulatamise sündmust, et toetada ühte lahtipakkimist ja nelja komplekti kasutamise sündmust. Kasutamise stabiilsuse tagamiseks eemaldati kuue prooviteegi ettevalmistamiseks vajalik maht igas kolmes külmutamise ja sulatamise tsüklis, et simuleerida kasutamise ajal mahu ammendumist, ja komponente hoiti enne testimist veel 31 päeva. Kuuest veredoonorist ekstraheeritud gDNA-ga testimisel läbisid kõik andmed analüüsi analüütilise kontrolli mõõdikud. Need tulemused näitavad, et külmutatud teegi ettevalmistusreaktiive võib kasutada kuni nelja külmutus-sulatustsükli vältel ja 30-päevase seadmesisese stabiilsusega.

Vahelmist stabiilsust hinnati üksikute teekide ning puulitud ja denatureeritud teekide puhul. Kõik andmed läbisid analüüsi analüütilised kontrollmõõdikud, mis näitasid kuni 14-päevast stabiilsust üksikute teekide puhul ja kuni 30-päevast stabiilsust puulitud ja denatureeritud teekide puhul külmutatuna (-25 °C kuni -15 °C), nagu on kirjeldatud ohututes peatumispunktides.

Vereproovide kogumine ja hoiustamine

Verekogumiskatsuti ühilduvust ja proovide hoiustamist uuriti neljalt doonorilt ja kolmelt tarnijalt saadud EDTA kogumiskatsutitesse võetud verega. Genoomne DNA (gDNA) ekstraheeriti igal saabumisel nullajaks ja seejärel uuesti pärast seda, kui verd hoiti 16, 33 ja 43 päeva temperatuuril 2 °C kuni 8 °C. Ekstraheeritud gDNA-d hoiustati külmutatuna (-25 °C kuni -15 °C) elueerimispuhvis (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) ning seejärel kvantifitseeriti ja kasutati teegi valmistamiseks ja sekveneerimiseks. Kõik andmed läbisid analüüsi analüütilise kontrolli mõõdikud, mis näitasid analüüsi ühilduvust kolme erineva EDTA verekogumiskatsutiga, ja verd, mida hoiti kuni viis nädalat temperatuuril 2 °C kuni 8 °C.

DNA ekstraheerimismeetodi hindamine

Analüüsi toimivuse hindamiseks hinnati kolme müügilolevat ekstraheerimiskomplekti. Kaks komplekti kasutasid magnethelmeid, üks tahke faasiga ja teine ilma, ja tselluloosipõhist seondumist ja üks komplekt kasutas ränidioksiidi membraanil põhinevat nukleiinhapete puhastamise meetodit segamiskolonnidega ([Tabel 9](#)).

Hindamise viis läbi kaks operaatorit, kellel oli üks ekstraheerimisreaktiivide partii meetodi kohta, ja täisverd, mis koguti neljalt eeldatavalt tervelt doonorilt EDTA katsutitesse. Iga vereproov ekstraheeriti neljal korral vastavalt tootja juhistele mittejärjestikustel päevadel 16 koguvaatluse jaoks komplekti kohta. Ekstraheeritud gDNA-d kasutati teekide ettevalmistamiseks sekveneerimiseks ja analüüsimiseks.

Iga ekstraheerimismeetodi kõik vaatlused (16/16) läbisid analüüsi analüütilise kontrolli mõõdikud. Proovi gDNA ekstraheerimismeetodi valik ei mõjutanud analüüsi toimivust. Analüütilise täpsuse ja reprodutseeritavuse uuringutes kasutati gDNA-d, mis ekstraheeriti komplektiga 3 (ränidioksiidi filtri kolonnisoldeerimine segamiskolonniga).

Tabel 9 TruSight Whole Genome jõudluse suhtes testitud ekstraheerimismeetodid

Komplekt	Ekstraheerimise meetod
1	Magnethelmeste ekstraheerimine tahke faasiga, pöörduv immobilisatsioon (SPRI)
2	Magnethelmeste ekstraheerimine mobiilse tahke faasi ja tselluloosipõhise sidumisega
3	Ränidioksiidifiltri kolonnisolatsioon segamiskolonniga

DNA sisendi tundlikkus

Proovi analüüsimiseks soovitatav gDNA sisendi kogus on 280 ng või 350 ng, sõltuvalt DNA kvantifitseerimise meetoditest, mis on loetletud [DNA sisendi soovitud leheküljel 10](#).

Toimivuse määramiseks gDNA sisendkontsentratsioonide vahemikus testiti analüüsis kasutatud DNA kogust tasemetel, mis olid $\pm 28,6\%$ soovitatavast sisendist. Tulemused näitasid, et -25% soovitatavast gDNA sisendist on analüüsi alumine piir. Analüüs toimib asjakohaselt gDNA sisendiga kuni $+28,6\%$ soovitatavast sisendist.

Kolme erineva kvantifitseerimismeetodi iseloomustamine näitas, et erinevatel meetoditel on erinev varieeruvus ja need võivad anda erinevaid tulemusi. Kui kasutate muud meetodit kui need, mis on loetletud [DNA sisendi soovitud leheküljel 10](#), võib olla vajalik optimeerida siht-gDNA sisendit. Soovitatav on konkreetse teegi

ettevalmistuspartii ja sekveneerimiskäituse jaoks ette nähtud proovide gDNA kvantifitseerida koos, et võimaluse korral kõrvaldada partiidevaheline varieeruvus, või kasutada protsessi kontrole, et tagada $\leq 25\%$ gDNA kvantifitseerimise partiidevaheline varieeruvus.

Segavad ained

Selles uuringus hinnati toimivust nii endogeensete kui ka eksogeensete ainetega, mis olid seotud inimese vere ja verekogumiskatsutitega. Bilirubiin, hemoglobiin ja triglütseriidid valiti hindamiseks vastavalt ikteeriliste, hemolüüsitud ja lipeemiliste proovide simuleerimiseks. Biotiin ja EDTA valiti hindamiseks vere ja verekogumiskatsutite (BCT) olemasolu tõttu ning võimaliku mõju tõttu analüüsi keemiale. Aineid lisati doonori vereproovidesse enne ekstraheerimist kas vahetult või pärast lahustis lahustamist. Testi kontsentratsioon ja iga aine lisandi üksikasjad on toodud järgmises tabelis.

Tabel 10 Segavad ained, mida on testitud TruSight Whole Genome toimivuse suhtes

Aine	Analüüsitav kontsentratsioon	Rikastatud lahuses kasutatav lahusti	Verele lisatud lahuse %
Bilirubiin (konjugeerimata)	40 mg/dl (0,4 mg/ml) ¹	DMSO	4%
Hemoglobiin	1000 mg/dl (10 mg/ml) ¹	N/A – veres lahustunud	N/A – veres lahustunud
Triglütseriidid	1500 mg/dl (15 mg/ml) ¹	100% etanool	4%
Biotiin	0,00351 mg/ml ²	Vesi	4%
EDTA	5,4 mg/ml ²	Vesi	3%

¹ Kontsentratsioonid valiti kõrgeimateks täheldatud kontsentratsioonideks vastavalt dokumendile „Lisatabelid segavate mõjude testimiseks kliinilises keemias, CLSI EP37-ED1:2018“.

² Kontsentratsioon valiti kolmekordseks „Kõrgeimaks ravimikontsentratsiooniks terapeutilise ravi ajal“, mis on märgitud dokumendis „Lisatabelid segavate mõjude testimiseks kliinilises keemias“, CLSI EP37-ED1:2018.

³ Kontsentratsioon valiti EDTA kontsentratsiooni põhjal, mis varieerub verekogumiskatsutites vahemikus kuni 1,8 mg/ml ja simuleerib lühikese täitumise korral vereproovi võtmist 33% nominaalsest BCT mahust, mille tulemuseks on 3x kõrgem EDTA kontsentratsioon veres, mis vastab 5,4 mg/ml-le.

Testimisel kasutati nelja doonori verd. Iga segava aine puhul lisati segava ainega iga doonori täisvere alikvoot ja seejärel jagati nelja gDNA ekstraheerimise replikaadi vahel. Kontrolli töödeldi sarnaselt ainete lisamata. Paaristatud analüüsi- ja kontrolltingimusi töödeldi iga doonori puhul sama ekstraheerimissündmuse ajal ning ekstraheeritud gDNA-d töödeldi seejärel ühe teegi ettevalmistus- ja sekveneerimissündmusega. Analüüsi toimivust ei mõjutanud ega leidnud tõendeid segavate mõjude kohta mis tahes testitud ainetele.

Proovi indekseerimise samaväärsus

TruSight Whole Genome pakub valikut neljast 6-kordsest indeksikomplektist S2 kätuste jaoks või kahest 16-kordsest indeksikomplektist S4 sekveneerimiskäituse konfiguratsioonide jaoks. Analüüs andis samaväärse jõudluse, kui teete sekveneeritakse sekveneerimiskäituse NovaSeq 6000Dx S2 või S4 konfiguratsioonides. Lisaks näidati, et nii S2 kui ka S4 käituse konfiguratsioonid saavutavad > 95% prooviteekidest vähemalt 35,0-kordse katvusega, kui testiti ettenähtud indeksikomplektidega. Seega saab S2 ja S4 läbivooluküvetite sekveneerimiseks kasutatavaid erinevaid indeksikomplekte ja liitmist kasutada vaheldumisi, et tagada skaleeritavus, et mahutada proovi läbilaskevõime kõikumisi ja võimaldada paindlikkust laboriprotsessides.

Analüütiline toimivus

Esiõlgse iseloomustamisuuringud viidi läbi, et määrata väikeste variantide usaldustaseme läved, mitokondriaalsete SNV-de avastamiskiir ja suuruslaved STR-paisumiste täpseks tuvastamiseks TruSight Whole Genome töövoos kasutamisel. Analüüsi täpsuse ja korratavuse, sealhulgas laborisisese täpsust ja välise reprodutseeritavuse hindamisel kasutati proove, mis esindasid TruSight Whole Genome hinnatud variantiklasse. Sekveneerimistsükli ja proovide analüütilist toimivust teavitatakse kõigist kvaliteedikontrollidest, välja arvatud loodud seguproovid mitokondriaalsete SNV-de hindamiseks tuvastuspiiril või selle lähedal, mis saastemõõtmisel ebaõnnestusid. Iga uuringu tulemusi on kirjeldatud allpool toodud jaotistes.

Esmased iseloomustamisuuringud

Väikeste variantide usaldusastme määramine

Selles uuringus koolitati logistilist regressioonimudelit hästi reprodutseeritavate ja halvasti reprodutseeritavate variantide saite jaoks 96-st NA12878 replikaadist, et määrata kõrge, keskmise ja madala usaldustasemega läved.

Konkreetsed variandi tüübi kõrge usaldusväärsuse alused on need, kus prognoositav laborisisene reprodutseeritavus vastab antud skoori lävele või ületab 99% ja sellele kriteeriumile vastavate mitte-N aluste protsent ületab 30%. Kui väikese variandi tüübil ei ole nendele kriteeriumidele vastavat skoori läve, ei ole sellel variandi tüübil kõrget usaldustaset. Vahepealsed usaldusalused on need, kus prognoositav laborisisene reprodutseeritavus vastab antud skoori lävele ja variandi tüübi puhul 95%-le või ületab seda. Madala usaldusväärsuse alused on need, kus prognoositav laborisisene reprodutseeritavus on antud skoori lävele ja variandi tüübi puhul alla 95%. Variant nõuab kindlat tüüpi varianti, millel on kõrge või vahepealne usaldustase, enamik mitte-N alustest (st välja arvatud lüngad) (vt tabelit 6) ja näitab kõrget jõudlust, kui seda hinnatakse väikeste variantide tõeste kompleksite suhtes ja NA12878 replikaatide laialdasel hindamisel laborisisese täpsuse suhtes.

Variandi tüüp	Usaldustase	mitte-N aluste %
SNV	Kõrge	89,14%
	Vahelmine	3,30%
	Madal	7,56%
Lühikesed deletsioonid (1–5 bp)	Kõrge	90,88%
	Vahelmine	2,45%
	Madal	6,67%
Keskised deletsioonid (6–15 bp)	Vahelmine	86,94%
	Madal	13,06%
Pikad deletsioonid (≥ 16 bp)	Vahelmine	85,42%
	Madal	14,58%
Lühikesed sisestused (1–5 bp)	Kõrge	88,94%
	Vahelmine	4,61%
	Madal	6,45%
Keskised sisestused (6–15 bp)	Vahelmine	89,37%
	Madal	10,63%
Pikad sisestused (≥ 16 bp)	Vahelmine	48,92%
	Madal	50,63%

Mitokondriaalse SNV tühja proovi piir / tuvastuspiir

Tühja proovi (LoB) ja tuvastuspiiri (LoD) uuringud viidi läbi mitokondriaalsete SNV-dega. Mitokondriaalse SNV uuringu puhul hinnati LoB-d, kasutades lookuseid, millel teadaolevalt ei ole varianti (st võrdlusnimetust). LoD on määratletud kui mtDNA SNV variandi alleelisagedus, mille puhul selle variandi tuvastusmäär on 95%.

LoB ja LoD määramiseks heteroplasmaatiliste mtSNV-de tuvastamiseks segati tiitrimisuuringus põhjalikult iseloomustatud kahe erineva veredoonori gDNA proovid viiele lahjendustasemele 20 replikaadiga lahjendustaseme kohta. Lahjendustasemed olid mõeldud mtSNV variandi protsentide (1,2–6% VAF) sihtimiseks, et jäljendada mitokondriaalse heteroplasma erinevaid tasemeid. Segatud gDNA-proove töödeldi ja lugemeid analüüsiti alla, et saavutada 500-kordne keskmine mitokondriaalne katvus. Järgnevas hindamises kasutati kokku 42 loodud heteroplasmaatilist saiti. Kasutati regressioonanalüüsi, et hinnata vajalikke segamissuhteid mtSNV-de alamhulga 1x LoD ja 2x LoD sihtmärgiks.

Positsioone, kus mõlema vereproovi gDNA-l on võrdlusalleeli genotüübid, hinnati mtSNV nimetuste suhtes, mis läbisid mitteviidatava alleeliga filtri. Valepositiivsete tulemuste määr arvutati 0,8% võrra vastavalt null-LoB eeldusele vastavalt dokumendile „Kliiniliste laborite mõõtmisprotseduuride avastamisvõime hindamine, CLSI EP17-A2-ED1:2012“. Kõiki 42 positsiooni analüüsiti iseseisvalt probiti regressiooni abil. LoD väärtus määratleti kui eeldatav VAF-väärtus, mis vastab 95% (C95) tuvastusmäärale. Üldine teatatud LoD väärtus, mis oli

määratletud kui tõestest paikadest pärit LoD väärtuste 95. protsentiil, oli 4,75% VAF. Kõigi vaatluste puhul arvutati absoluutsete erinevuste jaotuse keskmine täheldatud ja eeldatava VAF vahel 0,83%-ks ülemise 95% usalduspiiriga 0,86% VAF.

STR-i ekspansioonipiiri määramine

Sekvenerimislugemi pikkust (~135 bp) ületavate STR-ide ulatuste tehniliste piirangute tõttu on täheldatud STR-i pikkus TruSight Whole Genome sageli tõelise pikkuse alahinnang. Kui tõeline STR-i pikkus ületab fragmendi mediaanpikkuse (~330 bp), siis on STR-i pikkus hinnanguline platoo. Sel põhjusel hindab TruSight Whole Genome sihitud lookuste kogumit, mille puhul analüüs võib täpselt diskrimineerida täheldatud pikkustega STR-e normaalse variatiivsuse piires nendest, mille pikkused on suuremad kui eeldatavalt terves populatsioonis (laiendatud) täheldatud (vt [Tabel 2](#) lookuste loendit, mida hindab TruSight Whole Genome).

Tagamaks negatiivse protsendi kokkulangevuse (NPA) 95% kõigis STR-i saitides, mida hindab TruSight Whole Genome, määrati lookusepõhised läved laiendatud STR-i nimetamiseks selles kohas, et saavutada keskmiselt 99,94% NPA koha kohta. Selleks, et võtta arvesse STR-i suuruse hinnangute loomupärast varieeruvust eeldatavalt terve populatsiooni piires, määrati lävendid sõltumatult täheldatud STR-i pikkuste jaotumise põhjal eeldatavalt terves 1000 Genomes Projecti andmekogumis (2504 proovi erinevatest populatsioonidest, mida töödeldi DRAGEN 3.7.5 ja ExpansionHunter 4.0.2 abil).⁴

1000 Genomes Projecti andmekogumiga määratud lävendite kinnitamiseks töödeldi TruSight Whole Genome-s 16 rakuliini võrdlusproovist (Center for Disease Control's Genetic Testing Reference Material (Get-RM) Program) mitmesuguste sõltumatult hinnatud STR-i suurustega saadud gDNA-d. 10 teegi replikaati iga 16 proovi kohta valmistati ette ja testiti kuue operaatori poolt kokku 960 vaatluse jaoks ning STR-i suurust hinnati sõltumatult iga replikaadi kohta. Täheldatud proovitaseme valepositiivsete määr kõigis sihtmärgiks olevates lookustes oli 0,35%.

Tuvastamispiiri (LoD) hinnati 28 sihitud STR-i lookuse puhul, mille testitud rakuliinid põhinevad TruSight Whole Genome abil kindlaks tehtud alleelisuurustel ja eeldatavatel alleelisuurustel eelneva sõltumatu iseloomustamise alusel ([Tabel 11](#)). Valitud lookuste puhul määrati tuvastuspiir rohkem kui ühe STR-i jaoks samas kohas, kokku 35 STR-i jaoks. LoD on hinnanguline suurus, mille juures eeldatav STR-i ekspansioon tuvastatakse 95% alleelide puhul probit-mudeli põhjal, millel on kinnitatud lävend normaalsete ja laiendatud STR-i suuruste eristamiseks. Kõigi teadaolevate alleelisuurustega kohtade andmed puuliti kokku, et saada LoD hinnangud iga saidi kohta laiendatud STR-i kohaspetsiifilise läve põhjal. FMR1 korduse pikkust alahinnati süstemaatiliselt võrreldes teiste STR-idega ja LoD õigeaks hindamiseks oli vaja kohandatud mudelit.

Laiendatud STR-ide kinnitatud kohaspetsiifilised lävendid, sihitud kohtade hinnanguline eeldatav ja täheldatud LoD ning sihtSTR-i saitide olemasoleva kirjanduse põhjal (ainult illustratiivsel eesmärgil) haiguse lävi on esitatud [Tabel 11](#). STR-i paisumiste puhul, mis on pikemad kui lugemi pikkuse määratud lävi ja mille eeldatavat pikkust ei saa otseselt jälgida, on täheldatud pikkus ligikaudu keskmine pikkus, mida täheldatakse mitme sekvenerimiskäituse ajal. STR-i laienduste puhul, mis on lühemad kui lugemi pikkuse järgi määratud lävi, on eeldatavad ja täheldatud pikkused samad.

Tabel 11 TruSight Whole Genome Sihtmärgitud STR-kohtade hinnangulise avastamisvõime kokkuvõte

Sihtlookus ^a	Laiendatud STR-i lävi (bp), mis põhineb 1000 Genomes Projecti andmekogumil	Hinnanguline LoD (eeldatav pikkus, bp)	Hinnanguline LoD (tähelestatud pikkus, bp)	Haiguse lävi (tegelik pikkus, bp) ^b
AFF2	168	266	221	600 ⁵
AR	114	115	115	114 ⁶
ATN1	90	92	92	135 ^{7,8}
ATXN1	114	115	115	114 ^{7,8}
ATXN10	200	298	233	3995 ^{7,8}
ATXN2	102	102	102	105 ^{7,8}
ATXN3	135	189	182	180 ^{7,8}
ATXN7	60	60	60	111 ^{7,8}
ATXN7_GCC	93	101	101	Ei kohaldu
ATXN8OS	200	298	233	237 ^{7,8}
ATXN8OS_CTA	90	92	92	Ei kohaldu
C9ORF72 ^c	200	298	233	360 ^{9,10}
CACNA1A	57	57	57	60 ^{7,8}
CBL	171	281	227	243 ⁵
CNBP	192	308	237	300 ^{5,11}
CNBP_CA	102	102	102	Ei kohaldu
CNBP_CAGA	68	80	80	Ei kohaldu
CSTB	200	298	233	348 ^{12,13}
DIP2B	200	298	233	Ei kohaldu
DMPK	122	132	142	150 ¹⁴
FMR1	175	433	212	600 ^{d,15}
FXN	102	102	102	198 ^{6,16}
FXN_A	200	298	233	Ei kohaldu
GLS	111	115	115	270 ¹⁷
HTT	108	115	115	120 ¹⁸
HTT_CCG	42	42	42	Ei kohaldu
JPH3	99	101	101	123 ¹⁹

Sihtlookus ^a	Laiendatud STR-i lävi (bp), mis põhineb 1000 Genomes Projecti andmekogumil	Hinnanguline LoD (eeldatav pikkus, bp)	Hinnanguline LoD (tähelestatud pikkus, bp)	Haiguse lävi (tegelik pikkus, bp) ^b
NIPA1	33	33	33	Ei kohaldu
NOP56	84	84	84	3900 ^{20,21}
NOP56_CGCCTG	24	24	24	Ei kohaldu
NOTCH2NL	129	175	174	213 ^{22,23}
PABPN1	27	27	27	Ei kohaldu
PHOX2B	60	60	60	75 ^{5,24}
PPP2R2B	87	90	90	198 ^{7,8}
TBP	129	175	174	135 ^{7,8}

^a Vahelduvate STR-idega lookuseid märgib LOCI_<ALTERNATE_REPEAT> (nt ATXN7_GCC).

^b Illustreerival eesmärgil esitatud haiguse läved põhinevad ainult avaldatud kirjandusel; N/A (ei ole kohaldatav) selles veerus näitab, et STR ei pruugi olla seotud avaldatud patogeense ekspansiooniga.

^c 100% NA23378 replikaatidest tuvastas STR-i ekspansiooni C9ORF72-s, viidates selles proovis varem iseloomustamata ekspansioonile selles kohas. See rakuliini proov jäeti analüüsist välja.

^d Vahepealsed ekspansioonid võivad olla seotud ka fenotüübiga.

See uuring näitas STR-i suuruse hinnangute sarnaseid täppis- ja täpsusprofiile erinevates sihitud asukohtades, kusjuures STR-i ekspansioonide tuvastuspiiri juhib suures osas valitud lävi (põhineb suuruse jaotusel 1000 Genomes Projecti populatsioonis), mitte tuvastamisvõime erinevused uuringukeskustes. Kõik eeldatavas pikkuseskaalas hinnangulised LoD väärtused olid suuremad kui eeldatavalt tervetes populatsioonides ja madalamad kui paljud avaldatud haiguse läved, muutes sellega seotud STR-i ekspansiooni nimetamisläved kasulikuks korduse tähistamiseks konkreetsetes lookuses potentsiaalselt laienenud kujul. Siin esitatud lävesid kasutati STR-i ekspansiooni tuvastustäpsuse hindamiseks.

Täpsus

Analüütiline täpsus määrati TruSight Whole Genome variantide nimetuste võrdlemisel alternatiivsete meetodite abil saadud tulemustega. Võrdlusmeetodid valiti märkimisväärse erinevuse alusel võrreldes TruSight Whole Genome-ga, mis kasutab Nextera™ helmestega seotud teegi ettevalmistamist, 2-värvilist sekveneerimiskeemiat seadmel NovaSeq 6000Dx ja DRAGEN 3.9.5 variantide nimetamiseks. Tüüpiline lähenemine TruSight Whole Genome valideerimisele viidi läbi proovidega, mis esindasid variante kõigis analüüsi väljundis sisalduvates variandiklassides. Täpsuse hindamiseks kasutati kokku 459 unikaalset proovi, mis läbisid analüütilise kvaliteedikontrolli TruSight Whole Genome. Proove testiti kolmes teegi ettevalmistuse reaktiivide ja kulutarvikute partiis, neljas S4 sekveneerimiskomplekti partiis, kaheksa operaatoriga, viies NovaSeq 6000Dx Instrument-s ja kahes sisemises laboris. Valmistati ette ja sekveneeriti 31 sõltumatut teegi puuli.

Tabelis on toodud täpsusuuringutes arvatud mõõdikute definitsioonid.

Mõiste	Definitsioon
Madalam usaldustase (LCL)	Ühepoolne 95% madalam usalduspiir Wilsoni meetodiga.
Negatiivne protsentuaalne kokkulangevus (NPA) ¹	Negatiivsete saitide protsent, nagu on määratletud võrdlusmeetodiga, mis TruSight Whole Genome-ga kokkulangevalt tuvastati kui negatiivsed.
Positiivsete protsentuaalne kokkulangevus (PPA) ²	Võrdlusmeetodis kutsutud variantide protsent, mida nimetatakse kokkulangevalt TruSight Whole Genome-ga.
Tehniline positiive ennustusväärtus (TPPV) ³	TruSight Whole Genome nimetatud võrdlusmeetodiga kokkulangevate variantide protsent.

¹ STR ekspansiooni tuvastamise täpsuse ja SMN1 alleeli tuvastamise täpsuse jaoks NPA = tõene negatiivne / (tõeselt negatiivne + valepositiivne).

² STR ekspansiooni tuvastamise täpsuse ja SMN1 alleeli tuvastamise täpsuse jaoks PPA = tõene positiivne / (tõeselt positiivne + valenegatiivne).

³ STR ekspansiooni tuvastamise täpsuse ja SMN1 alleeli tuvastamise täpsuse jaoks TPPV = tõene positiivne / (tõeselt positiivne + valepositiivne).

Väikeste variantide täpsus

Väikeste variantide nimetamise täpsust hinnati, kasutades perifeersest täisverest ekstraheeritud genoomset DNA-d, mis sisaldas 195 eeldatavalt tervet doonorit. TruSight Whole Genome variantide nimetusi võrreldi võrdlusmeetodina Illumina Laboratory Services (ILS) CLIA laboris tehtud kliiniliselt valideeritud täisgenoomi sekveneerimistesti variantide nimetustega. Võrdlusmeetodiga kogu genoomi sekveneerimise töövoog kasutab ligeerimispõhist TruSeq™ PCR-i vaba teegi ettevalmistamist, 4-värvilist sekveneerimiskeemiat sekveneerimissüsteemis HiSeq™ Sequencing System ja DRAGEN 3.8.4 variantide nimetamiseks. Selles uuringus ei iseloomustatud insertioone ja deletsioone suurusega > 31 bp, kuna neid ei olnud võrdlusmeetodiga kinnitatud.

Kõigi väikeste variantide nimetuste täpsuse kokkuvõtte on esitatud [Tabel 12-s](#) ja [Tabel 13-s](#).

Tabel 12 TruSight Whole Genome Assay Täpsus väikeste variantide puhul, mida on stratifitseeritud usaldusastme ja suurusega (eeldatavalt terved vereproovid)

Variandi alamtüüp	Usaldustase	Võrdlusmeetodiga kokkulangetavad nimetused	Üksnes võrdlusmeetodiga saadud nimetused	Analüüsiga kokkulangetavad nimetused	Üksnes analüüsiga saadud nimetused	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV-d	Kõrge	261 728 580	1 573 877	261 603 149	208 639	99,4% (99,4%)	99,9% (99,9%)
	Vahelmine	6 677 589	421 718	6 519 811	151 128	94,1% (94,0%)	97,7% (97,7%)
	Madal	6 864 840	3 251 709	6 649 756	2 151 388	67,9% (67,8%)	75,6% (75,5%)
Lühike deletsioon (1–5 bp)	Kõrge	11 978 745	201 783	12 246 922	67 277	98,3% (98,3%)	99,5% (99,5%)
	Vahelmine	2 875 258	45 290	3 050 170	47 593	98,4% (98,4%)	98,5% (98,5%)
	Madal	1 802 544	228 582	1 966 974	221 449	88,7% (88,7%)	89,9% (89,8%)
Keskmine deletsioon (6–15 bp)	Vahelmine	858 673	20 079	860 493	18 361	97,7% (97,7%)	97,9% (97,9%)
	Madal	145 618	28 300	157 398	41 824	83,7% (83,6%)	79,0% (78,9%)
Pikk deletsioon (16–31 bp)	Vahelmine	344 168	14 334	336 976	31 165	96,0% (95,9%)	91,5% (91,5%)
	Madal	54 444	23 438	53 835	47 272	69,9% (69,6%)	53,2% (53,0%)
Lühike insertioon (1–5 bp)	Kõrge	11 212 366	164 651	11 380 307	49 776	98,6% (98,5%)	99,6% (99,6%)
	Vahelmine	1 015 324	41 890	988 512	36 051	96,0% (96,0%)	96,5% (96,5%)
	Madal	639 663	198 700	576 797	180 458	76,3% (76,2%)	76,2% (76,1%)

Variandi alamtüüp	Usaldustase	Võrdlusmeetodiga kokkulangevad nimetused	Üksnes võrdlusmeetodiga saadud nimetused	Analüüsiga kokkulangevad nimetused	Üksnes analüüsiga saadud nimetused	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Keskmine insertioon (6–15 bp)	Vahelmine	790 968	18 163	798 572	17 111	97,8%, (97,7%)	97,9% (97,9%)
	Madal	76 105	24 188	88 389	35 819	75,9% (75,7%)	71,2% (71,0%)
Pikk insertioon (16–31 bp)	Vahelmine	159 927	3 135	159 432	8 639	98,1% (98,0%)	94,9% (94,8%)
	Madal	102 552	22 199	103 892	55 724	82,2% (82,0%)	65,1% (64,9%)

Tabel 13 Usaldustaseme järgi stratifitseeritud TruSight Whole Genome NPA väikeste variantide nimetuste kokkuvõte

Usaldustase	Kokkulangevad negatiivsed nimetused	Referentsmeetod Eksklusiivsed negatiivsed nimetused	NPA (LCL)
Kõrge	202 276 243 790	127 465 816	99,9% (99,9%)
Vahelmine	3 307 740 675	77 650 177	97,7% (97,7%)
Madal	3 653 569 580	439 038 662	89,3% (89,3%)

Täiendav täpsusuuring viidi läbi, et hinnata väikeste variantide tuvastamist kaubanduslikult saadaolevate referentsrakuliini DNA proovidega (Coriell Institute for Medical Research) hästi iseloomustatud nimetuste komplektidega, mis on loodud Genome in a Bottle (GIAB) konsortsiumi poolt. Selles uuringus kasutati võrdlusmeetodina GIAB nimetuste komplekte. Nendes proovides määratud toetuskomplekt hõlmab insertioone ja deletsioone, mis on suuremad kui 31 bp, nii et sellesse hindamisse lisati suuremad insertioonid ja deletsioonid. Need proovid hõlmasid HG001-005 ja NA24695, mille tulemused olid agregeeritud [Tabel 14](#)-s.

Tabel 14 TruSight Whole Genome Assay Täpsus väikeste variantide puhul, mis on stratifitseeritud usaldustaseme ja suuruse järgi (hästi eristuvad rakuliini proovid)

Variandi alamtüüp	Usaldustase	GIAB-iga kokkulan-gevad nimetused	Üksnes GIAB-iga saadud nimetused	Analüüsiga kokkulan-gevad nimetused	Üksnes analüüsiga saadud nimetused	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV-d	Kõrge	21 431 369	2 552	21 439 303	3 954	>99,9% (> 99,9%)	>99,9% (> 99,9%)
	Vahelmine	908 172	1 259	910 058	2 175	99,9% (99,9%)	99,8% (99,8%)
	Madal	720 717	59 691	722 180	28 721	92,4% (92,3%)	96,2% (96,1%)
Lühike deletsioon (1–5 bp)	Kõrge	1 080 383	690	1 090 370	730	99,9% (99,9%)	99,9% (99,9%)
	Vahelmine	423 547	788	437 019	606	99,8% (99,8%)	99,9% (99,9%)
	Madal	263 828	2 624	281 217	2 088	99,0% (99,0%)	99,3% (99,2%)
Keskmise deletsioon (6–15 bp)	Vahelmine	142 671	238	144 997	167	99,8% (99,8%)	99,9% (99,9%)
	Madal	86 174	812	91 710	546	99,1% (99,0%)	99,4% (99,4%)
Pikk deletsioon (≥ 16 bp)	Vahelmine	34 414	315	34 580	55	99,1% (99,0%)	99,8% (99,8%)
	Madal	9 985	393	10 212	106	96,2% (95,9%)	99,0% (98,8%)
Lühike insertioon (1–5 bp)	Kõrge	927 288	221	925 787	271	>99,9% (> 99,9%)	>99,9% (> 99,9%)
	Vahelmine	158 346	294	137 081	250	99,8% (99,8%)	99,8% (99,8%)
	Madal	93 857	2 402	75 687	1 427	97,5% (97,4%)	98,1% (98,1%)

Variandi alamtüüp	Usaldustase	GIAB-iga kokkulan-gevad nimetused	Üksnes GIAB-iga saadud nimetused	Analüüsiga kokkulan-gevad nimetused	Üksnes analüüsiga saadud nimetused	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Keskmine insertioon (6–15 bp)	Vahelmine	91 117	116	89 054	60	99,9% (99,9%)	99,9% (99,9%)
	Madal	37 925	745	36 670	406	98,1% (98,0%)	98,9% (98,8%)
Pikk insertioon (≥ 16 bp)	Vahelmine	11 081	46	11 110	17	99,6% (99,5%)	99,8% (99,8%)
	Madal	14 086	607	14 312	262	95,9% (95,6%)	98,2% (98,0%)

Koopia numbri variandi täpsus

CNV helistamise täpsust hinnati sama võrdlusmeetodiga ja eeldatavalt tervete veredoonori proovidega (195), mida kasutati väikeste variantide nimetamise täpsuse hindamiseks. Iga CNV loetakse nimetuskomplektis tuvastatud CNV-ks, kui vähemalt 50% sellest CNV-st on kaetud sama tüüpi CNV-nimetustega (KASU/KAOTUS) vastavas nimetusekomplektis. TruSight Whole Genome määratleb genoomsete piirkondade komplekti, mis jäetakse CNV-kõnedest välja, tuginedes 1000 genoomile ja 77 eeldatavalt terve veredoonori proovide andmete hindamisele, kasutades katvuse sügavusnäitajatega seotud mõõdikuid, katvuse kõrvalekaldeid ja lünki, hõlmates kindlakstehtud genoomi piirkondi, mis ei ole CNV-le raporteeritavad. CNV-kõnesid hinnati ainult genoomipiirkondades, mis olid ühised nii võrdlusmeetodi kui ka TruSight Whole Genome-ga. Kõigi CNV kõnede täpsuse kokkuvõtte on esitatud [Tabel 15-s](#) ja [Tabel 16-s](#).

Tabel 15 TruSight Whole Genome Assay Täpsus CNV-de jaoks, mis on piiritletud suuruse ja tüübi järgi

Suurus	Tüüp	Võrdlusmee- todiga kokkulan- gevad nimetused	Üksnes võrdlusmee- todiga saadud nimetused	Analüüsiga kokkulan- gevad nimetused	Üksnes analüüsiga saadud nimetused	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
10–25 kbp	VÕIMENDUS	443	98	342	56	81,89% (79,01%)	85,93% (82,82%)
	KADU	4 162	457	4 155	679	90,11% (89,36%)	85,95% (85,11%)
25–50 kbp	VÕIMENDUS	355	117	370	76	75,21% (71,81%)	82,96% (79,83%)
	KADU	1 587	16	1 622	7	99,00% (98,50%)	99,57% (99,21%)

Suurus	Tüüp	Võrdlusmeetodiga kokkulangevad nimetused	Üksnes võrdlusmeetodiga saadud nimetused	Analüüsiga kokkulangevad nimetused	Üksnes analüüsiga saadud nimetused	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
50–100 kbp	VÕIMENDUS	228	0	187	20	>99,99% (98,83%)	90,34% (86,42%)
	KADU	723	5	697	6	99,31% (98,60%)	99,15% (98,36%)
≥ 100 kbp	VÕIMENDUS	371	1	335	5	99,73% (98,80%)	98,53% (97,01%)
	KADU	541	23	569	1	95,92% (94,32%)	99,82% (99,22%)
Üldine (kõik CNV-d ≥ 10 kbp)	VÕIMENDUS	1 397	216	1 234	157	86,61% (85,15%)	88,71% (87,24%)
	KADU	7 013	501	7 043	693	93,33% (92,84%)	91,04% (90,49%)

Tabel 16 CNV nimetuste TruSight Whole Genome NPA kokkuvõte

Suurus	Tüüp	Kokkulangevad negatiivsed nimetused	Üksnes võrdlusmeetodiga saadud negatiivsed nimetused	Üksnes analüüsiga saadud nimetused	NPA (LCL)
Üldine (kõik CNV-d ≥ 10 kbp)	VÕIMENDUS	548 478 033 220	5 701 311	6 400 382	> 99,99% (> 99,99%)
	KADU	548 591 794 675	11 719 913	8 543 877	> 99,99% (> 99,99%)

Homosügootsuse käituse täpsus

ROH-i nimetuste tehnilist positiivset ennustavat väärtust (TPPV) hinnati sama võrdlusmeetodiga ja eeldatavalt tervete veredoonori proovidega (195), mida kasutati väikese variandi ja CNV täpsuse hindamisel. ROH-sündmused määrati kindlaks genoomi piirkondade tuvastamisega, mis sisaldasid homosügootsete SNV-nimetuste järjestust, millel puuduvad heterosügootsed SNV-d või pikad lüngad ilma variantideta. Seejärel

laiendati selliseid seemnepiirkondi vasakule ja paremale ning hinnati ümbritsevate homosügootsete kõnede või heterosügootsete SNV-de olemasolu. TruSight Whole Genome-ga tuvastatud ROH sündmusi võrreldi võrdlusmeetodi SNV kõnedega. ROH kõnede TPPV kokkuvõtte on esitatud Tabel 17-s.

Tabel 17 TruSight Whole Genome ROH sündmuste täpsus, mis on stratifitseeritud suuruse järgi

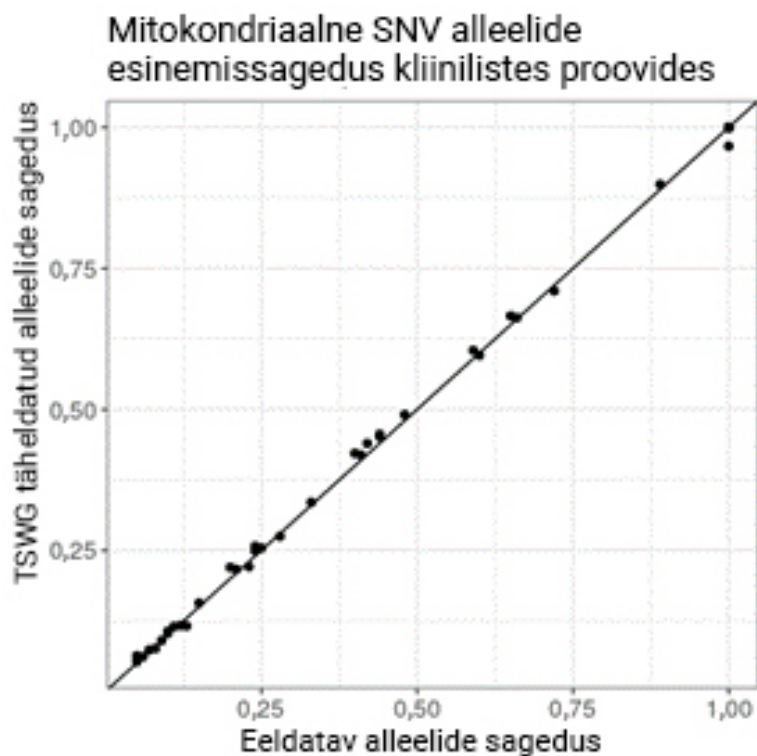
Suurus	TPPV keskmine	TPPV LCL
10–25 kbp	81,44%	80,77%
25–50 kbp	82,14%	81,82%
50–100 kbp	81,77%	81,55%
100–500 kbp	82,19%	81,98%
≥ 10 kbp	82,07%	81,94%
≥ 500 kbp	85,47%	84,66%

ROH tuvastamise positiivne ühilduvusprotsent (PPA) määrati väliselt hangitud kliiniliste proovidega, võrreldes TruSight Whole Genome nimetusi ROH nimetustega ortogonaalsete meetodite, sh kromosomaalse mikromatriksi ja PCR-i põhise hindamise põhjal. ROH sündmus loeti tuvastatavaks, kui vähemalt 50% piirkonnast, mis ortogonaalse meetodiga ROH-na teatati, kattus ROH sündmuste ühendusega, mida nimetas TruSight Whole Genome. Kõikide eeldatavate ROH juhtumite korral oli TruSight Whole Genome Assay ja ortogonaalsete meetodite vaheline PPA 34/34 (100%) (≥ 4 Mb).

Heteroplasmaatilise mitokondriaalse SNV täpsus

MtSNV kutsumise täpsust hinnati 41 varem välistest uuringukeskustest hangitud kliinilises proovis. Iga kliiniline proov sisaldas varem teatatud mtSNV-d määratletud kohas ja kindlaksmääratud heteroplasmaatilise astmega, mis põhines mtDNA sihitud kangeroplasmaatilise analüüsil (MITOP). Hinnanguliselt olid TruSight Whole Genome alleelisagedused väga korrelatsioonis eeldatavate sagedustega, nagu ennustas MITOP. Tuvastati kõik eeldatavad mtDNA SNV-d, mille tulemuseks oli PPA 100% (41/41).

Joonis 3 TruSight Whole Genome vaadeldud mitokondriaalse SNV alleeli sagedused vs. eeldatavad alleeli sagedused



Täiendav mtSNV täpsuse uuring viidi läbi samade 195 vereproovi ja võrdlusmeetodiga, mida on kirjeldatud väikese variandi ja CNV täpsuse uuringutes. Negatiivne võrdluskomplekt määratleti kui kindlad mittevariatiivsed nimetused (PASS-filter) ja positiivne referentskomplekt määratleti kui mtSNV nimetused alleelisagedusega > 2,5%. Välja jäeti kohad, millel oli kas mitteläbipääsetav filter või mitte-SNV variandi nimetus. MtSNV-de täpsuse kokkuvõte on esitatud Tabel 18-s.

Tabel 18 TruSight Whole Genome mtDNA SNV nimetuste täpsus

Täpsuse mõõdikud	Võrdlusmeetodiga vastav positiivne	Üksnes võrdlusmeetodiga saadud positiivne	Üksnes analüüsiga saadud positiivne	Võrdlusmeetodile vastav negatiivne	Üksnes võrdlusmeetodiga saadud negatiivne	Üksnes analüüsiga saadud negatiivne	Täpsuse mõõdiku väärtus (LCL)
PPA	6875	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99% (99,96%)
TPPV	6875	Ei kohaldu	6	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	99,91% (99,83%)
NPA	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	3 171 049	24 268	20 564	99,24% (99,23%)

STR ekspansiooni tuvastamise täpsus

STR-i ekspansiooni tuvastamise täpsus põhines 160 koguproovil, mis valmistati ette gDNA ekstraheerimise teel kliiniliselt mõjutatud isikutelt, kelle laienemised spetsiifilistes laborites olid kinnitatud PCR-i / Repeat-Primed (RP)-PCR-i või Southern Blotiga, mis viidi läbi CLIA laborikeskkonnas. Punktis [Tabel 11](#) määratud lävesid kasutati alleeli STR staatuse määratlemiseks kindlas lookuses normaalsetena (hinnanguline STR suurus lävest väiksem või sellega võrdne) või laiendatud (lävest suurem).

PPA arvutati ainult kliiniliselt kinnitatud proovidega, NPA arvutati ainult individuaalsete eeldatavalt tervete vereproovidega ja TPPV arvutati mõlemas proovirühmas. Alleelide puhul, kus kliiniliselt kinnitatud proov polnud saadaval, ei saanud PPA-d arvutada. Lisaks ei olnud võimalik arvutada TPPV-d alleelide puhul, kus kliiniliselt kinnitatud proov ei olnud saadaval ja valepositiivseid vasteid ei olnud. NPA arvutati kõigi STR-i ekspansioonide kohta. Konkreetse STR-i laienduse ja täpsuse mõõdikute suhtes analüüsitud kliiniliste proovide arv on esitatud [Tabel 19](#).

Tabel 19 TruSight Whole Genome Täpsuse mõõdikud STR-i ekspansioonide jaoks

STR-i ekspansioon	Testitud kliinilised proovid	PPA	TPPV	NPA
AFF2	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
AR	8	>99,99%	>99,99%	>99,99%
ATN1	4	>99,99%	>99,99%	>99,99%
ATXN1	7	66,67%	>99,99%	>99,99%
ATXN10	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
ATXN2	5	80,00%	>99,99%	>99,99%
ATXN3	9	>99,99%	90,00%	99,74%
ATXN7	2	>99,99%	>99,99%	>99,99%
ATXN7_GCC	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
ATXN8OS	0	Ei kohaldu	0,00%	99,74%
ATXN8OS_CTA	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
C9ORF72	21	>99,99%	>99,99%	>99,99%
CACNA1A	5	>99,99%	83,33%	99,74%
CBL	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
CNBP	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
CNBP_CA	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
CNBP_CAGA	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
CSTB	0	Ei kohaldu	0,00%	99,74%
DIP2B	0	Ei kohaldu	0,00%	99,74%
DMPK	42	>99,99%	>99,99%	>99,99%

STR-i ekspansioon	Testitud kliinilised proovid	PPA	TPPV	NPA
FMR1	47	>99,9%	>99,99%	>99,99%
FXN	0	Ei kohaldu	0,00%	99,74%
FXN_A	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
GLS	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
HTT	10	>99,99%	83,33%	99,49%
HTT_CCG	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
JPH3	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
NIPA1	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
NOP56	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
NOP56_CGCCTG	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
NOTCH2NL	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
PABPN1	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
PHOX2B	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
PPP2R2B	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
TBP	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
ALL	160	98,12%	92,35%	99,94%

STR-i ekspansiooni tuvastuse üldise PPA hindamine kõigis lookustes kujutab endast lookusespetsiifilise PPA head lähendamist, kasutades saadaolevaid kliinilisi proove. PPA hindamine konkreetselt FMR1 lookuse jaoks võib olla lookuse PPA alumine piir, mida ei olnud otseselt profileeritud selle suure läve tõttu STR-i suuruse kõrvalekallete jaoks.

SMN1 alleelituvastuse täpsus

C-alleeli puudumise tuvastamise täpsust SMN1-s (NM_000344.3:c.840C) hinnati 26 kliinilises proovis, mis saadi spinaalse lihastroofia (SMA) diagnoosiga ja eksoni 7 homosügootse kaotusega SMN1-s, mida kinnitas digitaalne tilga PCR või mIPA. SMN1 c.840C alleeli olemasolu tuvastamise täpsust hinnati eeldatavalt tervete isikute vereproovidega. Igale proovile määrati üks statistiline mõõdik (tõeselt positiivne (TP), valepositiivne (FP), valenegatiivne (FN) või tõene negatiivne (TN)), mis põhines C-alleeli tuvastatud esinemisel (negatiivne SMA staatus) või puudumisel (positiivne SMA staatus) SMN1 geeni c.840 positsioonil võrreldes eeldatava olekuga. PPA, TPPV ja NPA hinnangud tehti nii positiivse kui ka negatiivse proovikogumi kohta (vt Tabel 20).

Tabel 20 Täpsuse mõõdikud SMN1 c.840C alleelide puudumise tuvastamiseks

Täpsuse mõõdikud	TP	VP	TN	VN	Täpsuse mõõdiku väärtus
PPA	26	Ei kohaldu	Ei kohaldu	0	>99,99%

Täpsuse mõõdikud	TP	VP	TN	VN	Täpsuse mõõdiku väärtus
TPPV	26	0	Ei kohaldu	Ei kohaldu	>99,99%
NPA	Ei kohaldu	0	195	Ei kohaldu	>99,99%

Korratavus

Laborisisene täpsus

Laboratoorset täpsust hinnati ekstraheeritud gDNA abil, kasutades genoomis mitmesuguseid teadaolevaid variante. Nende hulka kuulusid mtSNV-d LoD lähedal ja sellest kõrgemal, SMN1 c.840C alleeli sisaldavad proovid ning FMR ja HTT1 korduvad laiendused LoD-ga lähedasel ja sellest kõrgemal tasemel. Proove testiti üheksas eripärasel tingimuses, mis olid loodud kolme operaatori, kolme teegi ettevalmistusreaktiivi partii, kolme sekveneerimise kulutarvikute partii ja kolme sekveneerimisseadmega.

Igat proovi analüüsiti sama käituse duplikaadina, et hinnata analüüsisest varieeruvust, ja igat testimisjuhtu testiti kaks korda kahe tingimuse kohta, et määrata tsüklitevaheline varieeruvus. Iga proovi hinnati 36 tähelepanekut kasutades ja disain andis korratavuse hindamiseks 18-kraadise lõtku. Paneeli liikmete, proovitüübi ja hinnatud variantide loend iga paneeliliikme kohta on näidatud Tabel 21-s. Proovikomplekti mitmekesisuse huvides pärinesid proovid 1–4 ja 9–12 pärinesid Euroopa, Aafrika ja Aasia päritolu meestelt ja naistelt.

Tabel 21 proovide koostis paneelis, mida kasutatakse laborisiseses täpsusuuringus

Paneel	Proovi nr	Proovi tüüp	Variandid
A	1	Verest ekstraheeritud gDNA	Väikesed variandid, CNV, ROH, STR laienemata, SMN1 c.840C olemasolu
	2	Verest ekstraheeritud gDNA	Väikesed variandid, CNV, ROH, STR laienemata, SMN1 c.840C olemasolu
	3	Verest ekstraheeritud gDNA	Väikesed variandid, CNV, ROH, STR laienemata, SMN1 c.840C olemasolu
	4	Verest ekstraheeritud gDNA	Väikesed variandid, CNV, ROH, STR laienemata, SMN1 c.840C olemasolu
	5	Verest saadud gDNA segu	Mitokondriaalsed SNV-d madalal LoD tasemel
	6	Loodud rakuliin NA20241 ¹	STR laienes FMR1 lookustes madalal LoD tasemel
	7	Loodud rakuliin NA20208	STR laienes HTT-lookustes madalal LoD tasemel
	8	Loodud rakuliin NA23686	SMN1 c.840C puudumine

Paneel	Proovi nr	Proovi tüüp	Variandid
B	9	Verest ekstraheeritud gDNA	Väikesed variandid, CNV, ROH, STR laienemata, SMN1 c.840C olemasolu
	10	Verest ekstraheeritud gDNA	Väikesed variandid, CNV, ROH, STR laienemata, SMN1 c.840C olemasolu
	11	Verest ekstraheeritud gDNA	Väikesed variandid, CNV, ROH, STR laienemata, SMN1 c.840C olemasolu
	12	Verest ekstraheeritud gDNA	Väikesed variandid, CNV, ROH, STR laienemata, SMN1 c.840C olemasolu
	13	Verest saadud gDNA segu	mtSNV-d kõrgel LoD tasemel
	14	Loodud rakuliin NA07862	STR laienes FMR1 lookustes kõrgel LoD tasemel
	15	Loodud rakuliin NA20253	STR laienes HTT lookustes kõrgel LoD tasemel
	16	Loodud rakuliin NA03814	SMN1 c.840C puudumine

Kõrge LoD tase: Variantide alleelisagedus on ligikaudu 2,0–4,0x LoD.

Madal LoD tase: Variantide alleelisagedus on ligikaudu 1,0–1,5x LoD.

¹ NA20241 tulemusi lõpparvuna ei teatud, kuna see oli märkimisväärselt alla 1,0x LoD ja seega ei vastanud proovi nõuetele.

Kvalitatiivsel hindamisel esitatakse reprodutseeritavuse mõõdikud, mis käsitlevad variante kvalitatiivsete üksustena (variant olemas või variant puudub). Iga variantitüübi kohta hinnati ja esitati positiivseid või negatiivseid nimetusi ning erinevaid kvalitatiivseid mõõdikuid (Tabel 22). Väikevariantide, CNV-de ja ROH-nimetuste reprodutseeritavuse hindamisel kasutati iga proovi puhul karakteriseerimise käigus tehtud variantide nimetusi, mis olid võrdluspunktiks kõigi teiste selle proovi korduste puhul uuringus.

Tabel 22 Iga variandi tüübi kvalitatiivse reprodutseeritavuse hindamise kokkuvõte

Variandi tüüp	Positiivne	Negatiivne	Võrdluse tüüp	Kvalitatiivsed mõõdikud
Väikesed variandid	Filtreid läbivate variantide nimetused	Filtreid läbivate homotsügootide võrdlusnimetused	Kooskõla algsete iseloomustamistsükli nimetuskomplektidega	Keskmine positiivne kokkulepe (APA) ja keskmine negatiivne kokkulepe (ANA)

Variandi tüüp	Positiivne	Negatiivne	Võrdluse tüüp	Kvalitatiivsed mõõdikud
CNV-d	Filtreid läbivad CNV nimetused	Genoomilised positsioonid, mis ei kattu läbiva koopianumbri variandi nimetusega	Kooskõla algsete iseloomustamistsüklite nimetuskomplektidega	APA ja ANA
ROH	ROH nimetus	Genoomilised positsioonid ei kattu ROH nimetusega	Kooskõla algsete iseloomustamistsüklite nimetuskomplektidega	APA ja ANA
STR-i ekspansioon	Proov STR-i ekspansiooniga vähemalt ühes sihitud lookuses	Proov ilma ekspansioonita mis tahes sihitud lookuses	Vastavus proovi olekule, mis on määratletud proovi iseloomustamisega ortogonaalse analüüsiga	Positiivsete vastete protsent (PPC) ja negatiivsete vastete protsent (PNC)
SMN1 c.840C tuvastus	Proov ilma C-alleelita c.840 SMN1 positsiooni juures (SMA-positiivne)	Proov, mis sisaldab vähemalt ühte C-alleeli koopiat SMN1 (SMA-negatiivne) c.840 positsioonil	Vastavus proovi olekule, mis on määratletud proovi iseloomustamisega ortogonaalse analüüsiga	PPC ja PNC
mtSNV	Filtreid läbivad mitokondriaalsed SNV nimetused	Filtreid läbiv mittevariantne asukoht mitokondriaalses kromosoomis	Kooskõla lahjendamata proovides tehtud variandi ja mittevariantsete nimetustega	PPC ja PNC

Erinevate varianditüüpide kvantitatiivne hindamine hõlmas kas kvantitatiivsete mõõdikute varieeruvuse hindamist, mis toetas kvalitatiivseid nimetusi, või väikeste variantide puhul leppe mõõdikuid võrdlusnimetuskogumi suhtes. Käesolevas uuringus hinnati nii kvantitatiivsete näitajate kogu varieeruvust korduste lõikes kui ka uuringusse kaasatud erinevate tegurite panust selliste kvantitatiivsete näitajate varieeruvusse variatsioonikomponentide analüüsi abil. [Tabel 23](#) võtab kokku iga varianditüübi analüüsis kasutatud kvantitatiivsed mõõdikud ja tegurid, mida hinnati kvantitatiivse mõõdiku varieeruvuse panusena.

Tabel 23 Varianditüüpide erinevuse täpsuse hindamisel kasutatud kvantitatiivsete mõõdikute kokkuvõte

Variandi tüüp	Kvantitatiivsed mõõdikud	Variatiivsusele kaasa aitavad tegurid
Väikesed variandid	APA ja ANA	Operaator, teegi ettevalmistuskomplekti partii, seade, sekveneerimise kulutarvikute partii, variandi alatüüp, genoomne kontekst
CNV-d	CNV piirkonna katvuse normaliseeritud sügavus	Operaator, teegi ettevalmistuskomplekti partii, seade, sekveneerimise kulutarvikute partii, variandi alatüüp, variandi pikkus
ROH	ROH skoor üle ROH piirkonna	Operaator, teegi ettevalmistuskomplekti partii, seade, sekveneerimise kulutarvikute partii, variandi alatüüp, variandi pikkus
STR-i ekspansioon	STR suuruse hinnang	Operaator, teegi ettevalmistuskomplekti partii, seade, sekveneerimise kulutarvikute partii, STR-i paige, STR-i pikkus
SMN1 c.840C tuvastus	Log-tõenäosuse osakaal võrdlusalleeli (C) olemasolu kohta sihtpositsioonis	Operaator, teegi ettevalmistuskomplekti partii, seade, sekveneerimise kulutarvikute partii, SMA olek
Mitokondriaalne SNV	Variandi alleeli esinemissagedus	Operaator, teegi ettevalmistuskomplekti partii, seade, sekveneerimise kulutarvikute partii, variandi asukoht, eeldatav variandi alleelisagedus

Variatsioonikomponentide analüüsi tulemused on esitatud [Tabel 24](#)-s. Väikeste variantide puhul omistati suurem osa variatiivsusest jääkveale ja seda ei selgitanud disainis sisalduvad analüüsiga seotud tegurid, sealhulgas sekveneerimiskomplekti partii, sekveneerimisseade, teegi ettevalmistuskomplekti partii, operaator ja käitus. Ühte erandit täheldati SNV-de puhul vahekindluspiirkondades, mille puhul variatiivsus omistati enamjaolt sekveneerimiskomplekti partiile. Üldiselt omistati suurem variatiivsus analüüsiga seotud teguritele väikeste variantide puhul genoomi madala usaldusväärsusega piirkondades. Kõigi teiste varianditüüpide puhul omistati enamjagu variatiivsust jääkveale, mitte analüüsiga seotud teguritele. See uuring näitab, et enamiku väikeste variantide alatüüpide puhul võib kasutada genoomi kõrge ja keskmise usalduspiirkonna filtreerimist, et suurendada korratavust ja vähendada analüüsi varieeruvust. [Väline reprodutseeritavus leheküljel 62](#) annab analüüsi reprodutseeritavuse põhjaliku analüüsi.

Tabel 24 Variatsioonikomponentide analüüsi uuringu tulemused

Möödik	Variantide alamtüübid	Usaldustase	Jääk	Sekveneerimiskomplekti partii	Käitustevaheline	Seade	Teegi ettevalmistus-komplekti partii	Operaator
APA	Lühike deletsioon (1–5 bp)	Kõrge	79,36%	17,52%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%
		Vahelmine	76,97%	18,59%	1,53%	0,00%	2,91%	0,00%
		Madal	67,85%	24,87%	4,4%	0,00%	2,88%	0,00%
	Keskmise deletsioon (6–15 bp)	Vahelmine	61,17%	29,06%	7,42%	0,00%	2,35%	0,00%
		Madal	59,33%	31,76%	6,38%	0,17%	2,35%	0,00%
	Pikk deletsioon (16–31 bp)	Vahelmine	52,93%	33,72%	11,67%	0,17%	1,51%	0,00%
		Madal	49,10%	37,01%	11,08%	1,42%	1,39%	0,00%
	Lühike sisestus (1–5 bp)	Kõrge	89,93%	7,32%	1,76%	0,00%	0,99%	0,00%
		Vahelmine	74,52%	19,96%	3,44%	0,00%	2,08%	0,00%
		Madal	60,64%	29,72%	8,49%	0,00%	1,15%	0,00%
	Keskmise sisestus (6–15 bp)	Vahelmine	81,76%	15,78%	0,00%	0,00%	2,41%	0,06%
		Madal	51,28%	35,07%	12,07%	0,00%	1,58%	0,00%
	Pikk sisestus (16–31 bp)	Vahelmine	87,59%	9,83%	1,18%	0,00%	1,40%	0,00%
		Madal	52,47%	35,32%	10,14%	0,23%	1,85%	0,00%
	SNV	Kõrge	78,01%	17,45%	0,00%	0,13%	1,23%	3,17%
Vahelmine		79,71%	16,95%	0,77%	0,20%	1,29%	1,09%	
Madal		56,63%	36,08%	6,97%	0,22%	0,00%	0,09%	

Möödik	Variantide alamtüübid	Usaldustase	Jääk	Sekveneerimiskomplekti partii	Käitustevaheline	Seade	Teegi ettevalmistus-komplekti partii	Operaator
ANA	SNV	Kõrge	55,07%	21,84%	21,07%	1,80%	0,21%	0,00%
		Vahelmine	28,53%	49,08%	20,11%	1,27%	1,00%	0,00%
		Madal	51,78%	36,04%	9,76%	2,42%	0,00%	0,00%

Möödik	Variantide alamtüübid	Usaldustase	Jääk	Sekveneerimiskomplekti partii	Käitustevaheline	Seade	Teegi ettevalmistus-komplekti partii	Operaator
Sügavus	CNV VÕIMENDUS (10 kbp, 25 kbp)	Ei kohaldu	73,28%	2,87%	0,00%	0,00%	1,01%	0,00%

Möödik	Variantide alamtüübid	Usaldustase	Jääk	Sekveneerimiskomplekti partii	Käitustevaheline	Seade	Teegi ettevalmistus-komplekti partii	Operaator
	CNV VÕIMENDUS (25 kbp, 50 kbp)	Ei kohaldu	72,99%	5,25%	0,00%	0,00%	0,00%	0,56%
	CNV VÕIMENDUS (50 kbp, 100 kbp)	Ei kohaldu	66,40%	5,16%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNV VÕIMENDUS (100 kbp, 500 kbp)	Ei kohaldu	43,51%	14,92%	14,01%	0,20%	0,00%	15,72%
	CNV KADU (10 kbp, 25 kbp)	Ei kohaldu	83,41%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNV KADU (25 kbp, 50 kbp)	Ei kohaldu	84,67%	1,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNV KADU (50 kbp, 100 kbp)	Ei kohaldu	84,16%	2,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNV KADU (100 kbp, 500 kbp)	Ei kohaldu	81,25%	5,22%	0,00%	0,00%	0,00%	0,55%

Möödik	Variantide alamtüübid	Usaldustase	Jääk	Sekveneerimiskomplekti partii	Käitustevaheline	Seade	Teegi ettevalmistus-komplekti partii	Operaator
Hinnang piirkonna kohta	ROH (1 kbp, 10 kbp)	Ei kohaldu	74,32%	1,65%	0,00%	0,00%	0,00%	0,52%
	ROH (10 kbp, 25 kbp)	Ei kohaldu	84,78%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (25 kbp, 50 kbp)	Ei kohaldu	84,92%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (50 kbp, 100 kbp)	Ei kohaldu	85,63%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (100 kbp, 500 kbp)	Ei kohaldu	85,76%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH ≥ 500 kbp	Ei kohaldu	84,81%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Möödik	Variantide alamtüübid	Usaldustase	Jääk	Sekveneerimiskomplekti partii	Käitustevaheline	Seade	Teegi ettevalmistus-komplekti partii	Operaator
STR-lookuste suuruse hinnang ¹	AFF2	Ei kohaldu	99,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ATXN7	Ei kohaldu	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ATXN7_GCC	Ei kohaldu	99,43%	0,57%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNBP	Ei kohaldu	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNBP_CA	Ei kohaldu	95,45%	4,55%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CSTB	Ei kohaldu	96,45%	0,87%	2,57%	0,00%	0,00%	0,11%
	DIP2B	Ei kohaldu	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	FMR1	Ei kohaldu	71,02%	10,06%	0,00%	17,33%	0,64%	0,95%
	FXN_A	Ei kohaldu	94,52%	1,37%	0,00%	1,37%	1,37%	1,37%
	HTT	Ei kohaldu	82,23%	0,00%	11,99%	3,81%	0,00%	1,97%
	HTT_CCG	Ei kohaldu	99,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	NOTCH2NL	Ei kohaldu	99,43%	0,00%	0,00%	0,29%	0,29%	0,00%
	TBP	Ei kohaldu	90,91%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Log-tõenäosuse suhe	c.840C NA03814-s	Ei kohaldu	65,71%	18,98%	0,00%	0,00%	0,00%	15,32%
	c.840C NA23686-s	Ei kohaldu	87,64%	0,00%	0,00%	5,90%	0,00%	6,46%
VAF	mtSNV-d LOD-i lähedal	Ei kohaldu	83,13%	0,37%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%

¹ Variatsioonikomponentide analüüsi ei tehtud lookuste puhul, mille puhul erinevust ei täheldatud.

Pakendi infoleht

Väline reprodutseeritavus

Väline reprodutseeritavus määrati ühe partii teegi ettevalmistus- ja sekveneerimisreaktiividega kolmes välises uuringulaboris, kus igas laboris oli kaks operaatorit. Samu proove, mida kasutati [Laborisisene täpsus leheküljel 52 \(Tabel 21\)](#), kasutati reprodutseeritavuse uuringus ühe erandiga: proov NA20241 asendati NA20239-ga, et hinnata FMR1 lookuse STR-i laiendust madala LoD juures. Kokku testiti 16 ainulaadset proovi kaheksast ainulaadse proovist koosneva kahe alampaneelina (paneel A ja paneel B) igas uuringukohas ühe operaatori poolt. Iga alampaneeli dubleerivate teekide jaoks tehti kolm sekveneerimiskäitust, kokku 36 sekveneerimiskäitust kordumatu proovi kohta.

Proovi läbimise määr 576 prooviteegis kehtivate sekveneerimiskäitustega, mis olid määratletud kui proovide arv, mis läbisid esimesel katsel prooviteegi kvaliteedikontrolli mõõdikud, oli 99,1% (571/576; 95% CI: 98,0%, 99,6%). Kõik testitulemused põhinevad esmasel testimisel.

SNV-de, insertioonide, deletsioonide, CNV-de ja ROH reprodutseeritavust hinnati andmete võrdlemisega referentsnimetuste kogumiga, mis põhineb tavapärasel toimivusel kolme iseloomustamistsükli lõikes ([Tabel 25](#) ja [Tabel 26](#)). STR ekspansioonide reprodutseeritavust, SMN1 c.840C alleeli ja mtSNV-de puudumist hinnati andmete võrdlemisel teadaoleva olekuga ([Tabel 27](#)).

Tabel 25 TruSight Whole Genome SNV-de, CNV-de ja ROH reprodutseeritavus

Variandi tüüp — stratifitseerimine	Kokkulangevad positiivsed nimetused ¹ / Positiivsed nimetused ²			Keskmise positiivne kokkulangevus (%) (95% CI) ³
	Koht 1	Koht 2	Koht 3	
Väikesed variandid (suur usaldus)				
SNV-d	687 996 150 /	666 509 635 /	688 001 697 /	99,9
	688 770 402	667 253 493	688 766 887	(99,9–99,9)
Insertsioonid — 1–5 bp	34 087 135 /	33 025 772 /	34 089 204 /	99,9
	34 137 298	33 073 087	34 137 792	(99,9–99,9)
Deletsioonid — 1–5 bp	44 096 186 /	42 733 935 /	44 102 515 /	99,6
	44 255 442	42 883 089	44 256 695	(99,6–99,6)
Väikesed variandid (vahepealne usaldus)				
SNV-d	42 238 226 /	40 920 370 /	42 236 751 /	98,8
	42 737 228	41 391 560	42 725 827	(98,8–98,9)
Insertsioonid — 1–5 bp	11 075 073 /	10 734 488 /	11 080 468 /	98,9
	11 204 210	10 855 790	11 204 818	(98,9–99,9)
Insertsioonid — 6–15 bp	4 307 181 /	4 173 626 /	4 308 408 /	99,3
	4 339 975	4 205 261	4 340 277	(99,2–99,3)
Insertsioonid — ≥ 16 bp	611 952 /	593 114 /	612 222 /	96,8
	632 214	612 877	632 498	(96,8–96,8)
Deletsioonid — 1–5 bp	24 571 502 /	23 814 655 /	24 586 095 /	98,9
	24 851 492	24 076 930	24 855 041	(98,9–98,9)
Deletsioonid — 6–15 bp	8 737 319 /	8 473 410 /	8 746 773 /	98,2
	8 900 796	8 624 403	8 902 016	(98,2–98,2)
Delektsoonid — ≥ 16 bp	3 590 282 /	3 481 192 /	3 594 420 /	95,0
	3 779 907	3 662 448	3 780 659	(95,0–95,0)
Väikesed variandid (madal usaldus)				
SNV-d	78 507 103 /	76 365 789 /	78 863 977 /	81,2
	96 859 682	94 066 720	97 058 652	(81,2–81,2)

Variandi tüüp — stratifitseerimine	Kokkulangevad positiivsed nimetused ¹ / Positiivsed nimetused ²			Keskmine positiivne kokkulangevus (%) (95% CI) ³
	Koht 1	Koht 2	Koht 3	
Insertsioonid — 1–5 bp	17 312 805 /	16 859 987 /	17 406 355 /	89,6
	19 370 351	18 807 745	19 418 516	(89,5–89,6)
Insertsioonid — 6–15 bp	5 543 985 /	5 404 652 /	5 584 241 /	85,1
	6 529 886	6 338 556	6 550 066	(85,1–85,2)
Insertsioonid — ≥ 16 bp	3 284 197 /	3 205 165 /	3 314 025 /	77,0
	4 275 286	4 158 315	4 298 399	(77,0–77,0)
Deletsioonid — 1–5 bp	31 659 416 /	30 751 952 /	31 746 379 /	92,7
	34 194 748	33 158 757	34 226 245	(92,7–92,7)
Deletsioonid — 6–15 bp	9 189 220 /	8 928 794 /	9 217 516 /	92,1
	9 987 568	9 684 179	9 995 101	(92,1–92,2)
Delektsoonid — ≥ 16 bp	3 335 400 /	3 241 968 /	3 346 219 /	85,4
	3 909 364	3 791 331	3 912 857	(85,4–85,5)
CNV-d — võimendused ≥ 10 kbp	7 883 /	7 664 /	7 916 /	95,5
	8275	8 012	8 282	(95,2–95,8)
CNV-d — kaod ≥ 10 kbp	11 517 /	11 248 /	11 516 /	95,3
	12 089	11 777	12 113	(95,1–95,5)
ROH — ≥ 500 kbp	6 641 /	6 519 /	6 616 /	98,0
	6 765	6 663	6 756	(97,8–98,2)

¹ Kokkulangevate positiivsete nimetuste koguarv = päringu kokkulangevus positiivne (QCP) + võrdluskokkulangevus positiivne (RCP).

² Positiivsete nimetuste koguarv = päringu kokkulangevus positiivne (QCP) + üksnes päringuga saadud positiivne (QEP) + võrdlusmeetodiga kokkulangevus positiivne (RCP) + üksnes võrdlusmeetodiga saadud positiivne (REP).

³ Wilsoni skoori meetodil arvatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Tabel 26 TruSight Whole Genome SNV-de, CNV-de ja ROH ANA reprodutseeritavus

Variandi tüüp – stratifitseerimine	Kooskõlalised negatiivsed nimetused ¹ / Negatiivsed nimetused ²			Keskmise negatiivne kokkulepe (%) (95% CI) ³
	Koht 1	Koht 2	Koht 3	
Väikesed variandid (suur usaldus)	486 282 620 918 /	470 948 205 740 /	486 285 759 770 /	>99,9
	486 388 081 375	471 054 131 230	486 389 857 817	(>99,9->99,9)
Väikesed variandid (vahepealne usaldus)	17 249 915 828 /	16 699 106 194 /	17 253 834 878 /	99,0
	17 427 817 811	16 874 794 553	17 429 035 482	(99,0-99,0)
Väikesed variandid (madal usaldus)	24 072 615 254 /	23 454 103 344 /	24 180 801 788 /	94,0
	25 608 493 410	24 947 163 687	25 695 956 102	(94,0-94,0)
CNV-d – võimendused ≥ 10 kbp	592 486 270 144 /	573 973 293 084 /	592 487 297 632 /	>99,9
	592 500 222 476	573 985 772 396	592 500 614 241	(>99,9->99,9)
CNV-d – kaod ≥ 10 kbp	592 548 802 882 /	574 030 570 254 /	592 547 683 360 /	>99,9
	592 559 825 216	574 041 311 257	592 559 141 007	(>99,9->99,9)
ROH — ≥ 500 kbp	542 968 586 606 /	525 724 060 526 /	543 014 319 116 /	99,2
	547 402 885 905	530 011 754 808	547 444 495 449	(99,2-99,2)

¹ Kooskõlaliste negatiivsete nimetuste koguarv = 2 × kooskõlaline negatiivne (CN).

² Negatiivsete nimetuste koguarv = 2 × kooskõlaline negatiivne (CN) + võrdluseksklusiivne negatiivne (REN) + päringu eksklusiivnegatiivne (QEN).

³ Wilsoni skoori meetodil arvatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Tabel 27 TruSight Whole Genome reprodutseeritavus STR-ide, SMN1 ja mtSNV-ide osas

Variandi tüüp – stratifitseerimine	Oodatavate positiivsete nimetuste kogusumma	Positiivsed nimetused			Oodatavate negatiivsete nimetuste kogusumma	Negatiivsed nimetused			Positiivsete nimetuste protsent (95% CI) ¹	Negatiivsete nimetuste protsent (95% CI) ¹
		Koht 1	Koht 2	Koht 3		Koht 1	Koht 2	Koht 3		
STR ekspansioonid – kõrge tuvastustase (2x–4x LOD)										
STR ekspansioonid – FMR1	35	12	11	12	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	100 (90,1–100)	Ei kohaldu
STR-i ekspansioonid – HTT	36	12	12	12	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	100 (90,4–100)	Ei kohaldu
STR ekspansioonid – FMR1 ja HTT kombineeritud	71	24	23	24	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	100 (94,9–100)	Ei kohaldu
STR ekspansioonid – madal tuvastustase (1x–1,5x LOD)										
STR ekspansioonid – FMR1	36	11	10	11	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	88,9 (74,7–95,6)	Ei kohaldu
STR-i ekspansioonid – HTT	36	12	12	12	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	100 (90,4–100)	Ei kohaldu
STR ekspansioonid – FMR1 ja HTT kombineeritud	72	23	22	23	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	94,4 (86,6–97,8)	Ei kohaldu

Variandi tüüp – stratifitseerimine	Oodatavate positiivsete nimetuste kogusumma	Positiivsed nimetused			Oodatavate negatiivsete nimetuste kogusumma	Negatiivsed nimetused			Positiivsete nimetuste protsent (95% CI) ¹	Negatiivsete nimetuste protsent (95% CI) ¹
		Koht 1	Koht 2	Koht 3		Koht 1	Koht 2	Koht 3		
STR-i ekspansioonid – 28 peamist siht-STR lookust kombineerituna	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	Ei kohaldu	285	96	93	96	Ei kohaldu	100 (98,7–100)
SMN1 c.840C puudumine	71	24	24	23	285	96	93	96	100 (94,9–100)	100 (98,7–100)
mtSNV-d – kõrge tase (2x–4x LOD)	1080	360	360	360	457 524	152 491	152 489	152 484	100 (99,6–100)	>99,9 (>99,9–>99,9)
mtSNV-d – madal tase (1x–1,5x LOD)	1080	360	359	360	457 524	152 481	152 489	152 483	99,9 (99,5–99,9)	>99,9 (>99,9–>99,9)

¹ Wilsoni skoori meetodil arvatatud 95% kahepoolne usaldusvahemik.

Tõrkeotsing

Töövoo tõrkeotsinguks kasutage järgmist tabelit. Kui sekveneerimiskäitus või proovi teekide valmistamine nurjub kaks korda, võib vajalik olla täiendav tõrkeotsing. Võtke ühendust Illumina tehnilise toega.

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Käituse loomise probleem	Seotud plaanikäitust ei saa NovaSeq 6000Dx juhtimistarkvara pärast kulutarvikute laadimist käsitsi valida	Käituse planeerimisel määrati vale teegikatsuti ID	Vt jaotist Käituse redigeerimine jaotises Analüüsi TruSight Whole Genome Analysis Application Guide rakendusjuhend (dokument nr 200049931).

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Sekveneerimise tõrge	Sekveneerimise ebaõnnestumise olek Illumina Run Manager	<p>Sekveneerimiskäitus katkestati või seda ei õnnestunud lõpule viia NovaSeq 6000Dx või sekveneerimise kulutarvikute käitlemisprobleemi tõttu.</p> <p>Käitus on lõpetatud, kuid ei õnnestunud rühmitada. Võimalik NovaSeq 6000Dx probleem, kulutarvikute käitlemise sekveneerimise probleem või katastroofilise teegi ettevalmistamise ebaõnnestumine reaktiivi käitlemise probleemi või operaatori vea tõttu (nt jäeti samm vahele või supernatant suuruse valimise ajal ülekandmise ajal kõrvaldatud)</p>	<p>Vt jaotist NovaSeq 6000Dx Instrument tootedokumentatsioon (dokument # 200010105).</p> <p>Pärast probleemi lahendamist võib teegi uuesti puulida ja uuesti sekveneerida kuni üks kord (mahu tõttu).</p> <p>Hinnake individuaalset teegi saaki FLP-s qPCR-iga $\geq 0,94$ nM (eeldusel, et sisendi suurus on 450 bp), et välistada teegi ettevalmistuse ja sekveneerimisega seotud probleemid.</p> <p>Kui teegi ettevalmistamise probleemid on välistatud ja kahtlustatakse sekveneerimisega seotud probleemi, vt jaotist NovaSeq 6000Dx Instrument tootedokumentatsioon (dokument # 200010105).</p> <p>Kui kahtlustatakse teegi ettevalmistamise probleemi, vaadake enne teegi ettevalmistamise ja sekveneerimise kordamist üle Näpunäiteid ja tehnikaid leheküljel 12 ning Kasutusjuhised leheküljel 15. Korduvate rikete korral võtke ühendust Illumina tehnilise toega.</p>

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Sekveneerimisandmeid ei edastata serverisse	Sekveneerimisfaili analüüsiks edastamise tõrge Illumina Run Manager-s	Käituse andmeedastuse ajal ilmnes võrguühenduse probleem või seadme või serveri toitekatkestus	<p>Kontrollige toitekatkestusi või seadme võrguühenduse kadumist. Oodake, kuni süsteem on jõudeolekus (sekveneerimine lõpule viidud), seejärel avage seadme sätted, IVD SÄTTED, et kinnitada ühendus määratud väljundasukohaga sirvimisfunktsiooni abil.</p> <p>Kui on vaja täiendavaid tõrkeotsinguid, vt NovaSeq 6000Dx Instrument tootedokumentatsioon (dokument # 200010105). Kui pärast ühenduse või toiteprobleemide lahendamist failiedastus ei alga ega lõpe, võtke ühendust Illumina tehnilise toega.</p>

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Analüüs ei käivitu	Analüüs ei alanud Illumina Run Manager-s, kuigi sekveneerimisfaili edastamine analüüsiks on lõpetatud	Sidumine või ühendus seadme ja DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx vahel kadunud või DRAGEN litsentsi aegunud.	<p>Oodake, kuni süsteem on jõudeolekus (sekveneerimine lõpule viidud), seejärel minge DRAGEN, et veenduda, kas DRAGEN litsents kehtib. Kui litsents on aegunud, võtke ühendust Illumina-ga. Kui litsents on kehtiv, valige käsk Vii läbi enesekontroll. Kui test nurjub või kui enesetesti käitamise valik ei ole saadaval, logige seadmesse sisse, et kontrollida serveri sidumisega seotud viga. Vt jaotist Süsteemi konfigureerimine, NovaSeq 6000Dx Instrument tootedokumentatsioon (dokument # 200010105).</p> <p>Analüüs peaks algama automaatselt pärast probleemi lahendamist. Väljuge lehelt ja navigeerige vahekaardile Aktiivsed käitused, et kinnitada analüüsi toimumist. Kui probleem püsib, võtke ühendust Illumina-ga.</p>

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Analüüs hangub	Analüüs edenemisolekus Illumina Run Manager-s oodatust palju kauem	Võrguühendus või seadme või serveri toide võib olla analüüsi ajal häiritud, põhjustades analüüsi hangumist	<p>Tühistage analüüs ja kontrollige seadme võrguühenduse häireid või kadu.</p> <p>Oodake, kuni süsteem on jõudeoleus (sekveneerimine lõpule viidud), seejärel minge seadme sätetesse (IVD SÄTTED) ja kinnitage ühenduvus määratud väljundasukohaga. Kui on vaja täiendavat tõrkeotsingut, vt jaotist NovaSeq 6000Dx Instrument tootedokumentatsioon (dokument # 200010105).</p> <p>Pärast probleemi lahendamist korrake analüüsi ilma muudatusteta. Vt jaotist Analüüsi TruSight Whole Genome Analysis Application Guide rakendusjuhend (dokument nr 200049931).</p>

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Analüüsifaile ei edastata	Analüüsifaili edastamine hoiukohta ebaõnnestus Illumina Run Manager	Analüüsifaili andmeedastuse ajal ilmnes võrguühenduse probleem või seadme või serveri toitekatkestus	<p>Tühistage analüüs ja kontrollige seadme võrguühenduse häireid või kadu.</p> <p>Oodake, kuni süsteem on jõudeoleus (sekveneerimine lõpule viidud), seejärel minge seadme sätetesse (IVD SÄTTED) ja kinnitage ühenduvus määratud väljundasukohaga. Kui on vaja täiendavat tõrkeotsingut, vt jaotist NovaSeq 6000Dx Instrument tootedokumentatsioon (dokument # 200010105).</p> <p>Pärast probleemi lahendamist korrake analüüsi ilma muudatusteta. Vt jaotist Analüüsi TruSight Whole Genome Analysis Application Guide rakendusjuhend (dokument nr 200049931).</p>
Taasjärjestamisel analüüs ebaõnnestub	Pärast taasjärjestamist analüüs ebaõnnestus	Analüüsi taasjärjestamisel võib algne käitus olla kustutatud või arhiveeritud ning see pole enam välisele salvestuskohale määratud asukohas	Kontrollige, kas algne käitus on ikka veel välises salvestuskohas. Kui see on arhiveeritud, taastage see arhiivist ja taasjärjestage analüüs uuesti.

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Sekveneerimise kvaliteedikontroll nurjub	Sekveneerimise kvaliteedikontrolli tulemuste kokkuvõtte konsolideeritud aruandes NURJUNUD	„Kogu % >= Q30“ alla analüütilise spetsifikatsiooni sekveneerimise kulutarvikute valesti käitlemise tõttu (ei sulanud täielikult või jäeti pärast sulatamist segamata)	Vt jaotist NovaSeq 6000Dx Instrument tootedokumentatsioon (dokument # 200010105). Pärast probleemi lahendamist võib teegi uuesti puulida ja uuesti sekveneerida kuni üks kord (mahu tõttu).
FASTQ kvaliteedikontroll ebaõnnestub kõigi proovide puhul	Kokkuvõtte FASTQ kvaliteedikontrolli tulemustest ja prooviteegi QC NURJUMINE kokkuvõtte koos üksikute teegi kvaliteedikontrolli mõõdikute tulemustega, mis on esitatud kui ND, kõigi konsolideeritud aruandes olevate proovide puhul koos sekveneerimise kvaliteedikontrolli tulemuse kokkuvõttega LÄBITUD	Käituse loomise ajal määratud Index Adapter Kit ei ole joondatud sellega, mida kasutati teegi ettevalmistamisel	Vaadake proove, et vaadata analüüsis kasutatud indeksi teavet IRM-s. Kui on vaja parandust, vt jaotist Analüüsi taastjärjestamine, Analüüsi TruSight Whole Genome Analysis Application Guide rakendusjuhend (dokument nr 200049931).

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
FASTQ kvaliteedikontroll ebaõnnestub ühe või mitme proovi puhul, kui puudub madal käituse saagis; indekseerimata kogusaagis (GB) \geq 2800 GB S4 puhul või \geq 1000 GB S2 puhul	Kokkuvõtte FASTQ kvaliteedikontrolli tulemustest ja prooviteegi QC NURJUMINE kokkuvõtte koos üksikute teegi kvaliteedikontrolli mõõdikute tulemustega, mis on esitatud kui ND, ühe või mitme, aga mitte kõigi konsolideeritud aruandes olevate proovide ilma madala käituse saagikuseta	Kasutamisevead teegi ettevalmistuse või puulimise ajal	<p>Hinnake järelejäänud mahtu(sid) lõplikul teegiplaadil (FLP), et kinnitada puulitud teekidest proovide väljajätmise viga. Maht võimaldab operaatoril kuni üks kord uuesti puulida ja uuesti sekveneerida. Teise võimalusena tellige nurjunud proovid uuesti järgmises teegi ettevalmistuspartiid ja käitage pärast Kasutusjuhised leheküljel 15 ülevaatamist.</p> <p>Valikuliselt hinnake individuaalset teegi saagikust FLP-s qPCR-iga \geq 0,94 nM (eeldusel, et sisendi suurus on 450 np), et välistada teegi ettevalmistusega seotud probleemid. Taasjärjestage tellige nurjunud proovid uuesti järgmises teegi ettevalmistuspartiid ja käitage pärast Kasutusjuhised leheküljel 15 ülevaatamist.</p> <p>Teekide ettevalmistamise partiisid ei ole soovitatav puulida partiidevahelise saagikuse kõikumise tõttu, mis võib põhjustada suuremat %CV-d ja „keskmise autosoomse katvuse“ nurjumise suuremat esinemissagedust.</p>

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
FASTQ kvaliteedikontroll ei õnnestu mõnede mitte kõigi madala käituse saagisega proovide puhul; indekseerimata kogusaagis (GB) on madal, S4 puhul < 2800 GB või S2 puhul < 1000 GB	Kokkuvõtte FASTQ kvaliteedikontrolli tulemustest ja prooviteegi QC NURJUMINE kokkuvõtte koos üksikute teegi kvaliteedikontrolli mõõdikute tulemustega, mis on esitatud kui ND, ühe või mitme, aga mitte kõigi konsolideeritud aruandes olevate proovide madala käituse saagikusega	Võib viidata teegi ettevalmistusele või sekveneerimisega seotud probleemile	<p>Hinnake individuaalset teegi saagist FLP-s qPCR-iga $\geq 0,94$ nM (eeldusel, et sisendi suurus on 450 bp), et välistada teegi ettevalmistus sees/väljas võrreldes sekveneerimisega seotud probleemidega.</p> <p>Kui kahtlustate sekveneerimisprobleemi, vt jaotist NovaSeq 6000Dx Instrument tootedokumentatsioon (dokument # 200010105). Pärast probleemi lahendamist võib teegid uuesti puulida ja taasjärjestada kuni üks kord (piiratud mahu tõttu).</p> <p>Kui kahtlustatakse teegi ettevalmistamise probleemi, vaadake enne teegi ettevalmistamise ja sekveneerimise kordamist üle Näpunäiteid ja tehnikaid leheküljel 12 ning Kasutusjuhised leheküljel 15. Korduvate rikete korral võtke ühendust Illumina tehnilise toega.</p>

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Teegi kvaliteedikontroll nurjub madala katvuse tõttu	Kokkuvõtlik prooviteegi kvaliteedikontrolli tulemuste NURJUMINE ühe või mitme konsolideeritud aruandes oleva proovi puhul, mis on tingitud keskmisest autosoomsest katvusest ja/või autosoomsuse protsendist, mille katvus on suurem kui 20X, ja/või keskmisest mitokondriaalsest katvusest genoomis, mis ei läbi analüütilist spetsifikatsiooni	Proovi kvaliteedi või teegi ettevalmistamise probleem(id)	<p>Tehke protsessi kontrollidega uuesti kvantifitseerimine, et välistada DNA sisendiga seotud probleemid.</p> <p>Vaadake enne ebaõnnestunud proovi (de) taasjärjestamist järgmises teegi ettevalmistuspartiiis ja käituses üle Näpunäiteid ja tehnikaid leheküljel 12 ning Kasutusjuhised leheküljel 15. Kui sama(de) proovi(de) puhul esineb korduv ebaõnnestumine/ebaõnnestumised, võib see viidata proovi kvaliteedi probleemi(de)le.</p> <p>Kui tõrkeid täheldatakse uuesti, kuid erinevate proovidega, võib see viidata operaatori, reaktiivi, kulutarvikute või seadmetega seotud teegi ettevalmistamise probleemile. Kui probleem püsib, võtke ühendust Illumina tehnilise toega.</p>

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Teegi kvaliteedikontroll ebaõnnestub GC kallutatuse tõttu	Kokkuvõtte prooviteegi kvaliteedikontrolli tulemuse NURJUMISE ühe või mitme konsolideeritud aruande proovi kohta, kuna normaliseeritud katvus on 60% kuni 79% GC-ga ja/või normaliseeritud katvus 20% kuni 39% GC mahutites, mis ei vasta analüütilisele spetsifikatsioonile	Liigne ELM-i ülekanne või vahele jäetud pesu, mis põhjustab GC kallutatust katvuses	Vaadake enne ebaõnnestunud proovi (de) taasjärjestamist järgmises teegi ettevalmistuspartiiis ja käituses üle Näpunäiteid ja tehnikaid leheküljel 12 ning Kasutusjuhised leheküljel 15 .
Teegi kvaliteedikontroll ebaõnnestub ühe või mitme proovi saastumise põhjal, kuid mitte kõigi analüüsitavate proovide puhul	Kokkuvõtliku prooviteegi QC tulemuseks on NURJUMINE ühe või mitme, kuid mitte kõigi konsolideeritud aruandes olevate proovide kohta, kuna hinnanguline proovi saastumine ei läbi analüütilisi spetsifikatsioone	Saastunud proov(id) või ei vahetatud proovi või teegi ettevalmistamise ajal otsakuid	Vaadake enne ebaõnnestunud proovi (de) taasjärjestamist järgmises teegi ettevalmistuspartiiis ja käituses üle Näpunäiteid ja tehnikaid leheküljel 12 ning Kasutusjuhised leheküljel 15 . Kui sama(de)l proovi(de)l esineb korduv (aid) ebaõnnestumine/ebaõnnestumisi, võib proovi DNA olla saastunud.

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Teegi kvaliteedikontroll nurjub kõikide analüüsitavate proovide saastumise põhjal	Kokkuvõtliku prooviteegi QC tulemuseks on NURJUMINE kõigi konsolideeritud aruandes olevate proovide kohta, kuna hinnanguline proovi saastumine ei läbi analüütilisi spetsifikatsioone	Saastunud reaktiiv või ei vahetatud otsakuid proovi lahjendamise või teegi ettevalmistamise ajal	Vaadake üle Näpunäiteid ja tehnikaid leheküljel 12 saastumise vältimiseks. Taastage ebaõnnestunud proovid järgmises teegi ettevalmistuspartii ja käitage, kasutades värskaid proovi lahjendusi ja teegi ettevalmistuskomplekti.
ND kokkuvõtliku ploidsuse tulemus	Kokkuvõtlik ploidsus esitati konsolideeritud aruandes kui ND (määramata)	Sugu oli käituse loomise ajal tundmatu	Kinnitage, et konsolideeritud aruandes oli „Tõestatud sugukromosoomi ploidsus“ „teadmata“. Sugu on soovitatav loetleda prooviandmetes kui „mees“ või „naine“, kui see on käituse loomise ajal teada.
		DRAGEN teatas soolise ploidsuse tulemusest, mis ei olnud XX või XY, näiteks XO või XXY	Vaadake DRAGEN konsolideeritud aruandes üle väljund „Hinnanguline ploidsus“.

Probleemi tüüp	Probleem	Võimalik Põhjus	Soovitav Toiming
Mittekokkulangev kokkuvõtlik ploidsuse tulemus	Kokkuvõtlik ploidsus esitati konsolideeritud aruandes kui MITTEKOKKULANGEV.	Võimalik proovivahetuse probleem	Vaadake üle, et kinnitada, et loomise käituse ajal sisestatud prooviandmed olid õiged. Kui see on vale, hankige analüüs uuesti muudatustega. Kui see on õige ja kahtlustatakse proovi vahetamise probleemi, on soovitatav MITTEKOKKULANGEV(AD) proov(id) järgmisest teegi ettevalmistuspartiist uuesti tellida ja käitada, et vältida valedest tulemustest teatamist. Proovitarkvara ei jõusta riket proovile, mille kokkuvõtlik ploidsuse tulemus on MITTEKOKKULANGEV.

Viited

1. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*. 2003;34(4):460–463. doi: 10.1038/ng1207.
2. Chen X, Sanchis-Juan A, French CE, et al. Spinal muscular atrophy diagnosis and carrier screening from genome sequencing data. *Genet Med*. 2020;22(5):945–953. doi: 10.1038/s41436-020-0754-0.
3. Prior TW. Perspectives and diagnostic considerations in spinal muscular atrophy. *Genet Med*. 2010;12(3):145–52. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181c5e713.
4. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526:68–74. doi: <https://doi.org/10.1038/nature15393>.
5. Halman A, Dolzhenko E, Oshlack A. STRipy: A graphical application for enhanced genotyping of pathogenic short tandem repeats in sequencing data. *Hum Mutat*. 2022;43(7):859–868. doi: 10.1002/humu.24382. Epub 2022 Apr 21. PMID: 35395114; PMCID: PMC9541159.
6. Ibañez K, Polke J, Hagelstrom RT, Dolzhenko E, et al. Whole genome sequencing for the diagnosis of neurological repeat expansion disorders in the UK: a retrospective diagnostic accuracy and prospective clinical validation study. *Lancet Neurol*. 2022;21(3):234–245. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00462-2. PMID: 35182509; PMCID: PMC8850201.
7. Sequeiros J, Seneca S, Martindale J. Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of *spinocerebellar ataxias*. *Eur J Hum Genet*. 2010;18(11):1188–95. doi: 10.1038/ejhg.2010.10. Epub 2010 Feb 24. PMID: 20179748; PMCID: PMC2987480.
8. Perlman S. Hereditary Ataxia Overview. 1998 Oct 28 [updated 2023 Nov 16]. / Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., eds. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024. PMID: 20301317.
9. Gijssels I, Van Mossevelde S, van der Zee J, et al. The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Mol Psychiatry*. 2016;21(8):1112–24. doi: 10.1038/mp.2015.159. Epub 2015 Oct 20. PMID: 26481318; PMCID: PMC4960451.
10. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. 2011;72(2):245–56. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011. Epub 2011 Sep 21. PMID: 21944778; PMCID: PMC3202986.
11. Liquori CL, Ricker K, Moseley ml, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science*. 2001;293(5531):864–7. doi: 10.1126/science.1062125. PMID: 11486088.
12. Lalioti MD, Scott HS, Antonarakis SE. What is expanded in progressive myoclonus epilepsy? *Nat Genet*. 1997;17(1):17. doi: 10.1038/ng0997-17. PMID: 9288090.
13. Joensuu T, Lehesjoki AE, Kopra O. Molecular background of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia*. 2008 ;49(4):557–63. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01422.x. Epub 2007 Nov 19. PMID: 18028412.
14. Kamsteeg EJ, Kress W, Catalli C, et al. Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(12):1203–8. doi: 10.1038/ejhg.2012.108. Epub 2012 May 30. PMID: 22643181; PMCID: PMC3499739.

15. Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):417-25. doi: 10.1038/ejhg.2014.185. Epub 2014 Sep 17. PMID: 25227148; PMCID: PMC4666582.
16. Dolzhenko E, Deshpande V, Schlesinger F, et al. ExpansionHunter: a sequence-graph-based tool to analyze variation in short tandem repeat regions. *Bioinformatics.* 2019;35(22):4754-4756. doi: 10.1093/bioinformatics/btz431. PMID: 31134279; PMCID: PMC6853681.
17. van Kuilenburg ABP, Tarailo-Graovac M, Richmond PA, et al. Glutaminase Deficiency Caused by Short Tandem Repeat Expansion in GLS. *N Engl J Med.* 2019;380(15):1433-1441. doi: 10.1056/NEJMoa1806627. PMID: 30970188; PMCID: PMC8819703.
18. Losekoot M, van Belzen MJ, Seneca S, et al; European Molecular Genetic Quality Network (EMQN). EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(5):480-6. doi: 10.1038/ejhg.2012.200. Epub 2012 Sep 19. PMID: 22990145; PMCID: PMC3641377.
19. Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, et al. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet.* 2001;29(4):377-8. doi: 10.1038/ng760. Erratum in: *Nat Genet* 2002 Jan;30(1):123. PMID: 11694876.
20. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, et al. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet.* 2011;89(1):121-30. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.015. Epub 2011 Jun 16. PMID: 21683323; PMCID: PMC3135815.
21. García-Murias M, Quintáns B, Arias M, et al. 'Costa da Morte' ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization. *Brain.* 2012;135(Pt 5):1423-35. doi: 10.1093/brain/aws069. Epub 2012 Apr 3. PMID: 22492559; PMCID: PMC3338928.
22. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, et al. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1222-1232. doi: 10.1038/s41588-019-0458-z. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31332380.
23. Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1215-1221. doi: 10.1038/s41588-019-0459-y. Epub 2019 Jul 22. PMID: 31332381.
24. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet.* 2003;33(4):459-61. doi: 10.1038/ng1130. Epub 2003 Mar 17. PMID: 12640453.

Lisa A

S4 indeksikomplekt 1

Indeksplaadi süvendi ID	Indeksi nimi	i7 alused	i5 alused
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACCTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG
G01	UDP0043	CCATCTCGCC	TTCTATGGTT
H01	UDP0044	CTGCGAGCCA	AATCCGGCCA
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA
G02	UDP0071	CTTGTACACC	AAGCGCGCTT
H02	UDP0072	ACACAGGTGG	TGAGCGTTGT

S4 indeksikomplekt 2

Indeksplaadi süvendi ID	Indeksi nimi	i7 alused	i5 alused
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT

Indeksplaadi süvendi ID	Indeksi nimi	i7 alused	i5 alused
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC
G03	UDP0087	CCTCTACATG	GATACCTCCT
H03	UDP0088	GGAGCGTGTA	ATCCGTAAGT
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	KATEAGATTG	GATTAAGGTG
G04	UDP0095	GTATTCCACC	ATGTAGACAA
H04	UDP0096	CCTCCGTCCA	CACATCGGTG

S2 indeksikomplekt 1

Indeksplaadi süvendi ID	Indeksi nimi	i7 alused	i5 alused
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG

S2 indeksikomplekt 2

Indeksplaadi süvendi ID	Indeksi nimi	i7 alused	i5 alused
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC

Indeksplaadi süvendi ID	Indeksi nimi	i7 alused	i5 alused
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA

S2 indeksikomplekt 3

Indeksplaadi süvendi ID	Indeksi nimi	i7 alused	i5 alused
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

S2 indeksikomplekt 4

Indeksplaadi süvendi ID	Indeksi nimi	i7 alused	i5 alused
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	KATEAGATTG	GATTAAGGTG

Lisa B

Täiendavad arvutused variandi 1 jaoks: 280 ng DNA sisend kvantitatiivsete ja Qubit Broad Range kvantitatiivsete meetodite jaoks

DNA põhikontsentratsiooni 11,2 kuni 154,0 ng/μl kontsentratsioonipiiride arvutamine:

Minimaalne kontsentratsioon põhineb 280,0 ng DNA sisendil / 25,0 μl mahul = 11,2 ng/μl.

Põhineb minimaalsel pipettimise mahul 2,0 μl, maksimaalne kontsentratsioon on 280 ng*1,1 (10% ülejääk) / 2,0 μl = 154,0 ng/μl, kogumahul 27,5 μl.

Näidete arvutused 280,0 ng DNA sisendiga

Töötatud näide DNA põhikontsentratsiooni osas = 95,0 ng/μl:

- DNA põhimaht (μl) = $280,0 \text{ ng} \times 1,1/95,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, ümardades kuni 3,24 μl täpseks pipettimiseks P-10-ga.
- Lahjendatud DNA kogumaht fikseeritakse väärtusele 27,5 μl.
- RSB maht (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, ümardades kuni 24,3 μl täpseks pipettimiseks P-200-ga.

Töötatud näide DNA põhikontsentratsiooni osas = 308,0 ng/μl:

- DNA põhimaht (μl) fikseeritakse väärtusele 2,0 μl
- Lahjendatud DNA kogumaht (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = 55,0 \mu\text{l}$
- RSB maht (μl) = $55,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 53,0 \mu\text{l}$

2. variandi täiendavad arvutused: 350 ng DNA sisend täpse ülikõrge tundlikkuse kvantifitseerimismeetodi jaoks

DNA varude kontsentratsiooni piirväärtuste arvutamine 14,0 kuni 192,5 ng/μl:

Minimaalne kontsentratsioon põhineb 350,0 ng DNA sisendil / 25,0 μl mahul = 14,0 ng/μl.

Põhineb minimaalsel pipettimise mahul 2,0 μl, maksimaalne kontsentratsioon on 350 ng*1,1 (10% ülejääk) / 2,0 μl = 192,5 ng/μl.

Näidete arvutused 350,0 ng DNA sisendiga

Töötatud näide DNA põhikontsentratsiooni osas = 118,75 ng/μl:

- DNA põhimaht (μl) = $350,0 \text{ ng} \times 1,1/118,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, ümardades kuni 3,24 μl täpseks pipettimiseks P-10-ga
- Lahjendatud DNA kogumaht fikseeritakse väärtusele 27,5 μl.
- RSB maht (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, ümardades kuni 24,3 μl täpseks pipettimiseks P-200-ga.

Töötatud näide DNA põhikontsentratsiooni osas = 308,0 ng/μl:

- DNA põhimaht (μl) fikseeritakse väärtusele 2,0 μl
- Lahjendatud DNA kogumaht (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- RSB maht (μl) = $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

Muudatuste ajalugu

Dokument	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
Dokument nr 200050132 v00.1	Mai 2024	Parandatud sisendmaht Accuclear ülikõrge tundlikkuse kvantifitseerimismeetodi jaoks.
Dokument nr 200050132 v00	Aprill 2024	Esmane versioon.

Pakendi infoleht

Patendid ja kaubamärgid

See dokument ja selle sisu kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. ja selle tütarettevõtetele („Illumina“) ning on mõeldud kasutamiseks ainult ettevõtte lepingulistele klientidele seoses selles dokumendis kirjeldatud toote (toodete) kasutamisega ega ole mõeldud mitte mingiks muuks otstarbeks. Seda dokumenti ega selle sisu ei tohi mis tahes viisil kasutada ega muul eesmärgil levitada ja/või edastada, avaldada või reprodutseerida ilma Illumina eelneva kirjaliku nõusolekuta. Illumina ei anna selle dokumendiga kolmandale isikule oma patendi-, kaubamärgi-, autori-, tava- või muu sarnase õiguse alusel mitte ühtegi litsentsi.

Kvalifitseeritud ja asjakohase koolituse saanud töötajad peavad selles dokumendis kirjeldatud juhiseid järgima rangelt ja üksikasjalikult, et tagada siin kirjeldatud toote (toodete) õige ja ohutu kasutusviis. Siinse dokumendi sisu tuleb enne nimetatud toote (toodete) kasutamist täies ulatuses läbi lugeda ja endale selgeks teha.

SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD JUHISTE MITTE LUGEMINE JA MITTE ÜKSIKASJALIKULT JÄRGIMINE VÕIB KAHJUSTADA TOODET (TOOTEID), VIGASTADA INimesi (SH KASUTAJAID VÕI TEISI) JA KAHJUSTADA MUUD VARA. NIMETATUD JUHUL EI KEHTI ÜKSKI TOOTELE (TOODETELE) ANTUD GARANTII.

ILLUMINA EI VASTUTA SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD TOOTE (TOODETE) (SEALHULGAS TOOTE OSAD VÕI TARKVARA) VÄÄRKASUTUSE EEST.

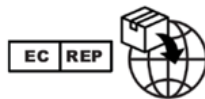
© 2024 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

Kõik kaubamärgid kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. või nende vastavatele omanikele. Kaubamärgi kohta lisateabe saamiseks vt www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktteave



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (väljaspool Põhja-Ameerikat)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Sponsor Austraalias

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

Toote märgistus

Toote pakendil ja etikettidel olevate sümbolite täieliku kirjelduse leiuate, kui külastate aadressi support.illumina.com ja avate oma komplekti vahekaardi *Documentation* (Dokumentatsioon).