

Príbalový leták

NA DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO.

Určené použitie

TruSight™ Whole Genome je kvalitatívne *in vitro* diagnostické zariadenie určené na sekvenovanie celého genómu a detekciu variantov s jedným nukleotidom, inzerciu/delécie, varianty počtu kópií, homozygotné chody, krátke tandemové opakujúce sa expanzie a mitochondriálne variácie ľudskej genómovej DNA extrahovanej z krvi.

Analýza TruSight Whole Genome obsahuje produkt TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes a softvérom TruSight Whole Genome Analysis Application. Prístroj je určený na použitie s kompatibilnými následnými aplikáciami zárodočnej línie na vývoj diagnostických analýz *in vitro* kvalifikovaným laboratórnym personálom a vývojármi analýz.

Analýza TruSight Whole Genome je určená na použitie s NovaSeq™ 6000Dx Instrument.

Zhrnutie a vysvetlenie

TruSight Whole Genome je sekvenčná analýza novej generácie, ktorá používa prípravu knižnice bez PCR na báze tagmentácie, počnúc genómovou DNA (gDNA) extrahovanou z periférnej plnej ľudskej krvi a sekvenovaním a primárnou analýzou na prístroji Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument.

Sekundárna analýza sa vykonáva so softvérom TruSight Whole Genome Analysis Application na dodanom a vyžadovanom serveri Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx a zahŕňa demultiplexovanie, zarovnanie s ľudským referenčným genómom GrCh38/hg38 a stanovenie variantov, ako aj anotáciu a aplikáciu špecifikácií metricky kontroly kvality (QC) v časti [Tabuľka 1](#) na zabezpečenie analytického výkonu. Výstupy analýzy zahŕňajú správy o kontrole kvality a vzorky a súbory vo formáte stanovení variantov (VCF) na použitie s kompatibilným následným terciárnym softvérom na analýzy a vykazovanie.

Analýza TruSight Whole Genome široko hodnotí genomické varianty naprieč kódujúcimi a nekódujúcimi oblasťami ľudského genómu. Hodnotenie variantov zahŕňa detekciu malých variantov, variantov počtu kópií (CNV), homozygotných chodov (ROH) a expanzií krátkych tandemových opakovaní (STR). Okrem toho analýza TruSight Whole Genome deteguje neprítomnosť alely SMN1 c.840C (NM_000344.3:c.840C>T), ktorá by mohla indikovať deléciu génu SMN1 alebo konverziu génu SMN1/SMN2.^{1,2} Bialelická strata génu SMN1 c.840C je zodpovedná za približne 95% prípadov spinálnej svalovej atrofie (SMA).³

Časť [Tabuľka 2](#) uvádza informácie o typoch variantov overených pre analýzu TruSight Whole Genome.

Tabuľka 1 TruSight Whole Genome Špecifikácie metriky kvality

Typ výstupu	Metrika	Špecifikácia
Kontrola kvality chodu sekvenovania	Celkové% \geq Q30	\geq 85,0
Kontrola kvality FASTQ	Výťažok na vzorku (bps)	\geq 90 000 000 000
Kontrola kvality knižnice vzoriek	Priemerné autozomálne pokrytie	\geq 35,0
	Percento autozómov s viac než 20X pokrytím	\geq 93,94
	Normalizované pokrytie pri 60 až 79% GC skupinách	$0,82 \leq x \leq 1,13$
	Normalizované pokrytie pri 20 až 39% GC skupinách	$0,97 \leq x \leq 1,06$
	Priemerné mitochondriálne pokrytie	\geq 500,0
	Percento báz Q30	\geq 85,0
	Odhadovaná kontaminácia vzorky	\leq 0,005

Tabuľka 2 Detegované varianty overené pre analýzu TruSight Whole Genome

Typ variantu	Overená detekcia variantu
Malé varianty	Varianty s jedným nukleotidom (SNV), krátke inzercie/delécie (1 – 31 bp)
Varianty počtu kópií (CNV)	\geq 10 kb prírastky a straty
Chody homozygotnosti (ROH)	\geq 500 kb
Mitochondriálne SNV	% heteroplazmy, ak \geq 4,75%
Expanzie krátkych tandemových opakovaní (STR)	Cielené miesta (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 a TBP)
Variant SMN1	NM_000344.3:c.840C/T

Zásady postupu

Analýza TruSight Whole Genome je určená na prípravu knižníc bez PCR na vytvorenie údajov sekvenovania celého ľudského genómu. Analýza začína prípravou knižníc z kvantifikovanej genómovej DNA extrahovanej z periférnej ľudskej plnej krvi, zahŕňa sekvenovanie a analýzu na zariadení NovaSeq 6000Dx Instrument pomocou softvéru TruSight Whole Genome Analysis Application a končí stanovením variantov a anotáciou.

Postup analýzy TruSight Whole Genome pozostáva z nasledujúcich krokov:

- **Plánovanie dávky a vytváranie chodov** – Pred začatím prípravy knižnice sa dôrazne odporúča naplánovať dávku a chody. V dávke prípravy knižnice možno pripraviť maximálne 24 knižníc vzoriek. Na základe počtu vzoriek možno použiť rôzne konfigurácie prietokových článkov (6-násobné na S2 a 16-násobné na S4). ID skúmavky knižnice, názvy vzoriek a príslušné indexovanie sa zaznamenávajú počas plánovania chodu a vytvárania chodu. Ďalšie informácie o vytvorení chodu nájdete v dokumente TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument č. 200049931). Pri vykonávaní pracovného postupu prípravy knižnice postupujte podľa plánovanej dávky.
- **Príprava na protokol** – Niektoré reagenty sú zmrazené a musia sa ohriať na izbovú teplotu. Vďaka krátkemu pracovnému postupu je možné dokončiť prípravu a spustiť sekvenovanie v ten istý deň. Preto sa počas tohto kroku môže rozmraziť spotrebný materiál na sekvenovanie aj pre plánované chody. Kvantifikované vzorky genómovej DNA sa rozmrazia a zriedia na optimalizovaný vstup DNA.
- **Príprava knižnice**
 - **Tagmentovaná genómová DNA** – Používa Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) na označenie vstupu DNA. Počas tagmentácie je gDNA fragmentovaná, označená adaptérmi a imobilizovaná na povrchu magnetických guľôčok BLT-PF.
 - **Čistenie po tagmentácii** – Vyčistí DNA označenú adaptérmi na produkte BLT-PF a odstráni blokovací pufer, aby bola pripravená na ligáciu indexov.
 - **Ligácia indexov** – Pridá jedinečné duálne indexy do knižníc, aby sa umožnilo multiplexovanie. Vykoná rozšírenie medzery a eluuje jednovláknové knižnice DNA od guľôčok.
 - **Výber veľkosti a čistenie knižníc** – Postup čistenia guľôčok s obojstranným výberom veľkosti odstraňuje príliš malé a príliš veľké fragmenty na dosiahnutie mediánovej dĺžky fragmentu približne 450 bp, rozsah ~360 až 550 bp.
 - **Združovanie a denaturácia knižníc** – Funkcia samonormalizácie produktu BLT-PF umožňuje združovanie podľa objemu bez qPCR alebo inej normalizácie. Špecifikovaný objem každej knižnice je združený podľa plánu pre každý chod a denaturovaný pomocou produktu 0,2N NaOH (zriedený HP3). Denaturovaná skupina sa potom prenesie do skúmavky knižnice NovaSeq 6000Dx s ID, ktoré zodpovedá plánovanému chodu.
- **Sekvenovanie a analýza** – Spotrebný materiál v konfigurácii S2 a/alebo S4 sa vloží do zariadenia NovaSeq 6000Dx Instrument vrátane súvisiacej skúmavky (skúmaviek) knižnice NovaSeq 6000Dx so združenými knižnicami. Po vložení sa naskenuje ID skúmavky knižnice, a ak sa zadáva počas plánovania chodu, použije sa na výber príslušného plánovaného chodu. V opačnom prípade je potrebné manuálne vybrať príslušný plánovaný chod.

Združené knižnice sú následne klastrované na prietokový článok, a následne sekvenované použitím chemického postupu syntetického sekvenovania (SBS) v prístroji NovaSeq 6000Dx. Biochemická technológia SBS pomocou metódy reverzibilného terminátora deteguje fluorescenčne označené bázy s jedným nukleotidom počas ich začleňovania do rastúceho reťazca DNA.

Softvér Real-Time Analysis (RTA) vykonáva primárnu analýzu, ktorá obsahuje stanovenie báz, a ku každému stanoveniu bázy priradí kvalitatívne skóre. Údaje primárnej analýzy sa automaticky prenesú na server Illumina DRAGEN.

Demultiplexovanie a analýza DRAGEN sa vykonávajú automaticky pomocou softvéru TruSight Whole Genome Analysis Application. V rámci tejto analýzy sa každý chod a každá knižnica vzoriek kontrolujú z hľadiska platnosti pomocou analytických metrík opísaných v časti [Kontroly kvality na strane 32](#) a výsledky sa poskytujú v konsolidovaných a individuálnych správach o vzorkách. V prípade platných knižníc vzoriek sa vygenerujú súbory s anotovaným genómom vo formáte Variant Call Format (VCF). Ďalšie informácie o pracovnom postupe analýzy nájdete v dokumente TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument č. 200049931).

Obmedzenia postupu

- Na diagnostické použitie *in vitro*.
- Analýza TruSight Whole Genome je kompatibilná s genómovou DNA získanou z ľudskej periférnej plnej krvi.
- Táto analýza neobsahuje reagenty na extrakciu alebo kvantifikáciu DNA. Výsledky analytických testov vrátane tých z časti [Interferujúce látky na strane 37](#) boli získané s plnou krvou pomocou súprav na extrakciu reprezentatívnej DNA a súprav na kvantifikáciu DNA. Všetky diagnostické testy vyvinuté na použitie s analýzou TruSight Whole Genome si vyžadujú úplné overenie všetkých hľadísk výkonu s vybranou súpravou na extrakciu a kvantifikáciu DNA.
- Táto analýza bola nakonfigurovaná a testovaná pre zložitosť vzoriek a súpravy indexov uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Veľkosť dávky prípravy knižnice	Zložitosť	Konfigurácia chodu	Indexovanie
6, 12, 18 alebo 24 vzoriek	6-násobná	1 – 4 chody S2	Súprava S2 1 až 4
16 vzoriek	16-násobná	1 chod S4	Súprava S4 1 alebo 2
22 vzoriek	16-násobná + 6-násobná	1 chod S4 + 1 chod S2	Súprava S4 1 alebo 2, súprava S2 1 až 4 (nepoužíva sa pre S4)

- Analýza nevynúti pozitívne sledovanie vzorky. Zatiaľ čo súhrnný výsledok kontroly kvality ploidie nahlásený softvérom sa môže voliteľne použiť na identifikáciu výmen vzoriek, nebude identifikovať mužov vymenených za mužov alebo ženy vymenené za ženy.
- Táto analýza poskytuje výlučne validáciu až do výstupu súborov VCF genómu. Všetky diagnostické testy vyvinuté na použitie s analýzou TruSight Whole Genome si vyžadujú úplné overenie všetkých hľadísk výkonu s vybranými následnými aplikáciami.
- Analýza nehlási stanovenia variantu pre vzorky, ktoré nespĺnili kontrolu kvality.
- Analýza definuje úroveň vysokej spoľahlivosti iba pre SNV a inzercie/delécie 1 – 5 bp kvôli prísnyim kritériám použitým na definovanie genomického kontextu ako vysokej spoľahlivosti pre daný typ variantu podľa časti [Stanovenie úroveň spoľahlivosti malých variantov na strane 38](#).

- Analýza je navrhnutá na vyhodnotenie CNV v celom hlásiteľnom genóme bez ohľadu na genomický kontext a vylučuje oblasti s vlastnosťami, ktoré odrážajú obmedzenia referenčného genómu, ako sú centroméry, teloméry a spoločné CNV segregujúce sa v populáciách.
- Výkonnosť analýzy nebola hodnotená pre varianty počtu kópií pod 10 kb.
- Analýza nehlási translokácie, inverzie ani vyvážené preusporiadania.
- Výkonnosť analýzy nebola hodnotená pre inzercie alebo delécie mitochondriálnej DNA (mtDNA).
- Analýza nahlasuje iba výsledky pre miesta STR uvedené v časti [Tabuľka 2](#). Ak skutočná dĺžka expanzie STR prekročí približne 135 bp, pozorovaná dĺžka bude často podhodnotením skutočnej dĺžky z dôvodu technických obmedzení krátkych čítaní, pričom tento účinok je pre FMR1 ešte výraznejší. Keď skutočná dĺžka STR prekročí mediánovú dĺžku fragmentu (~330 bp), odhadovaná dĺžka STR sa ustáli.
- Analýza neuvádza počet kópií SMN1 alebo SMN2.
- Analýza neuvádza vyhlásenia o patogenite detegovaných variantov.

Komponenty produktu

Analýza TruSight Whole Genome pozostáva z nasledujúcich súčastí:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (katalógové č. 20093209)
a
- TruSight Whole Genome Analysis Application (katalógové č. 20106190, inštalované vyškoleným personálom Illumina)

Reagencie

Dodávané reagencie

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, PN 20072256

Názov reagentu	Množstvo	Objem plnenia	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF)	1	460 µl	Gulôčky Streptavidin Magnetic Beads spojené s transpozómami v pufrovanom vodnom roztoku.	-25 °C až -15 °C

Názov reagensie	Množstvo	Objem plnenia	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
Extension Ligation Mix (ELM)	1	1,6 ml	Ligáza, DNA polymeráza a dNTP v pufovanom vodnom roztoku.	-25 °C až -15 °C
2N NaOH (HP3)	1	400 µl	2N roztok hydroxidu sodného (NaOH).	-25 °C až -15 °C
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	290 µl	Pufovaný vodný roztok obsahujúci horčíkovú soľ a dimetylformamid.	-25 °C až -15 °C

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, PN 20072257

Názov reagensie	Množstvo	Objem plnenia	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	41 ml	Pufovaný vodný roztok obsahujúci detergent a soľ.	15 °C až 30 °C
Resuspension Buffer (RSB)	1	20 ml	Pufovaný vodný roztok.	15 °C až 30 °C
Cleanup Beads (CB)	1	10 ml	Paramagnetické guľôčky v pevnej fáze v pufovanom vodnom roztoku.	15 °C až 30 °C
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	1,4 ml	Roztok čistiacieho prostriedku vo vode.	15 °C až 30 °C
Neutralization Buffer (NB)	1	450 µl	Roztok tris-HCl.	15 °C až 30 °C

TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, PN 20072258

Názov reagensie	Množstvo	Objem plnenia	Aktívne látky	Teplota pri uskladnení
UDI PCR-Free (32 Indexes)	1	37 µl	Adaptéry pre jedinečné duálne (UD) indexy usporiadané na platničke.	-25 °C až -15 °C

Vyžadovaný spotrebný materiál, neposkytovaný

- Etanol 100% (kategória 200), trieda vhodná na molekulárnu mikrobiológiu
- Certifikovaná RNase/DNase-free water

- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 cyklov) (katalógové číslo 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 cyklov) (katalógové číslo 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (katalógové č. 20062292)
- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (katalógové č. 20062293)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (katalógové č. 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (katalógové č. 20062291)

Skladovanie a manipulácia

- Izbová teplota je stanovená na 15 °C až 30 °C.
- Ak je niektorý z obalov alebo obsah produktu TruSight Whole Genome Dx Library Prep poškodený alebo narušený, obráťte sa na oddelenie zákazníckeho servisu Illumina.
- Reagencie sú stabilné až do dátumu expirácie uvedeného na označení súprav, ak sa skladujú podľa pokynov. Podmienky skladovania nájdete v časti [Dodávané reagencie na strane 5](#). Komponenty analýzy skladujte pri stanovenej teplote a nepoužívajte reagencie po dátume spotreby. Nezamieňajte komponenty z rôznych šarží súpravy. Šarže súpravy sú označené na štítku škatule.
- Zmeny vo fyzickom vzhľade reagentov môžu naznačovať zhoršenie kvality materiálov. Ak dôjde ku zmenám fyzického vzhľadu (napr. zjavné zmeny farby alebo zakalenie reagentov), reagenty nepoužívajte. Ak je pozorované zrazenie produktu ST2, zahrievajte na 37 °C počas 10 minút a potom miešajte vo vortexe, kým sa zrazenina nerozpustí.
- Stabilita produktu TruSight Whole Genome Dx Library Prep bola hodnotená a jej účinnosť je preukázaná počas maximálne štyroch použití zmrazených skúmaviek pri zmrazení medzi jednotlivými použitiami.

Vybavenie a materiály

Požadované vybavenie, ktoré sa nedodáva

Pred spustením analýzy skontrolujte stav kalibrácie zariadenia.

Zariadenia	Dodávateľ
Vortexový mixér s kapacitou 3000 ot./min., s plochým dnom alebo šálkou	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Inkubátor na mikrovzorky kalibrovaný tak, aby sa zabezpečila presnosť teploty ± 2 °C	SciGene, katalógové č. 1057-30-O (alebo ekvivalentný)

Zariadenia	Dodávateľ
Vložka do inkubátora na mikrovzorky na platničky MIDI s 96 jamkami	illumina, katalógové č. BD-60-601
Mikroodstredivka	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Centrifúga na 96-jamkové mikroplatničky	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Trepačka platničiek s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> Dokáže pretrepávať pri 1800 ot./min Konštanta miešania 2 mm Presnosť miešania ± 25 ot./min. 	VWR, katalógové č. 1808-0506 (alebo ekvivalent)
Tesniaci klin alebo valček	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Magnetický stojan s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> Určený na precipitáciu/separáciu paramagnetických guľôčok Magnety na bočnej strane stojana, nie v jeho dolnej časti Určený pre platničky MIDI s 96 jamkami 	Thermo Fisher Scientific, katalógové č # AM10027 (alebo ekvivalent)
NovaSeq 6000Dx Instrument	illumina, katalógové č 20068232
Presné pipety (jednokanálové): <ul style="list-style-type: none"> 10 μl 20 μl 200 μl 1000 μl 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Presné pipety (8-kanálové): <ul style="list-style-type: none"> 20 μl 200 μl 	
Pipety musia byť pravidelne a presne kalibrované do 5% uvedeného objemu	
Pomôcka pre pipety	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá

Požadované, ale nedodávané materiály

Pred spustením protokolu sa uistite, že máte požadované materiály.

Protokol bol optimalizovaný a overený pomocou uvedených položiek. Porovnateľný výkon nie je zaručený pri použití alternatívnych materiálov.

Materiály	Dodávateľ
Sérologické pipety s objemom 5 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Sérologické pipety s objemom 10 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Adhezívne plomby pre 96-jamkové platničky s nasledujúcimi špecifikáciami: <ul style="list-style-type: none"> • Opticky číry polyester so zlučovacím filmom • Odolné adhezívum, ktoré vydrží viaceré zmeny teploty v rozsahu -40 °C až 110 °C • Bez obsahu DNázy/RNázy 	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skúmavky do mikrodostredivky bez obsahu nukleázy (1,5, 1,7 alebo 2,0 ml, pokiaľ nie je uvedené 0,5 ml)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Nádoby na reagentie bez obsahu nukleázy, 50 ml alebo ekvivalentné (PVC, jednorazový žliabok)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kónické skúmavky, 15 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Kónické skúmavky, 50 ml	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Špičky pipety odolné voči aerosólu, 20 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Špičky pipety odolné voči aerosólu, 200 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Špičky pipety odolné voči aerosólu, 1000 µl	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Skladovacie platničky s 96 jamkami, 0,8 ml (platnička MIDI)	Thermo Fisher Scientific, č. položky AB-0859 (alebo ekvivalent)
96-jamkové PCR platničky, 0,2 ml (polypropylén, bez obsahu RNázy/DNázy, nízka miera viazania)	Všeobecný dodávateľ pre laboratóriá
Vedro na ľad a ľad	Nevzťahuje sa
Kvantifikované vzorky genómovej DNA	Nevzťahuje sa

Odber, preprava a skladovanie vzoriek



UPOZORNENIE

So všetkými vzorkami zaobchádzajte ako s potenciálne infekčnými látkami.

- Pri odbere, preprave, skladovaní a spracovaní vzoriek ľudskej krvi dodržiavajte bezpečnostné postupy vrátane používania OOP.
- Preprava plnej krvi musí byť v súlade s národnými, federálnymi, štátnymi a miestnymi predpismi pre prepravu etiologických látok.

- Odoberte 2 – 5 ml periférnej plnej krvi do skúmaviek EDTA a pred extrakciou uchovávajte pri teplote 2 °C až 8 °C maximálne päť týždňov.
- Pri vzorkách plnej krvi so zvýšeným bilirubínom, hemoglobínom, triglyceridmi, biotínom alebo EDTA sa nepozoroval žiadny nežiaduci účinok na výkonnosť analýzy. Pozrite si časť *Interferujúce látky*.
- Analýza TruSight Whole Genome je kompatibilná s komerčne dostupnými extrakčnými súpravami a protokolmi, ktoré sú vhodné na použitie pri sekvenovaní novej generácie (NGS). Pozrite si časť *Hodnotenie metódy extrakcie DNA na strane 36*.
- Analýza TruSight Whole Genome je kompatibilná s DNA eluovanou v pufovanom roztoku Tris obsahujúcom ≤ 10 mM EDTA, ako je 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 (TE).
- Odporúča sa elúcia a uchovávanie DNA v TE. Kvôli stabilite sa vyhnite skladovaniu vo vode.

Odporúčania pre vstup DNA

- Pred začatím analýzy TruSight Whole Genome kvantifikujte genómovú DNA extrahovanú z plnej krvi pomocou akejkoľvek fluorometrickej metódy kvantifikácie, ktorá používa farbivá viažuce nukleové kyseliny. Odporúča sa, aby sa gDNA pre vzorky určené pre konkrétnu šaržu na prípravu knižnice a chod sekvenovania kvantifikovali spoločne, aby sa eliminovala variabilita medzi dávkami, ak je to možné, alebo aby sa použili kontroly procesu na zabezpečenie ≤ 25% variability kvantifikácie DNA medzi dávkami.
- Nepipetujte malé objemy vzoriek (< 2 µl), aby sa zabezpečila presná kvantifikácia a vstup DNA.
- Analýza TruSight Whole Genome Dx Library Prep vyžaduje dostatok DNA na nasýtenie guľôčok BLT-PF na efektívnu samonormalizáciu výťažností knižnice a optimálny výkon. Z dôvodu variácie výsledkov z rôznych metód kvantifikácie poskytuje nasledujúca tabuľka odporúčaný vstup DNA pre tri metódy kvantifikácie na zabezpečenie optimálneho výkonu analýzy. Použitie iných metód kvantifikácie môže vyžadovať optimalizáciu. Pozrite si časť *Citlivosť vstupu DNA na strane 36*.

Metóda kvantifikácie	Cieľový vstup DNA (ng)	Minimálna koncentrácia zásob DNA
Súprava na analýzu Quant-iT PicoGreen dsDNA	280	11,2 ng/µl
Súprava na analýzu Qubit dsDNA Broad-Range (BR)	280	11,2 ng/µl
Súprava na kvantifikáciu AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA	350	14 ng/µl

Odporúčania týkajúce sa odbornosti

Odbornosť obsluhy a úspešnú implementáciu analýzy je možné vyhodnotiť vykonaním celého pracovného postupu raz podľa návodu na použitie. Tento pracovný postup je možné vykonať buď s jednou prípravou knižnice so 6 vzorkami a chodom sekvenovania pomocou prietokového článku S2, alebo s jednou prípravou knižnice so 16 vzorkami a chodom sekvenovania pomocou prietokového článku S4. Úspech je indikovaný úspešným splnením metrík pre chod a kontrolu kvality knižnice zaznamenaným vo výstupe konsolidovanej správy softvéru TruSight Whole Genome Analysis Application. Pozrite si dokument TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument č. 200049931).

Spoločnosť Illumina odporúča zahrnúť vzorky genómovej DNA extrahovanej z periférnej plnej krvi, ktoré spĺňajú kvalifikačné kritériá koncentrácie a objemu zásob DNA, aby sa preukázala úspešná integrácia analýzy s predchádzajúcimi procesmi laboratória, ako sú odber a uchovávanie vzoriek, a procesy extrakcie a kvantifikácie DNA. Môžu sa použiť aj komerčne dostupné referenčné vzorky genómovej DNA odvodené od jedného ľudského darcu, ako je NA24385/HG002 (Národný inštitút štandardov a konzorcium Genome in a Bottle).

Ak sa vyskytnú problémy, prečítajte si časť [Riešenie problémov na strane 71](#), kde nájdete odporúčané kroky, a obráťte sa na technickú podporu spoločnosti Illumina.

Varovania a preventívne opatrenia

- **Niektoré komponenty tejto analýzy obsahujú potenciálne nebezpečné chemikálie. V dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami môže dôjsť k zraneniam. Noste ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho pláňa, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagensmi manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, štátnymi a miestnymi zákonmi a predpismi.** Informácie o kartách bezpečnostných údajov nájdete na stránke support.illumina.com/sds.html.
- Ihneď nahláste akékoľvek závažné udalosti spojené s týmto výrobkom spoločnosti Illumina a príslušným úradom v členskom štáte, v ktorom sa nachádzajú používateľ aj pacient.
- So všetkými vzorkami narábajte tak, ako keby boli infekčné.
- Použite bežné laboratórne bezpečnostné opatrenia. Pipetovanie nevykonávajte ústami. Nejedzte, nepite ani nefajčite v oblastiach určených na prácu. Pri manipulácii so vzorkami a reagensmi na analýzy noste jednorazové rukavice a laboratórny plášť. Po manipulácii so vzorkami a reagensmi na analýzy si dôkladne umyte ruky.
- Táto analýza obsahuje polyetylén glykol. V dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami môže dôjsť k zraneniam.
- Táto analýza obsahuje hydroxid sodný. V dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami môže dôjsť k zraneniam.
- Postupy prípravy knižnice vyžadujú prostredie bez obsahu RNázy/DNázy. Pomocou čistiaceho prostriedku na inhibíciu RNázy/DNázy dôkladne dekontaminujte pracovné oblasti.

- Používajte skúmavky, platničky, špičky pipiet a nádoby bez obsahu nukleázy.
- Počas analýzy používajte kalibrované vybavenie. Dbajte na to, aby ste kalibrovali vybavenie podľa rýchlostí, teplôt a objemov uvádzaných v tomto protokole.
- Na zaistenie správnosti dávkovania reagensí a vzoriek používajte presné pipety. Kalibráciu vykonávajte pravidelne podľa pokynov výrobcu.
- Používajte vybavenie stanovené pre danú analýzu a programy nastavujte presne podľa pokynov.
- Stanovené teploty inkubátora na mikrovzorky indikujú teplotu reakcie, nemusia indikovať nastavenú teplotu zariadenia.
- Nezamieňajte komponenty súpravy z rôznych šarží TruSight Whole Genome Dx Library Prep. Šarže sú označené na štítku škatule.
- Vyžaduje sa dodržiavanie správnych laboratórnych postupov, aby nedošlo ku kontaminácii reagensí, prístrojov, vzoriek a knižníc nukleázami a produktmi PCR. Kontaminácia spôsobená nukleázou a produktmi PCR môže zapríčiniť nepresné a nespoľahlivé výsledky.
- Na dosiahnutie optimálnej účinnosti analýzy a jej uchovávanie sa vyžaduje správny typ platničky. Dodržiavajte pokyny na prenos platničky uvedené v časti [Návod na použitie na strane 15](#).
- Môže nastať krížová kontaminácia alebo strata vzorky, ak sa tesnenia platničky neaplikujú alebo neodstraňujú opatrne (pozrite si časť [Manipulácia s platničkami na prípravu knižnice na strane 13](#)).
- Nedodržiavanie uvádzaných postupov môže viesť k chybným výsledkom alebo významnému zníženiu kvality knižnice.
- Reagencie alebo komponenty analýzy skladujte pri stanovenej teplote.
- Reagencie neskladujte v beznámrazovej skladovacej jednotke.
- Nepoužívajte nesprávne skladované reagencie.
- Nepoužívajte žiadne súčasti súpravy po uplynutí dátumu expirácie.
- Pripravte produkt 0,2N NaOH (zriedený HP3) čerstvý v deň použitia a po použití zvyšný objem zlikvidujte.
- V deň použitia pripravte čerstvý 80% etanol s produktom RNase/DNase-free water. Etanol dokáže absorbovať vodu zo vzduchu, čo môže ovplyvňovať výsledky. 80% roztok etanolu po použití zlikvidujte v súlade s miestnymi, štátnymi alebo federálnymi nariadeniami. Použite etanol kvality vhodnej na molekulárne biologické analýzy.

Poznámky k procedúre

Tipy a techniky

Dbajte na to, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii.

- Pri pridávaní alebo prenášaní vzoriek vymieňajte špičkami medzi *jednotlivými vzorkami*.
- Pri pridávaní adaptérov alebo primérov s viackanálovou pipetou vymieňajte špičky medzi *každou jamkou*.

- Pri aplikácii a odstraňovaní tesnenia platničiek na pracovnom stole postupujte opatrne, aby ste zabránili krížovej kontaminácii vzorky.
- Aby sa zabránilo kontaminácii, každá indexová jamka je určená na jedno použitie.
- Použite uvedené minimálne objemy žliabku a nevyliievajte zvyšný objem zo žliabku späť do skladovacích skúmaviek, pretože to môže spôsobiť kontamináciu. Je k dispozícii dostatočný objem na podporu pracovného postupu.
- Nezoskupujte knižnice z rôznych príprav.

Presnosť pipetovania

Počas používania multikanálových pipiet postupujte podľa nasledujúcich pokynov:

- Overte, či špičky s bariérou „dobre sedia“ a či sú vhodné z hľadiska značky a modelu viackanálovej pipety.
- Špičky pripevňujte otáčaním a dbajte na to, aby boli všetky riadne nasadené.
- Pri aspirácii dodržiavajte rovnaké hladiny objemu vo všetkých špičkách.
- Viskózne roztoky (BLT-PF, CB, ELM, TWB2) pipetujte pomaly.
- Po dokončení dávkovania skontrolujte, či bola kvapalina nadávkovaná z každej špičky.

Predchádzajte peneniu

- Pipetujte pomaly a na premiešanie prevráťte. Nemiešajte produkty ELM a TWB2 vo vortexe.

Manipulácia s indexovými platničkami

- Prepichnete fóliové tesnenie len pre indexy, ktoré sa použijú.
- S platničkou manipulujte za okraje a nedotýkajte sa fóliového tesnenia ničím iným ako čistými špičkami pipety.
- Jamky, ktoré boli prepichneté, nepoužívajte opakovane.
- Nepoužitý objem (~ 30 µl) po použití zlikvidujte z prepichnetých jamiek indexovej platničky a umiestnite tesnenie na prepichneté jamky, aby nedošlo ku krížovej kontaminácii.
- Tesnenie neumiestňujte na nepoužité jamky, pretože by to bránilo prepichnutiu.

Manipulácia s platničkami na prípravu knižnice

- Platničku vždy utesnite pred uskladnením, pretrepávaním, inkubáciou alebo odstred'ovaním.
- Ak chcete utesniť platničku, pomocou tesniaceho klina alebo valčeka umiestnite adhezívne tesniace pokrytie na platničku.
- Na obmedzenie rizika krížovej kontaminácie a odparovania overte, či sú okraje a jamky úplne utesnené.
- Platničky vždy utesňujte novým adhezívnym tesniacim pokrytím. Tesnenia opakovane nepoužívajte.
- Než začnete opatrne odstraňovať tesnenie, položte platničku na rovný povrch.
- Ak nie je uvedené inak, je možné vykonať kroky s platničkou na magnetu alebo mimo neho.

Prenosy platničiek

- Keď prenášate objemy medzi platničkami, stanovený objem preneste z každej jamky zdrojovej platničky do príslušnej jamky na cieľovej platničke.

Žliabky

- V prípade indikácie je možné použiť žliabky na reagentie. Použite nasledujúce pokyny:
 - Po vortexovaní pripravte žliabok pomocou produktu CB. Nie je potrebné vrátiť produkt CB do skúmavky a miešať vo vortexe pred druhým krokom pridania guľôčok.
 - Označte žliabky s produktom TWB2 a RSB, aby ste predišli zámene.
 - Reagentie zlikvidujte, keď je to uvedené, alebo na konci pracovného postupu.
- Použite odporúčaný objem. Odporúčané objemy zahŕňajú prebytok 1 ml pre mŕtvy objem žliabku.
- Produkty RSB a TWB2 sú balené v podobných skúmavkách. Pred použitím si pozorne prečítajte každý štítok.

Odstred'ovanie

- Odstred'ujte iba v uvedených krokoch postupu na konsolidovanie tekutiny alebo guľôčok v spodnej časti jamky, aby sa zabránilo strate vzorky.

Manipulácia s guľôčkami

- Nezmrazujte Cleanup Beads (CB).
- Keď premývate guľôčky:
 - Na všetky platničky MIDI použite magnetický stojan 96.
 - Kvapalinu dávajte tak, aby na boku jamky nezostali prichytené žiadne guľôčky.
 - Platničku nechajte na magnetickom stojane.
- Reagentie vždy pridávajú do stredu alebo na dno jamky bez porušenia guľôčkovej pelety. Nepridávajú reagentie do hornej časti jamky.
- Suspenzie guľôčok pipetujte pomaly.
- Guľôčky miešajte vo vortexe, kým sa dobre nerozptýlia. Farba kvapaliny musí vyzeráť homogénne. Vo vortexe miešajte, keď je to uvedené v protokole, aby sa zaistilo, že guľôčky budú čase použitia znova rozptýlené v suspenzii.
- Ak sa guľôčky znova nerozptýlia v suspenzii, znova pretrepte.
- Ak aspirujete guľôčky do špičiek pipety, guľôčky nadávajte späť na platničku v magnetickom stojane a počkajte, kým nebude kvapalina priehľadná (2 minúty).
- Uchovávajte vo zvislej polohe, aby ste sa uistili, že sú guľôčky po použití a vrátení do skladu ponorené v pufri.

Kontroly

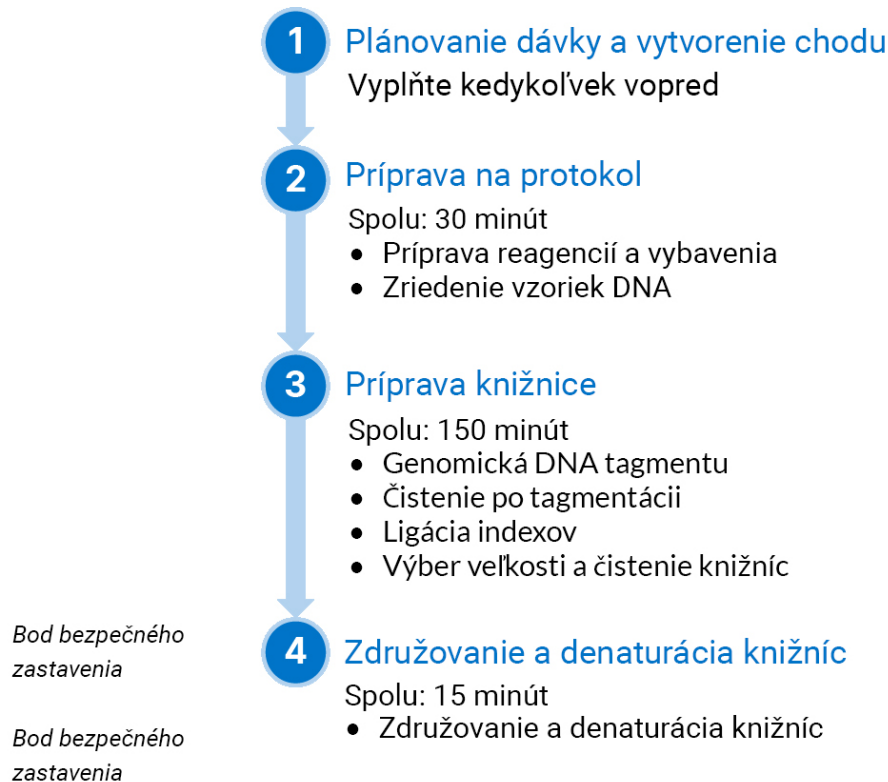
Analýza TruSight Whole Genome používa analytické kontroly zabudované v softvéri TruSight Whole Genome Analysis Application na kvalifikáciu údajov a nevyžaduje použitie externých dávkových kontrol. Viac informácií o metrických špecifikáciách nájdete v časti [Kontroly kvality na strane 32](#).

Návod na použitie

Pracovný postup TruSight Whole Genome Dx Library Prep

Nasledujúci diagram znázorňuje pracovný postup TruSight Whole Genome Dx Library Prep. Medzi jednotlivými krokmi sú vyznačené body bezpečného zastavenia.

Pri zastavení vráťte zvyšné reagenty v pôvodných skúmavkách na ich skladovaciú teplotu uvedenú v časti [Dodávané reagenty na strane 5](#). Ak budete pokračovať, prejdite na ďalšiu časť protokolu s pripravenými reagentami.



Plánovanie dávky a vytvorenie chodu

Naplánujte počet knižníc vzoriek pre dávku a indexovanie a združovanie na chody sekvenovania.

Analýza TruSight Whole Genome bola vyhodnotená a bola preukázaná výkonnosť pre štyri súbory indexov pre prietokový článok S2 (Obrázok 1, Tabuľka 4) a dve súbory indexov pre prietokový článok S4 (Obrázok 2, Tabuľka 5). Softvér vynúti používanie špecifikovaných súprav indexov. Nemiešajte a nekombinujte medzi špecifikovanými súpravami indexov.

Zložitosť sekvenovania mimo týchto odporúčaní nie je podporovaná.

Súbory indexov S2 a S4 spolu podporujú veľkosť šarže na prípravu knižnice 6, 12, 16, 18, 22 a 24 vzoriek. Pre každú veľkosť šarže na prípravu knižnice použite kompatibilné súbory indexov uvedené v časti Tabuľka 3.



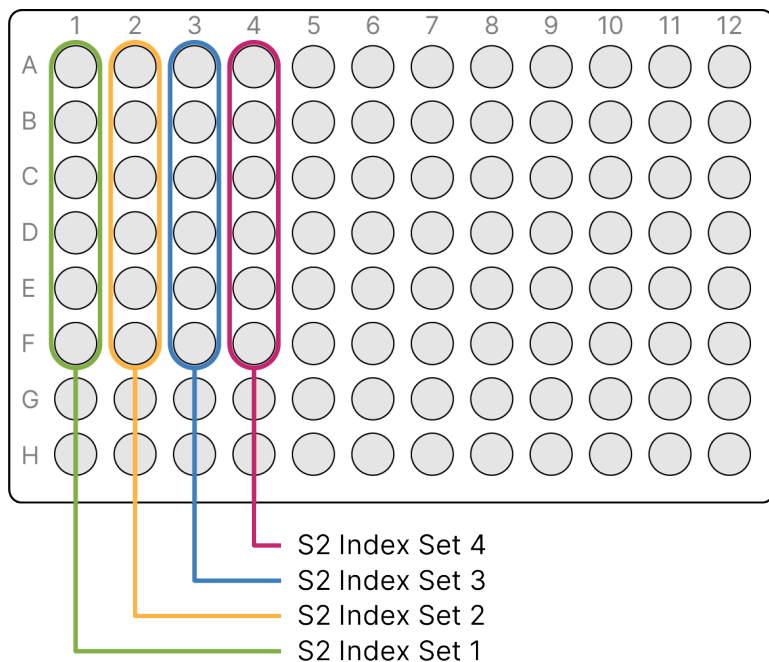
UPOZORNENIE

Usporiadajte vzorky na platničke podľa orientácie, ktorá zodpovedá plánovanej indexácii, t. j. s radom A až H pre 16-násobnú alebo radom A až F pre 6-násobnú. Pomocou viacanálovej pipety pridajte indexy, aby ste sa vyhli preskočeniu jamky alebo pridaniu dvoch súborov indexov do jednej vzorky, čo môže spôsobiť, že nezískate žiadne výsledky, respektíve získate nesprávne výsledky.

Tabuľka 3 Možnosti súpravy indexov pre dávku prípravy knižnice

Veľkosť dávky prípravy knižnice	Súprava indexov	Konfigurácie prietokových článkov
6 vzoriek	Súprava indexov S2 1, 2, 3 alebo 4 (vyberte ľubovoľnú 1 súpravu)	S2 x 1
12 vzoriek	Súprava indexov S2 1, 2, 3 alebo 4 (vyberte ľubovoľné 2 súbory)	S2 x 2
18 vzoriek	Súprava indexov S2 1, 2, 3 alebo 4 (vyberte ľubovoľné 3 súbory)	S2 x 3
24 vzoriek	Súprava indexov S2 1, 2, 3 a 4	S2 x 4
16 vzoriek	Súprava indexov S4 1 alebo 2	S4 x 1
22 vzoriek	Súprava indexov S4 1 + súprava indexov S2 3 alebo 4	S4 x 1 a S2 x 1
	Súprava indexov S4 2 + súprava indexov S2 1 alebo 2	

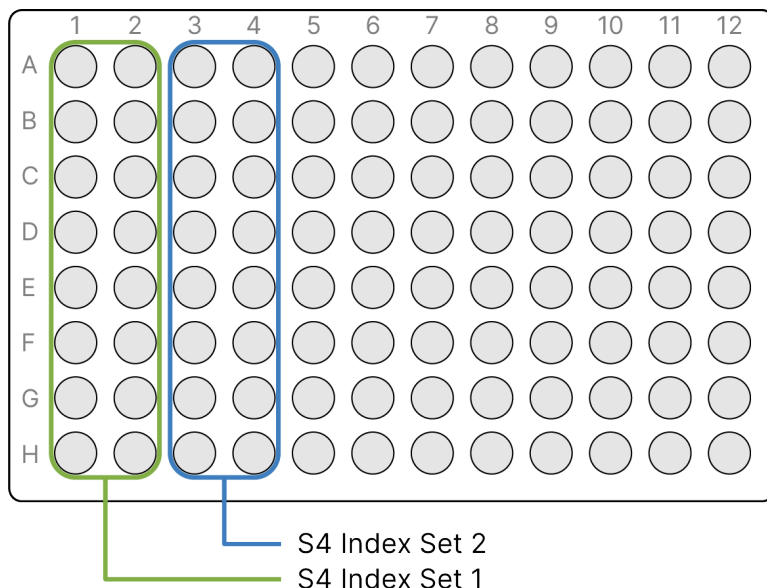
Obrázok 1 Rozloženie indexovej platničky zobrazujúce štyri súbory indexov na sekvenovanie pomocou prietokového článku S2



Tabuľka 4 Súpravy indexov S2 pre prietokový článok S2

	Súprava indexov S2 1 (zelená)	Súprava indexov S2 2 (žltá)	Súprava indexov S2 3 (modrá)	Súprava indexov S2 4 (purpurová)
	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

Obrázok 2 Rozloženie indexovej platničky zobrazujúce dve súbory indexov na sekvenovanie pomocou prietokového článku S4



Tabuľka 5 Súpravy indexov S4 pre prietokový článok S4

	Súprava indexov S4 1 (zelená)		Súprava indexov S4 2 (modrá)	
	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

Zaznamenajte jedinečný názov dávky a údaje vzorky vrátane ID vzorky, ID príslušnej indexovej platničky (pozrite si časť [Príloha A na strane 86](#)), platničky knižnice, ID jamky platničky knižnice a ID skúmvky knižnice (ak je známe). Tieto informácie sa zadávajú počas vytvárania chodu.

Pokyny na vytvorenie chodu pomocou aplikácie nájdete v dokumente TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument č. 200049931). Zaznamenajte názov chodu, ktorý sa má použiť počas vkladania spotrebného materiálu.

**UPOZORNENIE**

Uistite sa, že indexy a súvisiace vzorky použité počas prípravy knižnice sa zhodujú s tými, ktoré boli zaznamenané a použité na vytvorenie chodu. Nezrovnalosti môžu spôsobiť hlásenie nesprávnych výsledkov alebo nezískanie žiadnych výsledkov.

Príprava na protokol

Príprava reagensí a vybavenia

Ak plánujete vykonať sekvenovanie v ten istý deň, rozmrazte spotrebný materiál na sekvenovanie vopred. Podrobné pokyny nájdete v dokumente Produktová dokumentácia k NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument č. 200010105).

1. Predhrejte inkubátor na mikrovzorky pomocou vložky pre platničky MIDI na 47 °C.
2. Vyberte nasledujúce reagensie zo škatule a rozmrazte ich nasledujúcim spôsobom.

Tabuľka 6 Skladovanie pri teplote –25 °C až –15 °C

Reagencia	Názov škatule	Pokyny na rozmrazenie
BLT-PF	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Rozmrazujte pri izbovej teplote 30 minút.
ELM	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Rozmrazujte pri izbovej teplote 30 minút. Potom uchovávajte na ľade, kým nebudú potrebné.
HP3	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Rozmrazujte pri izbovej teplote 30 minút.
TB1	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Rozmrazujte pri izbovej teplote 30 minút.
Indexy UD	TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes	Rozmrazujte pri izbovej teplote 30 minút.

Tabuľka 7 Skladovanie pri teplote 15 °C až 30 °C

Reagencia	Názov škatule	Pokyny na rozmrazenie
CB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Používajte pri izbovej teplote.
RSB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Používajte pri izbovej teplote.
ST2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Používajte pri izbovej teplote.
TWB2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Používajte pri izbovej teplote.
NB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Používajte pri izbovej teplote.

**UPOZORNENIE**

Táto súprava reagensí obsahuje potenciálne nebezpečné chemikálie. V dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami môže dôjsť k zraneniam. Noste ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho plášťa, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagensiami manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, štátnymi a miestnymi zákonmi a predpismi. Ďalšie informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete na karte bezpečnostných údajov na stránke support.illumina.com/sds.html.

Príprava vzoriek DNA

Prípravte nasledujúci spotrebný materiál.

- Kvantifikované vzorky gDNA:
 - a. Preneste do prostredia s izbovou teplotou.
 - b. Krátkym odstredením zhromaždíte kvapky.
 - c. Rozvίrte vortexom alebo pipetujte na premiešanie, a potom krátko odstred'ujte.
- RSB—Vortexujte alebo prevracajte na premiešanie. Uchovávajte pri izbovej teplote.
 - Produkty RSB a TWB2 sú balené v podobných skúmavkách. Pred použitím si pozorne prečítajte každý štítok.

Postup

V závislosti od vstupu DNA, ktorý sa líši v závislosti od použitej kvantifikačnej metódy DNA, vypočítajte objemy potrebné na prípravu zriedených vzoriek DNA. Vzorce sú uvedené nižšie pre tri testované metódy kvantifikácie DNA. Ďalšie informácie nájdete v časti *Odporúčania pre vstup DNA na strane 10* a v časti *Príloha B na strane 89*.

Výpočty predpokladajú minimálny objem pipetovania 2,0 μ l a zahŕňajú 10% prebytku. Zaokrúhľovanie by sa malo vykonať v posledných krokoch po dokončení výpočtov s použitím požadovaného počtu desatinných miest, aby sa zabezpečilo presné pipetovanie.

Možnosť 1: 280 ng Vstup DNA pre metódy kvantifikácie Quant a Qubit Broad Range

Minimálna koncentrácia zásob DNA vzorky je 11,2 ng/ μ l. Vzorky s hodnotou < 11,2 ng/ μ l majú po sekvenovaní vyššiu pravdepodobnosť zlyhania kontroly kvality knižnice. V závislosti od koncentrácie zásob DNA použite jednu z nižšie uvedených rovníc na vykonanie výpočtov.

1. Pri koncentrácii zásob DNA 11,2 až 154,0 ng/ μ l vypočítajte objem zásob DNA a produktu RSB potrebných použitím celkového objemu zriedenej DNA 27,5 μ l (25 μ l plus 10% prebytok) ako konštanty:
 - a. Vypočítajte objem zásob DNA:

$$\begin{aligned} \text{Objem zásob DNA } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{cieľ vstupu DNA (ng)} + 10\% \text{ prebytok})}{\text{Koncentrácia zásob DNA (ng}/\mu\text{l})} \\ &= 280 \text{ ng} \times 1,1 / \text{Koncentrácia zásob DNA (ng}/\mu\text{l}) \\ &= 308 \text{ ng} / \text{Koncentrácia zásob DNA (ng}/\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- b. Vypočítajte objem zásob RSB:

$$\begin{aligned} \text{Objem RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Celkový objem zriedenej DNA } (\mu\text{l}) - \text{vypočítaný objem zásob DNA } (\mu\text{l}) \\ &= 27,5 (\mu\text{l}) - \text{vypočítaný objem zásob DNA } (\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- c. Overte výpočty: Potvrďte vypočítaný objem zásob DNA (μl) + vypočítaný objem RSB (μl) = 27,5 μl , celkový objem zriedenej DNA (konštanta, 25 μl plus 10% prebytok).

2. Prípadne v prípade koncentrácií zásob DNA > 154,0 ng/ μl vypočítajte celkový objem zriedenej DNA a potrebného produktu RSB s použitím objemu zásob DNA 2,0 μl a cieľovej zriedenej koncentrácie zásob DNA 11,2 ng/ μl ako konštanty.

- a. Vypočítajte celkový objem zriedenej DNA:

$$\begin{aligned} \text{Celkový objem zriedenej DNA } (\mu\text{l}) &= \frac{\text{koncentrácia zásob DNA (ng}/\mu\text{l}) \times \text{objem zásob DNA } (\mu\text{l})}{\text{Cieľová zriedená koncentrácia zásob DNA}} \\ &= \text{koncentrácia zásob DNA (ng}/\mu\text{l}) \times 2,0 \mu\text{l} / 11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

- b. Vypočítajte objem RSB:

$$\begin{aligned} \text{Objem RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Vypočítaný celkový objem zriedenej DNA } (\mu\text{l}) - \text{objem zásob DNA } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Vypočítaný celkový objem zriedenej DNA } (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Overte výpočty: Potvrďte vypočítaný celkový objem zriedenej DNA (μl) - vypočítaný objem produktu RSB (μl) = 2,0 μl , objem zásob DNA (konštanta).

Prejdite na krok 3 nižšie.

Možnosť 2: Vstup DNA 350 ng pre metódu kvantifikácie Accuclear Ultra High Sensitivity

Minimálna koncentrácia zásob DNA vzorky je 14,0 ng/ μl . Vzorky s hodnotou < 14,0 ng/ μl majú po sekvenovaní vyššiu pravdepodobnosť zlyhania kontroly kvality knižnice. V závislosti od koncentrácie zásob DNA použite jednu z nižšie uvedených rovníc na vykonanie výpočtov.

1. Pri koncentrácii zásob DNA 14,0 až 192,5 ng/ μl vypočítajte objem zásob DNA a produktu RSB potrebných použitím celkového objemu zriedenej DNA 27,5 μl (25 μl plus 10% prebytok) ako konštanty:

- a. Vypočítajte objem zásob DNA:

$$\begin{aligned} \text{Objem zásob DNA } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{cieľ vstupu DNA (ng)} + 10\% \text{ prebytok})}{\text{Koncentrácia zásob DNA (ng}/\mu\text{l})} \\ &= 350 \text{ ng} \times 1,1 / \text{Koncentrácia zásob DNA (ng}/\mu\text{l}) \\ &= 385 \text{ ng} / \text{Koncentrácia zásob DNA (ng}/\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- b. Vypočítajte objem zásob RSB:

$$\begin{aligned} \text{Objem RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Celkový objem zriedenej DNA } (\mu\text{l}) - \text{vypočítaný objem zásob DNA } (\mu\text{l}) \\ &= 27,5 (\mu\text{l}) - \text{vypočítaný objem zásob DNA } (\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- c. Overte výpočty: Potvrďte vypočítaný objem zásob DNA (μl) + vypočítaný objem RSB (μl) = 27,5 μl , celkový objem zriedenej DNA (konštanta, 25 μl plus 10% prebytok).
2. Prípadne v prípade koncentrácií zásob DNA > 192,5 ng/ μl vypočítajte celkový objem zriedenej DNA a potrebného produktu RSB s použitím objemu zásob DNA 2,0 μl ako konštanty.
- a. Vypočítajte celkový objem zriedenej DNA:

$$\text{Celkový objem zriedenej DNA } (\mu\text{l}) = \frac{\text{koncentrácia zásob DNA (ng/}\mu\text{l}) \times 2,0 \mu\text{l}}{14,0 \text{ ng/}\mu\text{l}}$$

- b. Vypočítajte objem RSB:

$$\begin{aligned} \text{Objem RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Celkový objem zriedenej DNA } (\mu\text{l}) - \text{objem zásob DNA } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Celkový objem zriedenej DNA } (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Overte výpočty: Potvrďte vypočítaný celkový objem zriedenej DNA (μl) - vypočítaný objem produktu RSB (μl) = 2,0 μl , objem zásob DNA (konštanta).
3. Označte novú 0,5 ml skúmavku do mikroadstredivky pre každú zriedenú vzorku.
4. Pridajte objem produktu RSB vypočítaný vyššie do príslušnej skúmavky pre každú zriedenú vzorku.
5. Pridajte objem zásob DNA vypočítaný vyššie do príslušnej skúmavky pre každú zriedenú vzorku.
6. Rozvírte pomocou impulzov vo vortexe a potom krátko odstred'te.

Príprava knižnice

Pomocou krokov prípravy v tejto časti vopred pripravte reagenty.

Ak nie je určený bod bezpečného zastavenia, ihneď prejdite na ďalší krok.

Príprava

Prípravte nasledujúci spotrebný materiál:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free) – Premiešajte vo vortexe. Ak používate viacero skúmaviek, miešajte vo vortexe, aby ste ich premiešali, a potom skombinujte.
- TB1 (Tagmentation Buffer 1):
 - a. Vírením premiešajte.
 - b. Krátko odstred'te.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
 - a. Skontrolujte výskyt zrazenín. Ak spozorujete zrazeniny, zohrievajte ich 10 minút pri teplote 37 °C, a potom miešajte, kým sa zrazeniny nerozpustia.
 - b. Dôkladne premiešajte vo vortexe a potom krátko odstred'te.

- ELM (Extension Ligation Mix):
 - a. Prevrátením premiešajte. Nemiešajte vo vortexe.
 - b. Uchovávajte na ľade až do použitia.
- HP3 (2N NaOH):
 - a. Vírte a potom krátko odstred'te.
 - b. Uchovávajte pri izbovej teplote.
- NB (Neutralization Buffer):
 - a. Vírte a potom krátko odstred'te.
 - b. Uchovávajte pri izbovej teplote.
- CB (Cleanup Beads):
 - a. Miešajte vo vortexe 1 minútu.
 - b. Prevráťte 2- až 5-krát a potom dôkladne premiešajte na vortexe, na rozptýlenie v suspenzii.
- Adaptéry indexov (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
 - a. Vírte a potom krátko odstred'te.
 - b. Uchovávajte pri izbovej teplote.
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
 - a. Označte uzáver skúmavky ako TWB2.
 - b. Dôkladne prevracajte na premiešanie.
- V skúmavke do mikroadstredivky označenej ako 0,2N NaOH skombinujte nasledujúce objemy a pripravte produkt 0,2N NaOH podľa plánovanej veľkosti šarže. Vírením premiešajte.

POZNÁMKA Ak plánujete združovať a denaturovať knižnice v ten istý deň, pripravte ďalší produkt 0,2N NaOH. Pozrite si časť [Príprava na strane 30](#).

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

- V 15 ml kónickej skúmavke kombinujte nasledujúce objemy na prípravu 80% EtOH podľa plánovanej veľkosti šarže. Prirátaný je prebytok pre použitie v žliabku. Vírením premiešajte.

Reagencia	6 vzoriek (ml)	12 vzoriek (ml)	16 vzoriek (ml)	18 vzoriek (ml)	22 vzoriek (ml)	24 vzoriek (ml)
100% etanol, čistý (kategória 200)	4	8	8	12	12	12
Voda bez nukleáz	1	2	2	3	3	3



UPOZORNENIE

Táto súprava reagensí obsahuje potenciálne nebezpečné chemikálie. V dôsledku vdýchnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu s očami môže dôjsť k zraneniam. Noste ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho pláštia, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagensiami manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, štátnymi a miestnymi zákonmi a predpismi. Ďalšie informácie o ochrane životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete na karte bezpečnostných údajov na stránke support.illumina.com/sds.html.

Genomická DNA tagmentu

Tento krok používa Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) na označenie DNA, čo je proces, ktorý fragmentuje a označuje DNA pomocou sekvencií adaptérov.

Spotrebný materiál

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

Postup

1. Potvrďte, že je inkubátor na mikrovzorky s vložkou pre platničky MIDI zohriaty na 47 °C.
2. Označte novú platničku MIDI s 96 jamkami ako LP1 (Library Plate 1).
3. Označte a zaznamenajte ID jamiek na vzorky na tagmentáciu zriedených vzoriek DNA a reagensí.
4. Preneste 25 µl zriedenej vzorky DNA do každej jamky.
5. Do každej jamky pridajte 10 µl produktu TB1.
6. Vírte produkt BLT-PF silno pomocou vortexu 1 minútu, aby sa rozptýli v suspenzii. Neodstredujte. Podľa potreby zopakujte.
7. Do každej jamky pridajte 15 µl produktu BLT-PF.
8. Utesnite a traste LP1 rýchlosťou 1800 ot./min. počas 1 minúty.
9. Inkubujte LP1 8 minút v nahriatom inkubátore na mikrovzorky pri teplote 47 °C.

POZNÁMKA Očakáva sa ľahká kondenzácia na tesnení platničky. Neodstredujte.

10. Odstráňte tesnenie a do každej jamky pridajte 10 µl produktu ST2.
11. Utesnite a traste LP1 rýchlosťou 1800 ot./min počas 1 minúty, potom prejdite na ďalší krok.

Čistenie po tagmentácii

Nasledujúce kroky prepláchnu neviazanú DNA a vykonajú výmenu pufru v rámci prípravy na ďalší krok.

Spotrebný materiál

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Žliabok

Informácie o reagensiach

- Produkt TWB2 pipetujte pomaly, aby sa minimalizovalo penenie.
- Produkty RSB a TWB2 sú balené v podobných skúmavkách. Pred použitím si pozorne prečítajte každý štítok.

Postup

1. Odstráňte tesnenie a umiestnite LP1 na magnetický stojan a čakajte, kým nebude tekutina číra (2 minúty).
2. Pripravte žliabok s produktom TWB2 s objemami podľa nasledujúcej tabuľky a jasne označte žliabok ako TWB2. Objemy zahŕňajú prebytok 1 ml pre mŕtvy objem žliabku. Ponechajte si žliabok pre neskoršie kroky.

Reagencia	6 vzoriek (µl)	12 vzoriek (µl)	16 vzoriek (µl)	18 vzoriek (µl)	22 vzoriek (µl)	24 vzoriek (µl)
TWB2	3700	6400	8200	9100	10900	11800

3. S LP1 na magnetickom stojane pomocou viackanálovej pipety nastavenej na 60 µl odstráňte a zlikvidujte supernatant z každej jamky bez narušenia guľôčkovej pelety.
4. Pomocou viackanálovej pipety pridajte do každej jamky 150 µl produktu TWB2.
5. Utesnite a traste LP1 rýchlosťou 1800 ot./min. počas 1 minúty.
6. Odstráňte tesnenie a umiestnite LP1 na magnetický stojan a čakajte, kým nebude tekutina číra (2 minúty).
7. Počas inkubácie sa vráťte produkt BLT-PF do skladovacej mrazničky a potom pokračujte ďalším krokom.

Ligácia indexov

V tejto časti používateľa ligujú adaptéry jedinečných dvojitých indexov ku každej vzorke podľa indexácie naplánovanej počas kroku [Plánovanie dávky a vytvorenie chodu na strane 15](#).

Spotrebný materiál

- ELM (Extension Ligation Mix)
- Adaptéry indexov (UDI PCR-Free (32 Indexes))
- Žliabok TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- 0,2N NaOH (zriedené HP3)

Informácie o reagensoch

- Jamky indexovej platničky nie je možné opätovne použiť.
- Produkt ELM aspirujte a dávajte pomaly z dôvodu viskozity roztoku.
- Produkty RSB a TWB2 sú balené v podobných skúmavkách. Pred použitím si pozorne prečítajte každý štítok.

Postup

1. Nechajte LP1 na magnetickom stojane a vykonajte nasledujúce kroky:
 - a. Pomocou viackanálovej pipety nastavenej na 150 µl odstráňte a zlikvidujte všetok supernatant z každej jamky.
 - b. Bez narušenia guľôčkovej pelety pomocou pipety nastavenej na 20 µl odstráňte a zlikvidujte zvyškový produkt TWB2 z každej jamky.
 - c. Do každej jamky pridajte 45 µl produktu ELM.
 - d. Prepichnete fóliové tesnenie na platničke s adaptérmi indexov pre každú z plánovaných indexových jamiek pomocou viackanálovej pipety P200 a nových špičiek pipety. Aby nedošlo ku kontaminácii, pre každú jamku použite novú špičku pipety.
 - e. Pridajte 5 µl adaptéry indexov do príslušných jamiek na vzorky LP1 podľa indexov zvolených počas plánovania dávky pomocou viackanálovej pipety P-10 alebo P-20.
2. Utesnite a traste LP1 rýchlosťou 1800 ot./min. počas 1 minúty.
3. Inkubujte LP1 8 minút v nahriatom inkubátore na mikrovzorky pri teplote 47 °C.

POZNÁMKA Očakáva sa ľahká kondenzácia na tesnení platničky. Neodstredujte.

4. Počas inkubácie vráťte produkt ELM do skladovacej mrazničky.
5. Odstráňte tesnenie a umiestnite LP1 na magnetický stojan a čakajte, kým nebude tekutina číra (2 minúty).
6. S LP1 na magnetickom stojane pomocou viackanálovej pipety nastavenej na 50 µl odstráňte a zlikvidujte supernatant z každej jamky bez narušenia guľôčkovej pelety.
7. Guľôčky premyte podľa nasledujúceho postupu.
 - a. Pomocou viackanálovej pipety pridajte 150 µl produktu TWB2 na guľôčky v každej jamke.
 - b. Utesnite a traste LP1 rýchlosťou 1800 ot./min. počas 1 minúty.
 - c. Odstráňte tesnenie a umiestnite LP1 na magnetický stojan a čakajte, kým nebude tekutina číra (2 minúty).
 - d. S LP1 na magnetickom stojane pomocou viackanálovej pipety nastavenej na 150 µl odstráňte a zlikvidujte supernatant z každej jamky bez narušenia guľôčkovej pelety.
8. Guľôčky **druhý** raz premyte.
9. S LP1 na magnetickom stojane pomocou viackanálovej pipety nastavenej na 20 µl odstráňte a zlikvidujte zvyškový produkt TWB2 z každej jamky bez narušenia guľôčkovej pelety.
10. Do každej jamky pridajte 45 µl predtým pripraveného produktu 0,2N NaOH.
11. Utesnite a traste LP1 rýchlosťou 1800 ot./min počas 1 minúty, potom prejdite na ďalšiu časť.

Výber veľkosti a čistenie knižníc

Tento krok používa obojstranný výber veľkosti knižníc. V prvom kroku sa produkt Cleanup Beads pridá do eluovaných knižníc a guľôčok BLT-PF. Potom sa supernatant obsahujúci eluovanú jednovláknovú knižnicu preniesie na novú platničku, zatiaľ čo fragmenty, ktoré sú príliš veľké, zostanú neprenesené. V druhom kroku sa pridá produkt Cleanup Beads do prenesených knižníc a odstránia sa príliš malé fragmenty. Potom sa knižnice eluujú a preniesú na platničku konečnej knižnice (FLP).

Spotrebný materiál

- 96-jamková platnička MIDI
- Žliabky (3)
- PCR platnička
- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Čerstvo pripravený 80% etanol (80% EtOH)

Príprava

1. Premiešajte produkt CB vo vortexe a potom prevracajte, kým sa úplne nerozptýli v suspenzii.

2. Pripravte žliabok s produktom CB s objemami podľa nasledujúcej tabuľky a označte žliabok ako CB. Objemy sú dostatočné pre oba kroky pridania a obsahujú prebytok 1 ml v žliabku pre mŕtvy objem žliabku. Medzi krokmi pridania produktu CB nie je potrebné miešať. Gulôčky zostanú rozptýlené počas celého postupu.

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

Postup

1. Odstráňte tesnenie a pridajte 40 μ l CB do jamiek platničky LP1 MIDI obsahujúcej produkt BLT-PF a 0,2N NaOH.
2. Utesnite a traste LP1 rýchlosťou 1800 ot./min. počas 1 minúty.
3. Inkubujte LP1 mimo magnetického stojana 2 minúty pri izbovej teplote.
4. Odstráňte tesnenie a umiestnite LP1 na magnetický stojan a čakajte, kým nebude tekutina číra (5 minúty).
5. Počas inkubácie platničky označte novú 96-jamkovú platničku MIDI LP2.
6. Pomocou viackanálovej pipety *preneste* 80 μ l supernatantu z LP1 na magnetickom stojane do príslušných jamiek LP2.
7. Pridajte 40 μ l produktu CB do každej jamky platničky LP2 MIDI.
8. Utesnite a traste LP2 rýchlosťou 1800 ot./min. počas 1 minúty.
9. Platničku LP1 MIDI zlikvidujte.
10. Inkubujte LP2 mimo magnetického stojana 2 minúty pri izbovej teplote.
11. Odstráňte tesnenie a umiestnite LP2 na magnetický stojan a čakajte, kým nebude tekutina číra (5 minúty).
12. S LP2 na magnetickom stojane pomocou viackanálovej pipety nastavenej na 120 μ l odstráňte a zlikvidujte supernatant z každej jamky bez narušenia gulôčkovej pelety.
13. Nalejte predtým pripravený roztok 80% EtOH do označeného žliabku a preplachujte gulôčky s LP2 na magnetickom stojane nasledujúcim spôsobom.
 - a. Pomocou viackanálovej pipety pridajte 180 μ l 80% EtOH.
 - b. Počkajte 30 sekúnd.
 - c. Pomocou viackanálovej pipety nastavenej na 180 μ l odstráňte a zlikvidujte supernatant z každej jamky bez narušenia gulôčkovej pelety.
14. Gulôčky **druhý** raz premyte.
15. S LP2 na magnetickom stojane pomocou viackanálovej pipety nastavenej na 20 μ l odstráňte a zlikvidujte zvyškový EtOH z každej jamky bez narušenia gulôčkovej pelety.
16. Ponechajte LP2 na magnetickom stojane a nechajte schnúť na vzduchu 4 minúty.
17. Nepoužitý 80% EtOH a žliabok zlikvidujte.
18. Pripravte žliabok s produktom RSB s objemami podľa nasledujúcej tabuľky a označte žliabok ako RSB. Objemy zahŕňajú prebytok 1 ml pre mŕtvy objem žliabku.

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

19. Pridajte 65 μ l produktu RSB na guľôčky v každej jamke.
20. Utesnite a traste LP2 rýchlosťou 1800 ot./min. počas 1 minúty.
21. Inkubujte LP2 pri izbovej teplote 2 minúty.
22. Odstráňte tesnenie a umiestnite LP2 na magnetický stojan a čakajte, kým nebude tekutina číra (2 minúty).
23. Označte novú PCR platničku ako FLP (platnička konečnej knižnice) s názvom dávky použitým pri vytváraní chodu.
24. Pomocou viackanálovej pipety *preneste* 60 μ l supernatantu z LP2 na magnetickom stojane do príslušných jamiek FLP.



UPOZORNENIE

Supernatant obsahuje konečnú knižnicu a bude sa používať počas kroku združovania a denaturácie. Nelikvidujte.

25. Zlikvidujte všetky žliabky spolu s nepoužitými reagensmi v žliabkoch.
26. Zlikvidujte platničku LP2 MIDI.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Pri zastavení utesnite platničku konečnej knižnice (FLP) tesnením Microseal B a skladujte pri teplote od -25 °C do -15 °C po dobu najviac 14 dní.

Združovanie a denaturácia knižníc

V tejto časti používateľa vytvárajú skupiny naplánované v časti [Plánovanie dávky a vytvorenie chodu na strane 15](#) a vykonávajú riedenie a denaturáciu.

Spotrebný materiál

- Produkt HP3 (2N NaOH) alebo 0,2N NaOH ak je pripravený v ten istý deň – miešajte vo vortexe a potom krátko odstred'ujte.
- NB (Neutralization Buffer) – Miešajte vo vortexe a potom krátko odstred'ujte.
- RSB (Resuspension Buffer) – Miešajte vo vortexe alebo prevracajte.
- Skúmavky do mikroadstredivky (1 na prípravu reagensí a 1 pre každú plánovanú skupinu knižníc)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (PN 20062290 alebo PN 20062291) (1 skúmavka pre každú plánovanú skupinu knižníc)

Príprava

- Zmiešajte nasledovné objemy v skúmavke do mikroadstredivky na prípravu produktu 0,2N NaOH. Označte skúmavku 0,2N NaOH. Ak bol počas prípravy knižnice pripravený ďalšie produkt 0,2N NaOH a protokol sa vykoná v ten istý deň, tento krok preskočte.

Aby sa zabránilo malým chybám pipetovania, pripraví sa objem navyše.

Reagencia	Objem pre každý prietokový článok S2 (µl)	Objem pre každý prietokový článok S4 (µl)
HP3	5	10
RSB	45	90

- Vírite a potom krátko odstredíte.

Postup

- Ak bola platnička FLP uskladnená zmrazená, pripravte ju nasledujúcim spôsobom. V opačnom prípade prejdite na krok 2.

Platnička FLP:

- Rozmrazujte pri izbovej teplote 30 minút.
 - Odstredujte pri otáčkach 1000 × g po dobu 1 minúty.
 - Odstráňte tesnenie z FLP.
 - Pomocou viackanálovej pipety nastavenej na 30 µl pipetou premiešajte každú vzorku 5- až 10-krát.
 - Utesnite a odstredujte pri otáčkach 1000 × g po dobu 1 minúty.
- Vyberte jednu z nasledujúcich možností na združenie, denaturáciu a riedenie knižníc pre každú súpravu 6 alebo 16 vzoriek plánovaných na sekvenovanie.

Možnosť 1 Sekvenovanie 6 knižníc v prietokovom článku S2.

- Pre každú skupinu knižníc označte novú skúmavku do mikroadstredivky názvom skupiny, napríklad združené knižnice (PL) 1, 2, 3 atď.
- Odstráňte tesnenie a preneste 25 µl každej knižnice DNA s čiarovým kódom z danej súpravy indexov S2 z platničky FLP do skúmavky PL pre každý príslušný plánovaný chod podľa skupín sekvenovania plánovaných počas kroku [Plánovanie dávky a vytvorenie chodu na strane 15](#). Skombinujte napríklad knižnice pripravené pomocou súpravy indexov S2 1 do skúmavky PL.
- Na platničku FLP umiestnite adhezívne tesnenie platničky a vráťte platničku na miesto uskladnenia.
- Do každej skúmavky PL pridajte 37 µl produktu 0,2N NaOH.
- Každú skúmavku PL premiešajte vo vortexe. Krátko odstredíte.
- Inkubujte každú skúmavku PL pri izbovej teplote 8 minút.
- Do každej skúmavky PL pridajte 38 µl produktu NB.
- Každú skúmavku PL premiešajte vo vortexe. Krátko odstredíte.
- Preneste 225 µl denaturovanej, zriedenej knižnice do čistej skúmavky knižnice NovaSeq 6000Dx.

**UPOZORNENIE**

Ak bolo vopred špecifikované, na identifikáciu a priradenie plánovaného chodu sa použije ID skúmavky knižnice NovaSeq 6000Dx. Uistite sa, že ID skúmavky knižnice, do ktorej sa skupina prenesie, je rovnaké ako ID skúmavky knižnice, ktoré bolo uvedené v časti Create Run (Vytvorenie chodu), inak môže dôjsť k nesprávnemu priradeniu výsledkov vzorky. Ak je v naplánovanom chode špecifikované ID skúmavky knižnice, skontrolujte, či sa používa správna skúmavka. Ak ste to ešte nešpecifikovali, zaznamenajte ID použitej skúmavky knižnice a revidujte plánovaný chod. V opačnom prípade bude pri načítavaní prístroja potrebné pomocou názvu chodu vybrať príslušný plánovaný chod (chody) manuálne.

Možnosť 2 Sekvenovanie 16 knižníc v prietokovom článku S4.

- a. Označte novú skúmavku do mikroadstredivky názvom skupiny, napríklad združené knižnice (PL) 1, 2, 3 atď.
- b. Odstráňte tesnenie a preneste 18 µl každej knižnice DNA z platničky FLP do skúmavky PL podľa skupín sekvenovania plánovaných počas kroku *Plánovanie dávky a vytvorenie chodu na strane 15*. Skombinujte napríklad knižnice so súpravou indexov S2 1 do skúmavky PL.
- c. Na platničku FLP umiestnite adhezívne tesnenie platničky a vráťte platničku na miesto uskladnenia.
- d. Do skúmavky PL pridajte 22 µl produktu RSB.
- e. Do skúmavky PL pridajte 77 µl produktu 0,2N NaOH.
- f. Obsah skúmavky PL premiešajte vo vortexe. Krátko odstred'te.
- g. Inkubujte skúmavku PL pri izbovej teplote 8 minút.
- h. Do skúmavky PL pridajte 78 µl pufra NB.
- i. Obsah skúmavky PL premiešajte vo vortexe. Krátko odstred'te.
- j. Preneste 465 µl denaturovanej, zriedenej knižnice do čistej skúmavky knižnice NovaSeq 6000Dx.

**UPOZORNENIE**

Ak bolo vopred špecifikované, na identifikáciu a priradenie plánovaného chodu sa použije ID skúmavky knižnice NovaSeq 6000Dx. Uistite sa, že ID skúmavky knižnice, do ktorej sa skupina prenesie, je rovnaké ako ID skúmavky knižnice, ktoré bolo uvedené v časti Create Run (Vytvorenie chodu), inak môže dôjsť k nesprávnemu priradeniu výsledkov vzorky. Ak je v naplánovanom chode špecifikované ID skúmavky knižnice, skontrolujte, či sa používa správna skúmavka. Ak ste to ešte nešpecifikovali, zaznamenajte ID použitej skúmavky knižnice a revidujte plánovaný chod. V opačnom prípade bude pri načítavaní prístroja potrebné pomocou názvu chodu vybrať príslušný plánovaný chod (chody) manuálne.

3. Ak plánujete spustiť chod v ten istý deň, prejdite priamo na sekvenovanie.

BOD BEZPEČNÉHO ZASTAVENIA

Pri zastavení uzavrite skúmavku knižnice NovaSeq 6000Dx a uchovávajte pri teplote -25 °C až -15 °C až 30 dní.

Príprava na sekvenovanie

1. Postupujte podľa pokynov na prípravu uvedených v dokumente Produktová dokumentácia k NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument č. 200010105) pre spotrebný materiál v súprave plánovanej na sekvenovanie.
2. Ak bola skúmavka knižnice NovaSeq 6000Dx obsahujúca zoskupenú knižnicu uskladnená zmrazená, pripravte ju nasledovne. Ak budete pokračovať priamo z predchádzajúcej časti, prejdite na krok [3](#).
 - a. Rozmrazujte pri izbovej teplote 30 minút.
 - b. Odstráňte uzáver a opatrne pipetujte zmes päťkrát pomocou pipety P1000 nastavenej na 300 µl pre skupinu knižníc prietokových článkov S4 alebo pipety P200 nastavenej na 145 µl pre skupinu knižníc prietokových článkov S2.
 - c. Uzavrite skúmavku knižnice NovaSeq 6000Dx a ručne straste všetky kvapôčky na dno. Nemiešajte pomocou vortexu ani neodstred'ujte.
3. Vložte spotrebný materiál. Podrobnosti nájdete v dokumente Produktová dokumentácia k NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument č. 200010105).

Interpretácia výsledkov

Analýza TruSight Whole Genome je navrhnutá tak, aby sekvenovala celý ľudský genóm. Varianty sa uvádzajú pre vzorky, ktoré prejdú analytickými kontrolami kvality (QC) na použitie s následnými zárodočnými aplikáciami terciárnej analýzy.

- Výsledok sekvenovania, FASTQ alebo kvality vzorky sa považuje za platný iba vtedy, ak metrika kvality spĺňa alebo prekračuje stanovenú špecifikáciu. Ak je metrika kvality pod definovanou špecifikáciou, výkon sa bude hlásiť ako FAIL (ZLYHANIE) a vzorka sa musí zopakovať. Informácie o špecifikáciách metriky kvality použitých na určenie platnosti vzorky nájdete v časti [Kontroly kvality na strane 32](#).
- Očakáva sa, že vzorky, ktoré prejdú všetkými prahovými hodnotami kvality, poskytnú výkon stanovenia variantu opísaný v štúdiu presnosti (pozrite si časť [Správnosť na strane 42](#)).
- Malé varianty sú označené vysokou, strednou alebo nízkou spoľahlivosťou na základe očakávaného výkonu každého typu variantu (pozrite si časť [Stanovenie úrovně spoľahlivosti malých variantov na strane 38](#)).
- Interpretáciu všetkých informácií o variante musí laboratórium overiť pomocou poskytnutých výstupných súborov analýzy. Popis informácií poskytnutých vo výstupných súboroch nájdete v dokumente TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument č. 200049931).

Kontroly kvality

Chod sekvenovania a platnosť vzoriek sa určujú automaticky pomocou analytických kontrol a sú hlásené softvérom TruSight Whole Genome Analysis Application (ďalšie podrobnosti o metrických špecifikáciách kontroly kvality nájdete v časti [Tabuľka 8](#)). Analýza TruSight Whole Genome nevyžaduje použitie externých

pozitívnych kontrol.

- Výsledky kontroly kvality sa uvádzajú v konsolidovanej správe, pre všetky vzorky v chode a v jednotlivých správach kontroly kvality vzoriek. Správy softvér ukladá do priečinka analýzy. Umiestnenie priečinka analýzy a priečinka chodu nájdete v dokumente TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument č. 200049931).
- Zlyhanie špecifikácie kontroly kvality chodu sekvenovania zruší platnosť chodu sekvenovania a zastaví ďalšiu analýzu.
- Zlyhanie akejkoľvek špecifikácie vzorky FASTQ alebo knižnice zneplatní knižnicu vzoriek a zabráni vytvoreniu súvisiacich súborov CRAM alebo VCF.
- Môžu byť potrebné ďalšie kroky kontroly kvality v súlade s miestnymi, štátnymi a federálnymi nariadeniami alebo regulačnými požiadavkami.

Ďalšie informácie o opakovaní chodov sekvenovania alebo prípravy knižníc nájdete v časti [Riešenie problémov na strane 71](#).

Tabuľka 8 TruSight Whole Genome Popisy metrických parametrov kontroly kvality

	Metrika	Špecifikácia	Popis
Kontrola kvality chodu sekvenovania	Celkové% \geq Q30	\geq 85	Meranie kvality bázy na úrovni chodu. Je nastavená minimálna špecifikácia, pretože príliš nízke množstvo chodov%Q30 nesplní bázy Q30 pri kontrole kvality knižnice vzoriek.
Kontrola kvality FASTQ	Výťažok na vzorku (bps)	\geq 90 000 000 000	Minimálna hodnota je nastavená na ekvivalent ~26-násobného priemerného autozomálneho pokrytia na triedenie vzoriek, ktoré neprejdú kontrolou kvality knižnice, aby sa skrátil čas analýzy.

	Metrika	Špecifikácia	Popis
Kontrola kvality knižnice vzoriek	Priemerné autozomálne pokrytie	≥ 35	Priemerné pokrytie autozómov. Na zabezpečenie analytickej výkonnosti je nastavená minimálna špecifikácia.
	Percento autozómov s viac než 20X pokrytím	$\geq 93,94$	Meranie rovnomernosti pokrytia, ktoré zisťuje problémy, ktoré nemusia nevyhnutne súvisieť so skreslením GC. Na zabezpečenie analytickej výkonnosti je nastavená minimálna špecifikácia.
	Normalizované pokrytie pri 60 až 79% GC skupinách	$0,82 \leq x \leq 1,13$	Meranie rovnomernosti pokrytia, ktoré deteguje skreslenie GC, konkrétne stratu pokrytia v oblastiach genómu so zložením báz s vyšším%GC a nižším%AT. Na zabezpečenie analytickej výkonnosti sú nastavené minimálne a maximálne špecifikácie.
	Normalizované pokrytie pri 20 až 39% GC skupinách	$0,97 \leq x \leq 1,06$	Meranie rovnomernosti pokrytia, ktoré deteguje skreslenie GC, konkrétne stratu pokrytia v oblastiach genómu so zložením báz s nižším%GC a vyšším%AT. Na zabezpečenie analytickej výkonnosti sú nastavené minimálne a maximálne špecifikácie.
	Priemerné mitochondriálne pokrytie	≥ 500	Pokrytie mitochondriálneho chromozómu. Je stanovená minimálna špecifikácia na zaistenie limitu detekcie mitochondriálneho SNV.
	Percento báz Q30	≥ 85	Meranie kvality bázy. Na zabezpečenie analytickej výkonnosti je nastavená minimálna špecifikácia.
	Odhadovaná kontaminácia vzorky	$\leq 0,005$	Deteguje kontaminujúce čítania z iných vzoriek. Je určená maximálna špecifikácia na zaistenie limitu detekcie mitochondriálneho SNV (typ variantu s najvyššou citlivosťou na kontamináciu).

Výkonnostné charakteristiky

Nasledujúce validačné štúdie boli vykonané s použitím pracovného postupu TruSight Whole Genome uvedeného v časti [Návod na použitie na strane 15](#) a boli navrhnuté tak, aby zabezpečili robustnosť analýzy voči bežným zdrojom variácie a poskytli odporúčania pre konzistentný výkon. Tieto štúdie použili analytické špecifikácie metriky kontroly kvality uvedené v časti [Tabuľka 8](#) ako referenčný parameter pre úspešnú výkonnosť analýzy a ako predpoklad pre stanovenie analytickej účinnosti stanovenia variantu.

Krížová kontaminácia

Štúdia krížovej kontaminácie hodnotila nesprávnu detekciu čítania indexov v dôsledku kontaminácie medzi jamkami počas prípravy knižnice vzoriek a kontaminácie medzi jednotlivými chodmi medzi po sebe nasledujúcimi chodmi sekvenovania. Na vyhodnotenie krížovej kontaminácie sa použilo 24 vzoriek krvi. Dvaja operátori pripravili celkovo 24 knižníc pomocou súborov indexov 1 – 4 s konfiguráciou S2 a združené knižnice boli sekvenované v poradí podľa súpravy indexu na jednom prístroji NovaSeq 6000Dx Instrument. Dvaja operátori pripravili 16 knižníc použitím súprav indexov 1 a 2 s konfiguráciou S4 v dvoch replikátoch a združené knižnice so striedavými súpravami indexov boli sekvenované na tom istom prístroji NovaSeq 6000Dx.

Na vyhodnotenie krížovej kontaminácie sa porovnali správne čítania indexov s čítaniami indexov zo susedných jamiek pre kontamináciu medzi jamkami a predchádzajúcim chodom sekvenovania pre kontamináciu medzi jednotlivými chodmi. Množstvo kontaminácie medzi jednotlivými chodmi bolo $\leq 0,003178\%$ pre chody S2 a $\leq 0,002487\%$ pre chody S4. Na vyhodnotenie kontaminácie medzi vzorkami sa použila metrika kontroly kvality knižnice vzoriek pre odhadovanú kontamináciu vzorky. Množstvo kontaminácie medzi vzorkami bolo 0,001, čo je najnižšia hodnota hlásená analytickým softvérom. Tieto výsledky naznačujú, že existuje nízke riziko kontaminácie v rámci pracovných postupov prípravy knižnice a sekvenovania.

Stabilita počas používania a v prechodných krokoch

Reagencie na prípravu knižnice boli vyhodnotené z hľadiska stability počas používania súpravy vrátane viacerých udalostí zmrazenia a rozmrazenia a stability otvorenej skúmavky.

Pri testovaní cyklu zmrazenia a rozmrazenia boli zmrazené komponenty vystavené piatim udalostiam zmrazenia a rozmrazenia na podporu jednej udalosti pri vybaľovaní a štyrom udalostiam pri použití súpravy. Pre stabilitu počas používania bol objem potrebný na prípravu šiestich knižníc vzoriek odstránený pri každom z troch cyklov zmrazenia a rozmrazenia na simuláciu vyčerpania objemu počas používania a komponenty boli uložené ďalších 31 dní pred testovaním. Po testovaní pomocou gDNA extrahovanej od šiestich darcov krvi prešli všetky údaje metrikou analytickej kontroly analýzy. Tieto výsledky naznačujú, že zmrazené reagencie na prípravu knižnice možno použiť so štyrmi cyklami zmrazenia a rozmrazenia a 30-dňovou stabilitou počas používania.

Pre jednotlivé knižnice a združené a denaturované knižnice bola hodnotená stabilita v prechodných krokoch. Všetky údaje prešli metrikou analytickej kontroly analýzy, ktorá naznačuje až 14-dňovú stabilitu jednotlivých knižníc a až 30-dňovú stabilitu združených a denaturovaných knižníc pri skladovaní v zmrazenom stave ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$), ako je opísané v bezpečných bodoch zastavenia.

Odber a uskladnenie vzoriek krvi

Kompatibilita skúmaviek na odber krvi a skladovanie vzoriek sa skúmala pomocou štyroch darcov a krvi odobratej do skúmaviek na odber EDTA od troch rôznych dodávateľov. Z každej bola extrahovaná genómová DNA (gDNA) pri príchode pre čas nula a potom znova po uskladnení krvi po dobu 16, 33 a 43 dní skladovania pri teplote $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Extrahovaná gDNA bola uložená zmrazená ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$) v elution buffer (10 mM Tris-

Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) a potom kvantifikovaná a použitá na prípravu a sekvenovanie knižnice. Všetky údaje prešli metrikou analytickej kontroly analýzy, ktorá indikuje kompatibilitu analýzy s tromi rôznymi skúmavkami na odber krvi EDTA a krvou uloženou do piatich týždňov pri teplote 2 °C až 8 °C.

Hodnotenie metódy extrakcie DNA

Z hľadiska výkonu analýzy sa hodnotili tri komerčne dostupné extrakčné súpravy. Dve súpravy použili magnetické guľôčky, jednu s pevnou fázou a väzbou na báze celulózy a jednu bez, a jedna súprava použila metódu čistenia nukleových kyselín na báze silikovej membrány pomocou odstreďovacích stĺpcov ([Tabuľka 9](#)).

Hodnotenie vykonali dvaja operátori s jednou šaržou extrakčných reagensí na každú metódu a plnou krvou odobratou do skúmaviek EDTA od štyroch predpokladane zdravých darcov. Každá vzorka krvi bola extrahovaná štyrikrát samostatne podľa pokynov výrobcu počas dní, ktoré nenasledovali za sebou, aby sa získalo 16 celkových pozorovaní na každú súpravu. Extrahovaná gDNA sa použila na prípravu knižníc na sekvenovanie a analýzu.

Všetky pozorovania (16/16) pre každú metódu extrakcie prešli metrikou analytickej kontroly analýzy. Výkon analýzy nebol ovplyvnený výberom metódy extrakcie vzorky gDNA. Štúdie analytickej presnosti a reprodukovateľnosti použili gDNA extrahovanú pomocou súpravy 3 (izolácia pomocou silikového filtračného stĺpca s odstreďovacími stĺpcami).

Tabuľka 9 Metódy extrakcie testované na výkon analýzy TruSight Whole Genome

Súprava	Metóda extrakcie
1	Extrakcia magnetických guľôčok s reverzibilnou imobilizáciou pevnej fázy (SPRI)
2	Magnetická extrakcia guľôčok s mobilnou pevnou fázou a väzbou na báze celulózy
3	Izolácia pomocou silikového filtračného stĺpca s odstreďovacími stĺpcami

Citlivosť vstupu DNA

Množstvo vstupu gDNA odporúčané na testovanie jednej vzorky je 280 ng alebo 350 ng v závislosti od metód kvantifikácie DNA uvedených v časti [Odporúčania pre vstup DNA na strane 10](#)

Na stanovenie výkonu v celom rozsahu vstupných koncentrácií gDNA sa množstvo DNA použitej v analýze testovalo na úrovniach v rozsahu $\pm 28,6\%$ odporúčaného vstupu. Výsledky preukázali, že -25% odporúčaného vstupu gDNA je spodným limitom pre analýzu. Analýza funguje správne so vstupom gDNA až do $+28,6\%$ odporúčaného vstupu.

Charakterizácia troch odlišných metód kvantifikácie preukázala, že rôzne metódy majú rôzne úrovne variability a môžu viesť k odlišným výsledkom. Ak používate inú metódu ako metódu uvedenú v časti [Odporúčania pre vstup DNA na strane 10](#), bude možno potrebné optimalizovať vstup cieľovej gDNA. Odporúča sa, aby sa gDNA pre vzorky určené pre konkrétnu šaržu na prípravu knižnice a chod sekvenovania kvantifikovali spoločne, aby sa eliminovala variabilita medzi dávkami, ak je to možné, alebo aby sa použili kontroly procesu na zabezpečenie $\leq 25\%$ variability kvantifikácie gDNA medzi dávkami.

Interferujúce látky

Táto štúdia hodnotila výkonnosť endogénnych aj exogénnych látok spojených s ľudskou krvou a skúmavkami na odber krvi. Na vyhodnotenie bol vybraný bilirubín, hemoglobín a triglyceridy na simuláciu ikterických, hemolyzovaných a lipemických vzoriek. Biotín a EDTA boli vybrané na vyhodnotenie z dôvodu prítomnosti v krvi a skúmavkách na odber krvi (BCT) a pre potenciálny vplyv na chemickú analýzu. Látky boli do vzoriek krvi darcu pridané pred extrakciou buď priamo alebo po rozpustení v rozpúšťadle. Testovaná koncentrácia a podrobnosti o pridaní každej látky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 10 Interferujúce látky testované pre účinnosť analýzy TruSight Whole Genome

Látka	Testovaná koncentrácia	Rozpúšťadlo používané v roztoku pridanej látky	% látky pridanej do krvi
Bilirubín (nekonjugovaný)	40 mg/dl (0,4 mg/ml) ¹	DMSO	4%
Hemoglobín	1000 mg/dl (10 mg/ml) ¹	Nevzťahuje sa – rozpustené v krvi	Nevzťahuje sa – rozpustené v krvi
Triglyceridy	1500 mg/dl (15 mg/ml) ¹	100% etanol	4%
Biotín	0,00351 mg/ml ²	Voda	4%
EDTA	5,4 mg/ml ³	Voda	3%

¹ Koncentrácie boli zvolené ako najvyššie pozorované koncentrácie podľa „Doplnkových tabuliek pre testovanie interferencie v klinickej chémii, CLSI EP37-ED1:2018“.

² Koncentrácia bola vybraná ako trojnásobok „najvyššej koncentrácie lieku pri liečbe“ uvedenej v „Doplnkových tabuľkách pre testovanie interferencie v klinickej chémii, CLSI EP37-ED1:2018“.

³ Koncentrácia bola vybraná na základe koncentrácie EDTA, ktorá sa líši v skúmavkách na odber krvi v rozsahu do 1,8 mg/ml, a na simuláciu udalosti krátkeho plnenia pri odbere krvi 33% nominálneho objemu BCT, čo vedie k 3-násobne vyššej koncentrácii EDTA v krvi zodpovedajúcej 5,4 mg/ml.

Pri testovaní sa použila krv od štyroch darcov. Pre každú interferujúcu látku bola alikvotná časť plnej krvi od každého darcu obohatená o interferujúcu látku a potom rozdelená medzi štyri replikáty extrakcie gDNA. Kontrolná vzorka bola spracovaná podobne bez pridanej látky. Spárované podmienky testov a kontrol sa spracovali pre každého darcu v rámci tej istej extrakčnej udalosti a extrahovaná gDNA sa potom spracovala v rámci jednej udalosti prípravy knižnice a sekvenovania. Neexistoval žiadny vplyv na výkonnosť analýzy a žiadny dôkaz o interferencii v reakcii na žiadnu z testovaných látok.

Ekvivalencia indexácie vzorky

Analýza TruSight Whole Genome poskytuje na výber zo štyroch 6-násobných súprav indexov pre chody S2 alebo dvoch 16-násobných súprav indexov pre konfigurácie chodov sekvenovania S4. Preukázalo sa, že analýza poskytuje ekvivalentný výkon, keď sú knižnice sekvenované v konfiguráciách chodov sekvenovania NovaSeq 6000Dx S2 alebo S4. Okrem toho sa preukázalo, že konfigurácie chodov S2 aj S4 dosahujú > 95%

knížnic vzoriek s minimálne 35,0-násobným pokrytím pri testovaní pomocou predpísaných súprav indexov. Preto je možné zameniteľne použiť rôzne súpravy indexov a združovanie použité na sekvenovanie na prietokových článkoch S2 a S4, aby sa zabezpečila škálovateľnosť na prispôsobenie sa výkyvom kapacity vzoriek a flexibilitu v laboratórnych procesoch.

Analytická výkonnosť

Počiatkové charakterizačné štúdie boli vykonané na stanovenie prahových hodnôt úrovne spoľahlivosti pre malé varianty, limitu blanku/limitu detekcie pre mitochondriálne SNV a prahových hodnôt veľkosti pre presnú detekciu expanzií STR pri použití pracovného postupu TruSight Whole Genome. Vzorky reprezentujúce variantné triedy vyhodnotené pomocou analýzy TruSight Whole Genome boli zahrnuté do hodnotenia analytickej presnosti a opakovateľnosti vrátane presnosti v rámci laboratória a externej reprodukovateľnosti. Analytický výkon sa uvádza pre chody sekvenovania a vzorky, ktoré prešli všetkými kontrolami kvality, s výnimkou vykonštruovaných zmiešaných vzoriek použitých na vyhodnotenie mitochondriálnych SNV na alebo v blízkosti limitu detekcie, pri ktorej zlyhala metrika kontaminácie. Výsledky každej z týchto štúdií sú opísané v častiach nižšie.

Štúdie počiatkovej charakterizácie

Stanovenie úrovne spoľahlivosti malých variantov

V tejto štúdii bol model logistickej regresie trénovaný na vysoko reprodukovateľných a nedostatočne reprodukovateľných lokalít variantov z 96 replikátov NA12878 na definovanie prahových hodnôt pre vysoké, stredné a nízke úrovne spoľahlivosti.

Základy vysokej spoľahlivosti pre daný typ variantu sú tie, v ktorých predpovedaná reprodukovateľnosť v rámci laboratória spĺňa alebo prekračuje 99% pre danú prahovú hodnotu skóre a percento non-N báz, ktoré spĺňajú dané kritérium, presahuje 30%. Ak typ malého variantu nemá prahovú hodnotu skóre, ktorá spĺňa tieto kritériá, tento typ variantu nebude mať vysokú úroveň spoľahlivosti. Bázy so strednou spoľahlivosťou sú tie, v ktorých predpovedaná reprodukovateľnosť v rámci laboratória spĺňa alebo prekračuje 95% pre danú prahovú hodnotu skóre a typ variantu. Bázy s nízkou spoľahlivosťou sú tie, v ktorých predpovedaná reprodukovateľnosť v rámci laboratória nespĺňa 95% pre danú prahovú hodnotu skóre a typ variantu. Stanovenia variantu pre určitý typ variantu s vysokou alebo strednou úrovňou spoľahlivosti zahŕňajú väčšinu non-N báz (t. j. s vylúčením medzier) (pozrite si tabuľku 6) a vykazujú vysoký výkon pri hodnotení na základe pravdivých súprav malých variantov a pri rozsiahlom hodnotení presnosti replikátov NA12878 v rámci laboratória.

Typ variantu	Úroveň spoľahlivosti	%non-N bázy
SNV	Vysoká	89,14%
	Stredná	3,30%
	Nízka	7,56%

Typ variantu	Úroveň spoľahlivosti	%non-N bázy
Krátke delécie (1 – 5 bp)	Vysoká	90,88%
	Stredná	2,45%
	Nízka	6,67%
Stredné delécie (6 – 15 bp)	Stredná	86,94%
	Nízka	13,06%
Dlhé delécie (\geq 16 bp)	Stredná	85,42%
	Nízka	14,58%
Krátke inzercie (1 – 5 bp)	Vysoká	88,94%
	Stredná	4,61%
	Nízka	6,45%
Stredné inzercie (6 – 15 bp)	Stredná	89,37%
	Nízka	10,63%
Dlhé inzercie (\geq 16 bp)	Stredná	48,92%
	Nízka	50,63%

Určenie limitu blanku pre mitochondriálne SNV/limitu detekcie

Pre mitochondriálne SNV sa vykonali štúdie limitov blanku (LoB) a limitov detekcie (LoD). Pre štúdiu mitochondriálneho SNV bol LoB hodnotený pomocou miest, o ktorých je známe, že nemajú žiadny variant (t. j. referenčné stanovenie). LoD je definovaný ako frekvencia variantnej alely SNV pre mtDNA, pre ktorú je pomer detekcie tohto variantu 95%.

Na stanovenie LoB a LoD na detekciu heteroplazmatických mtSNV boli dôkladne charakterizované vzorky gDNA od dvoch rôznych darcov krvi zmiešané v titračnej štúdii na päť úrovní riedenia s 20 replikátmi na každú úroveň riedenia. Úrovne riedenia boli navrhnuté tak, aby sa zamerali na percentá variantov mtSNV (1,2 – 6% VAF), čím sa napodobnili rôzne úrovne mitochondriálnej heteroplazmy. Zmiešané vzorky gDNA boli spracované a čítania boli prevzorkované nadol, aby sa dosiahlo 500-násobné priemerné mitochondriálne pokrytie. Celkovo bolo pri následnom hodnotení použitých 42 vykonštruovaných „heteroplazmatických“ miest. Regresná analýza sa použila na odhad požadovaných pomerov miešania na cieľové 1x LoD a 2x LoD pre podskupinu mtSNV.

Polohy, v ktorých gDNA z oboch vzoriek krvi majú genotypy referenčnej alely, sa hodnotili pre stanovenia mtSNV, ktoré prešli filtrom s nereferenčnou alelou. Miera falošne pozitívnej odpovede bola vypočítaná ako 0,8% v súlade s predpokladom nulovej hodnoty LoB podľa dokumentu „Hodnotenie schopnosti detekcie pre postupy klinického laboratórneho merania, CLSI EP17-A2-ED1:2012“. Každá zo 42 pozícií bola analyzovaná nezávisle pomocou regresnej analýzy Probit. Hodnota LoD bola definovaná ako očakávaná hodnota VAF zodpovedajúca detekčnej miere 95% (C95). Celková vykazovaná hodnota LoD, definovaná ako 95. percentil hodnôt LoD z

pravdivých miest, bola 4,75% VAF. Priemer distribúcie absolútnych rozdielov medzi pozorovaným a očakávaným VAF pre všetky pozorovania bol vypočítaný na 0,83% s horným limitom spoľahlivosti 95% 0,86% VAF.

Stanovenie prahovej hodnoty expanzie STR

Z dôvodu technických obmedzení rozsahu STR, ktoré presahujú dĺžku čítania sekvenovania (~135 bp), bude dĺžka STR pozorovaná v analýze TruSight Whole Genome často podhodnotením skutočnej dĺžky. Keď skutočná dĺžka STR prekročí mediánovú dĺžku fragmentu (~330 bp), odhadovaná dĺžka STR sa ustáli. Z tohto dôvodu analýza TruSight Whole Genome hodnotí cieľný súbor miest, pre ktoré môže analýza presne diskriminovať STR, s pozorovanými dĺžkami v rámci normálnej variácie od tých s dĺžkou väčšou, ako sa pozorovalo u predpokladane zdravej populácie („expandovanej“) (zoznam miest hodnotených analýzou TruSight Whole Genome nájdete v časti [Tabuľka 2](#)).

S cieľom zabezpečiť súhrnnú negatívnu percentuálnu zhodu (NPA) 95% na všetkých miestach STR hodnotených analýzou TruSight Whole Genome boli prahové hodnoty na miestach na stanovenie expandovaného STR na danom mieste nastavené tak, aby sa dosiahlo priemerne 99,94% NPA na každom mieste. Aby sa zohľadnila inherentná variabilita odhadov veľkosti STR v rámci predpokladane zdravých populácií, prahové hodnoty boli stanovené na základe distribúcie nezávisle pozorovaných dĺžok STR v súbore predpokladane zdravých údajov 1000 Genomes Project (2 504 vzoriek z rôznych populácií spracovaných pomocou produktu DRAGEN 3,7,5 a nástroja ExpansionHunter 4.0.2).⁴

Na potvrdenie prahových hodnôt stanovených pomocou súboru údajov 1000 Genomes Project sa pomocou TruSight Whole Genome spracovala gDNA zo 16 referenčných vzoriek bunkovej línie (program Genetic Testing Reference Material (Get-RM) Centra pre sledovanie chorôb) s rôznymi nezávisle odhadnutými veľkosťami STR. Pripravilo sa 10 replikátov knižnice pre každú zo 16 vzoriek a testovalo ich šesť operátorov pre celkovo 960 pozorovaní a veľkosti STR boli nezávisle odhadnuté pre každý replikát. Pozorovaná miera falošne pozitívnej úrovne vzorky vo všetkých cieľových miestach bola 0,35%.

Limit detekcie (LoD) bol odhadnutý pre 28 cieľových miest STR s testovanými bunkovými líniami na základe veľkostí alel pozorovaných pomocou analýzy TruSight Whole Genome a očakávaných veľkostí alel na základe predchádzajúcej nezávislej charakterizácie ([Tabuľka 11](#)). Pre vybrané miesta bol stanovený limit detekcie pre viac ako jedno STR na tom istom mieste, celkovo pre 35 STR. LoD je odhadovaná veľkosť, pri ktorej sa zistí očakávaná expanzia STR pre 95% alel na základe modelu Probit s potvrdenými prahovými hodnotami na rozlíšenie normálnych a rozšírených veľkostí STR. Údaje na všetkých miestach so známymi veľkosťami alel sa spojili, aby sa získali odhady LoD pre každé miesto na základe prahovej hodnoty špecifickej pre miesto pre expandované STR. Dĺžka opakovania FMR1 bola systematicky podhodnotená v porovnaní s inými STR a na správny odhad LoD sa vyžadoval vlastný model.

Potvrdené prahové hodnoty pre rozšírené STR špecifické pre dané miesto, odhadovaný očakávaný a pozorovaný LoD pre cieľové miesta a prahová hodnota ochorenia na základe dostupnej literatúry (len na ilustračné účely) cieľových miest STR sú uvedené v časti [Tabuľka 11](#). V prípade expanzií STR dlhších, než je prahová hodnota stanovená dĺžkou čítania a pre ktorú nie je možné priamo pozorovať očakávanú dĺžku, sa

pozorovaná dĺžka približuje priemernej dĺžke, ktorá by sa pozorovala počas niekoľkých chodov sekvenovania. V prípade expanzií STR kratších ako prahová hodnota stanovená dĺžkou čítania sú očakávané a pozorované dĺžky rovnaké.

Tabuľka 11 Súhrn očakávanej schopnosti detekcie pre cieľové miesta STR analýzy TruSight Whole Genome

Cieľové miesto ^a	Prahová hodnota expandovaného STR (bp) na základe súboru údajov 1000 Genomes Project	Odhadovaný LoD (očakávaná dĺžka, bp)	Odhadovaný LoD (pozorovaná dĺžka, bp)	Prahová hodnota ochorenia (skutočná dĺžka, 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	Nevzťahuje sa
ATXN8OS	200	298	233	237 ^{7,8}
ATXN8OS_CTA	90	92	92	Nevzťahuje sa
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	Nevzťahuje sa
CNBP_CAGA	68	80	80	Nevzťahuje sa
CSTB	200	298	233	348 ^{12,13}
DIP2B	200	298	233	Nevzťahuje sa
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	Nevzťahuje sa
GLS	111	115	115	270 ¹⁷

Cieľové miesto ^a	Prahová hodnota expandovaného STR (bp) na základe súboru údajov 1000 Genomes Project	Odhadovaný LoD (očakávaná dĺžka, bp)	Odhadovaný LoD (pozorovaná dĺžka, bp)	Prahová hodnota ochorenia (skutočná dĺžka, bp) ^b
HTT	108	115	115	120 ¹⁸
HTT_CCG	42	42	42	Nevzťahuje sa
JPH3	99	101	101	123 ¹⁹
NIPA1	33	33	33	Nevzťahuje sa
NOP56	84	84	84	3900 ^{20,21}
NOP56_CGCCTG	24	24	24	Nevzťahuje sa
NOTCH2NL	129	175	174	213 ^{22,23}
PABPN1	27	27	27	Nevzťahuje sa
PHOX2B	60	60	60	75 ^{5,24}
PPP2R2B	87	90	90	198 ^{7,8}
TBP	129	175	174	135 ^{7,8}

^a Miesta s alternatívnymi STR sú označené ako LOCI_<ALTERNATE_REPEAT> (napr. ATXN7_GCC).

^b Prahové hodnoty ochorenia sú uvedené len na ilustračné účely na základe publikovanej literatúry; údaj Nevzťahuje sa v tomto stĺpci označujú, že STR nemusí byť spojené s publikovanou patogénnou expanziou.

^c 100% replikátov NA23378 detegovalo expanziu STR v C9ORF72, čo naznačuje predtým necharakterizovanú expanziu na tomto mieste v danej vzorke. Táto vzorka bunkovej línie bola z analýzy vylúčená.

^d Stredné expanzie môžu byť tiež spojené s fenotypom.

Táto štúdia preukázala podobné profily precíznosti a presnosti pre odhady veľkosti STR v rôznych cieľových miestach, pričom limit detekcie expanzií STR bol do veľkej miery spôsobený vybranou prahovou hodnotou (na základe distribúcie veľkosti v populácii 1000 Genomes Project) namiesto rozdielov v schopnosti detekcie v rámci miest. Všetky odhadované hodnoty LoD v očakávanom rozsahu dĺžky boli väčšie ako dĺžky pozorované v predpokladane zdravých populáciách a nižšie ako mnohé publikované prahové hodnoty ochorenia, vďaka čomu boli príslušné prahové hodnoty expanzie STR užitočné na označenie opakovania na konkrétnom mieste ako potenciálne expandované. Tu uvedené prahové hodnoty sa použili na vyhodnotenie presnosti detekcie expanzie STR.

Správnosť

Analytická presnosť sa stanovila porovnaním stanovení variantov pomocou analýzy TruSight Whole Genome s výsledkami získanými alternatívnymi metódami. Referenčné metódy boli zvolené na základe značného rozdielu v porovnaní s analýzou TruSight Whole Genome, ktorá používa prípravu knižnice viazanú na guľôčky Nextera, 2-farbivovú chémiu sekvenovania na prístroji NovaSeq 6000Dx a server DRAGEN 3.9.5 na stanovenie variantov. Uskutočnil sa reprezentatívny prístup k validácii analýzy TruSight Whole Genome so vzorkami reprezentujúcimi varianty vo všetkých variantných triedach zahrnutých do výstupu analýzy. Na vyhodnotenie presnosti analýzy TruSight Whole Genome sa použilo celkovo 459 jedinečných vzoriek, ktoré prešli analytickou

kontrolou kvality. Vzorky sa testovali na troch šaržiach reagentov na prípravu knižnice a spotrebného materiálu, štyroch šaržiach súprav na sekvenovanie S4, ôsmich operátoroch, piatich prístrojoch NovaSeq 6000Dx Instrument na dvoch interných pracoviskách. Pripravených a sekvenovaných bolo 31 nezávislých skupín knižníc.

Nasledujúca tabuľka obsahuje definície metrík počítaných v štúdiách presnosti.

Výraz	Definícia
Dolná úroveň spoľahlivosti (LCL)	Jednostranný 95% dolný limit spoľahlivosti s použitím Wilsonovej metódy.
Negatívna percentuálna zhoda (NPA) ¹	Percento negatívnych miest definovaných referenčnou metódou, ktoré sú pomocou analýzy TruSight Whole Genome konkordantne označené ako negatívne.
Pozitívna percentuálna zhoda (PPA)	Percento variantov stanovených v referenčnej metóde, ktoré sú v konkordantne stanovené pomocou analýzy TruSight Whole Genome.
Technická pozitívna prediktívna hodnota (TPPV) ³	Percento variantov stanovených pomocou analýzy TruSight Whole Genome, ktoré sú v konkordantne stanovené pomocou referenčnej metódy.

¹ Pre presnosť detekcie expanzie STR a presnosť detekcie alely SMN1, NPA = skutočne negatívne / (skutočne negatívne + falošne pozitívne).

² Pre presnosť detekcie expanzie STR a presnosť detekcie alely SMN1, PPA = skutočne pozitívne / (skutočne pozitívne + falošne negatívne).

³ Pre presnosť detekcie expanzie STR a presnosť detekcie alely SMN1, TPPV = skutočne pozitívne / (skutočne pozitívne + falošne pozitívne).

Presnosť malých variantov

Presnosť stanovenia malých variantov bola hodnotená pomocou genómovej DNA extrahovanej z periférnej plnej krvi 195 predpokladane zdravých darcov. Stanovenia variantu pomocou analýzy TruSight Whole Genome sa porovnali so stanoveniami variantu z klinicky validovaného testu sekvenovania celého genómu vykonaného v laboratóriu Illumina Laboratory Services (ILS) CLIA Laboratory ako referenčnou metódou. Pracovný postup sekvenovania celého genómu tejto referenčnej metódy využíva prípravu knižnice TruSeq PCR na základe ligácie bez PCR, 4-farbovúivovú chémiu sekvenovania v sekvenčnom systéme HiSeq™ a DRAGEN 3.8.4 na stanovenie variantov. V tejto štúdii neboli charakterizované inzercie a delécie veľkosti > 31 bp, pretože neboli validované v referenčnej metóde.

Súhrn presnosti pre všetky stanovenia malých variantov uvádza [Tabuľka 12](#) a [Tabuľka 13](#).

Tabuľka 12 Presnosť analýzy Analýza TruSight Whole Genome pre malé varianty stratifikované podľa úrovne spoľahlivosti a veľkosti (predpokladané zdravé vzorky krvi)

Podtyp variantu	Úroveň spoľahlivosti	Konkordantné stanovenia referenčnej metódy	Exkluzívne stanovenia referenčnej metódy	Konkordantné stanovenia analýzy	Exkluzívne stanovenia analýzy	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV	Vysoká	261 728 580	1 573 877	261 603 149	208 639	99,4% (99,4%)	99,9% (99,9%)
	Stredná	6 677 589	421 718	6 519 811	151 128	94,1% (94,0%)	97,7% (97,7%)
	Nízka	6 864 840	3 251 709	6 649 756	2 151 388	67,9% (67,8%)	75,6% (75,5%)
Krátka delécia (1 – 5 bp)	Vysoká	11 978 745	201 783	12 246 922	67 277	98,3% (98,3%)	99,5% (99,5%)
	Stredná	2 875 258	45 290	3 050 170	47 593	98,4% (98,4%)	98,5% (98,5%)
	Nízka	1 802 544	228 582	1 966 974	221 449	88,7% (88,7%)	89,9% (89,8%)
Stredná delécia (6 – 15 bp)	Stredná	858 673	20 079	860 493	18 361	97,7% (97,7%)	97,9% (97,9%)
	Nízka	145 618	28 300	157 398	41 824	83,7% (83,6%)	79,0% (78,9%)
Dlhá delécia (16 – 31 bp)	Stredná	344 168	14 334	336 976	31 165	96,0% (95,9%)	91,5% (91,5%)
	Nízka	54 444	23 438	53 835	47 272	69,9% (69,6%)	53,2% (53,0%)
Krátka inzercia (1 – 5 bp)	Vysoká	11 212 366	164 651	11 380 307	49 776	98,6% (98,5%)	99,6% (99,6%)
	Stredná	1 015 324	41 890	988 512	36 051	96,0% (96,0%)	96,5% (96,5%)
	Nízka	639 663	198 700	576 797	180 458	76,3% (76,2%)	76,2% (76,1%)
Stredná inzercia (6 – 15 bp)	Stredná	790 968	18 163	798 572	17 111	97,8% (97,7%)	97,9% (97,9%)
	Nízka	76 105	24 188	88 389	35 819	75,9% (75,7%)	71,2% (71,0%)

Podtyp variantu	Úroveň spoľahlivosti	Konkordantné stanovenia referenčnej metódy	Exkluzívne stanovenia referenčnej metódy	Konkordantné stanovenia analýzy	Exkluzívne stanovenia analýzy	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Dlhá inzercia (16 – 31 bp)	Stredná	159 927	3 135	159 432	8 639	98,1% (98,0%)	94,9% (94,8%)
	Nízka	102 552	22 199	103 892	55 724	82,2% (82,0%)	65,1% (64,9%)

Tabuľka 13 Súhrn TruSight Whole Genome NPA stanovení malých variantov stratifikovaných podľa úrovne spoľahlivosti

Úroveň spoľahlivosti	Konkordantné negatívne stanovenia	Referenčná metóda Exkluzívne negatívne stanovenia	NPA (LCL)
Vysoká	202 276 243 790	127 465 816	99,9% (99,9%)
Stredná	3 307 740 675	77 650 177	97,7% (97,7%)
Nízka	3 653 569 580	439 038 662	89,3% (89,3%)

Bola vykonaná doplnková štúdia presnosti na vyhodnotenie detekcie malých variantov s komerčne dostupnými vzorkami DNA referenčnej bunkovej línie (Coriell Institute for Medical Research) s dobre charakterizovanými súpravami stanovenia vygenerovanými konzorciom Genome in a Bottle (GIAB). Pre túto štúdiu sa ako referenčná metóda použili súpravy stanovenia GIAB. Pravdivá súprava v týchto vzorkách zahŕňa inzercie a delécie väčšie ako 31 bp, takže do tohto hodnotenia boli zahrnuté väčšie inzercie a delécie. Tieto vzorky zahŕňali HG001-005 a NA24695 s výsledkami zobrazenými súhrnne v časti [Tabuľka 14](#).

Tabuľka 14 Presnosť analýzy Analýza TruSight Whole Genome pre malé varianty stratifikované podľa úrovne spoľahlivosti a veľkosti (vzorky dobre charakterizovanej bunkovej línie)

Podtyp variantu	Úroveň spoľahlivosti	Konkordantné stanovenia GIAB	Exkluzívne stanovenia GIAB	Konkordantné stanovenia analýzy	Exkluzívne stanovenia analýzy	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV	Vysoká	21 431 369	2 552	21 439 303	3 954	>99,9% (> 99,9%)	>99,9% (> 99,9%)
	Stredná	908 172	1 259	910 058	2 175	99,9% (99,9%)	99,8% (99,8%)
	Nízka	720 717	59 691	722 180	28 721	92,4% (92,3%)	96,2% (96,1%)
Krátka delécia (1 – 5 bp)	Vysoká	1 080 383	690	1 090 370	730	99,9% (99,9%)	99,9% (99,9%)
	Stredná	423 547	788	437 019	606	99,8% (99,8%)	99,9% (99,9%)
	Nízka	263 828	2 624	281 217	2 088	99,0% (99,0%)	99,3% (99,2%)
Stredná delécia (6 – 15 bp)	Stredná	142 671	238	144 997	167	99,8% (99,8%)	99,9% (99,9%)
	Nízka	86 174	812	91 710	546	99,1% (99,0%)	99,4% (99,4%)
Dlhá delécia (≥ 16 bp)	Stredná	34 414	315	34 580	55	99,1% (99,0%)	99,8% (99,8%)
	Nízka	9 985	393	10 212	106	96,2% (95,9%)	99,0% (98,8%)

Podtyp variantu	Úroveň spoľahlivosti	Konkordantné stanovenia GIAB	Exkluzívne stanovenia GIAB	Konkordantné stanovenia analýzy	Exkluzívne stanovenia analýzy	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Krátka inzercia (1 – 5 bp)	Vysoká	927 288	221	925 787	271	>99,9% (> 99,9%)	>99,9% (> 99,9%)
	Stredná	158 346	294	137 081	250	99,8% (99,8%)	99,8% (99,8%)
	Nízka	93 857	2 402	75 687	1 427	97,5% (97,4%)	98,1% (98,1%)
Stredná inzercia (6 – 15 bp)	Stredná	91 117	116	89 054	60	99,9% (99,9%)	99,9% (99,9%)
	Nízka	37 925	745	36 670	406	98,1% (98,0%)	98,9% (98,8%)
Dlhá inzercia (≥ 16 bp)	Stredná	11 081	46	11 110	17	99,6% (99,5%)	99,8% (99,8%)
	Nízka	14 086	607	14 312	262	95,9% (95,6%)	98,2% (98,0%)

Presnosť odchýlky počtu kópií

Presnosť stanovenia CNV sa hodnotila pomocou rovnakej referenčnej metódy a predpokladaných zdravých vzoriek od darcov krvi (195), ktoré sa použili na vyhodnotenie presnosti stanovenia malých variantov. Každá CNV sa považuje za detegovanú v súprave stanovenia, ak aspoň 50% z tejto CNV pokrýva spojenie stanovení CNV rovnakého typu (PRÍRASTOK/STRATA) v príslušnej súprave stanovení. Analýza TruSight Whole Genome definuje súbor genomických oblastí, ktoré sú vylúčené zo stanovenia CNV na základe hodnotenia údajov o vzorkách z 1000 genómov a 77 predpokladaných zdravých darcov krvi pomocou metriky súvisiacej s odchýlkami hĺbky pokrytia, odchýlkami pokrytia a medzerami v pokrytí na zistenie oblastí genómu, ktoré nie sú hlásiteľné pre CNV. Stanovenie CNV sa hodnotilo iba v genomických oblastiach, ktoré boli spoločné pre referenčnú metódu aj pre analýzu TruSight Whole Genome. Súhrn presnosti pre všetky stanovenia CNV uvádza [Tabuľka 15](#) a [Tabuľka 16](#).

Tabuľka 15 Presnosť analýzy Analýza TruSight Whole Genome pre CNV stratifikované podľa veľkosti a typu

Veľkosť	Typ	Konkordantné stanovenia referenčnej metódy	Exkluzívne stanovenia a referenčnej metódy	Konkordantné stanovenia analýzy	Exkluzívne stanovenia a analýzy	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
10 – 25 kbp	PRÍRASTOK	443	98	342	56	81,89% (79,01%)	85,93% (82,82%)
	STRATA	4 162	457	4 155	679	90,11% (89,36%)	85,95% (85,11%)
25 – 50 kbp	PRÍRASTOK	355	117	370	76	75,21% (71,81%)	82,96% (79,83%)
	STRATA	1 587	16	1 622	7	99,00% (98,50%)	99,57% (99,21%)
50 – 100 kbp	PRÍRASTOK	228	0	187	20	>99,9% (98,83%)	90,34% (86,42%)
	STRATA	723	5	697	6	99,31% (98,60%)	99,15% (98,36%)
≥100 kbp	PRÍRASTOK	371	1	335	5	99,73% (98,80%)	98,53% (97,01%)
	STRATA	541	23	569	1	95,92% (94,32%)	99,82% (99,22%)
Celkovo (všetky CNV ≥ 10 kbp)	PRÍRASTOK	1 397	216	1 234	157	86,61% (85,15%)	88,71% (87,24%)
	STRATA	7 013	501	7 043	693	93,33% (92,84%)	91,04% (90,49%)

Tabuľka 16 Zhrnutie stanovení CNV analýzy TruSight Whole Genome NPA

Veľkosť	Typ	Konkordantné negatívne stanovenia	Exkluzívne negatívne stanovenia referenčnej metódy	Exkluzívne stanovenia analýzy	NPA (LCL)
Celkovo (všetky CNV ≥ 10 kbp)	PRÍRASTOK	548 478 033 220	5 701 311	6 400 382	> 99,99% (> 99,99%)
	STRATA	548 591 794 675	11 719 913	8 543 877	> 99,99% (> 99,99%)

Chody presnosti homozygotnosti

Technická pozitívna prediktívna hodnota (TPPV) pre stanovenia ROH sa hodnotila pomocou rovnakej referenčnej metódy a predpokladaných zdravých vzoriek od darcov krvi (195), ktoré sa použili pri posudzovaní presnosti malých variantov a CNV. Udalosti ROH boli stanovené identifikáciou oblastí v genóme obsahujúcich sekvenciu homozygotných stanovení SNV bez heterozygotných SNV alebo dlhých medzier bez variantov. Takéto zhodné oblasti boli potom rozšírené doľava a doprava a vyhodnotené pre okolité homozygotné stanovenia alebo prítomnosť heterozygotných SNV. Udalosti ROH zistené pomocou analýzy TruSight Whole Genome sa porovnali so stanoveniami SNV z referenčnej metódy. Súhrn TPPV pre stanovenia ROH uvádza [Tabuľka 17](#).

Tabuľka 17 Presnosť analýzy TruSight Whole Genome pre udalosti ROH stratifikované podľa veľkosti

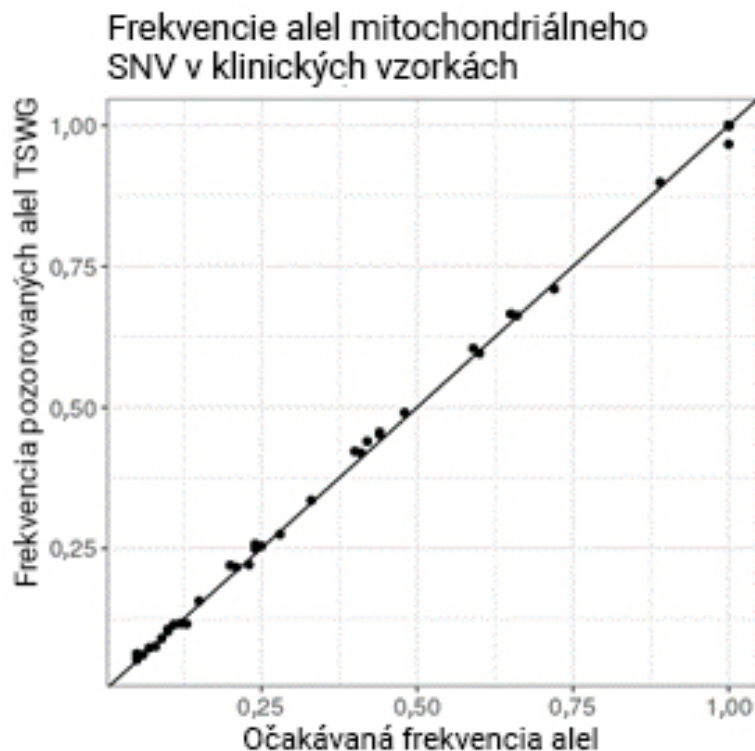
Veľkosť	Priemer TPPV	TPPV LCL
10 – 25 kbp	81,44%	80,77%
25 – 50 kbp	82,14%	81,82%
50 – 100 kbp	81,77%	81,55%
100 – 500 kbp	82,19%	81,98%
≥ 10 kbp	82,07%	81,94%
≥ 500 kbp	85,47%	84,66%

Pozitívna percentuálna zhoda (PPA) na detekciu ROH sa stanovila na klinických vzorkách z externých zdrojov porovnaním stanovení analýzy TruSight Whole Genome so stanoveniami ROH z ortogonálnych metód vrátane chromozomálnej mikroanalýzy a hodnotenia založeného na PCR. Udalosť ROH sa považovala za zistenú, ak najmenej 50% oblasti hlásenej ako ROH ortogonálnou metódou prekrýva spojenie udalostí ROH stanovených analýzou TruSight Whole Genome. PPA medzi analýzou Analýza TruSight Whole Genome a ortogonálnymi metódami bola 34/34 (100%) pre všetky očakávané udalosti ROH (≥ 4 Mb).

Presnosť heteroplazmických mitochondriálnych SNV

Presnosť stanovenia mtSNV bola hodnotená na 41 predtým uložených klinických vzorkách získaných z externých pracovísk. Každá klinická vzorka obsahovala predtým hlásený mtSNV na definovanom mieste a s definovaným stupňom heteroplazmy na základe mtDNA cielenej známej analýzy s heteroplazmou (MITOP). Frekvencie alel odhadnuté pomocou analýzy TruSight Whole Genome boli vysoko korelované s očakávanými frekvenciami, ako to predpovedala metóda MITOP. Boli zistené všetky očakávané SNV mtDNA, čo viedlo k PPA 100% (41/41).

Obrázok 3 TruSight Whole Genome – pozorované frekvencie alel mitochondriálnych SNV v porovnaní s očakávanými frekvenciami alel



Dodatočná štúdia presnosti mtSNV sa vykonala s použitím rovnakých 195 vzoriek krvi a referenčnej metódy opísanej v štúdiách presnosti malých variantov a CNV. Negatívny referenčný súbor bol definovaný ako spoľahlivé nevariantné stanovenia (filter PASS) a pozitívny referenčný súbor bol definovaný ako stanovenia mtSNV s frekvenciou alel > 2,5%. Pozície s filtrom nesplnenia alebo so stanovením variantu iného ako SNV boli vylúčené. Súhrn presnosti pre mtSNV uvádza [Tabuľka 18](#).

Tabuľka 18 TruSight Whole Genome – presnosť stanovení SNV mtDNA

Metrika presnosti	Konkordantné pozitívne referenčnej metódy	Exkluzívne pozitívne referenčnej metódy	Exkluzívne pozitívne analýzy	Konkordantné negatívne referenčnej metódy	Exkluzívne negatívne referenčnej metódy	Exkluzívne negatívne analýzy	Hodnota metriky presnosti (LCL)
PPA	6875	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99% (99,96%)
TPPV	6875	Nevzťahuje sa	6	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	99,91% (99,83%)
NPA	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	3171049	24268	20564	99,24% (99,23%)

Presnosť detekcie expanzie STR

Presnosť detekcie expanzie STR bola založená na celkovom počte 160 vzoriek pripravených extrakciou gDNA od klinicky postihnutých jedincov s expanziou na špecifických miestach potvrdenou metódou PCR/Repeat-Primed (RP)-PCR alebo Southern Blot vykonávanou v laboratórnom prostredí CLIA. Prahové hodnoty stanovené v časti [Tabuľka 11](#) sa použili na definovanie stavu STR alely na konkrétnom mieste ako normálny (odhadovaná veľkosť STR menšia alebo rovná prahovej hodnote) alebo expandovaný (vyššia ako prahová hodnota).

Hodnota PPA sa počítala len s použitím klinicky potvrdených vzoriek, hodnota NPA sa počítala len s použitím jednotlivých predpokladaných zdravých vzoriek krvi a hodnota TPPV sa počítala v oboch skupinách vzoriek. Pre alely, kde nebola k dispozícii klinicky potvrdená vzorka, sa nepodarilo vypočítať hodnotu PPA. Okrem toho pre alely, kde nebola k dispozícii klinicky potvrdená vzorka a neboli k dispozícii žiadne falošne pozitívne stanovenia, nebolo možné vypočítať hodnotu TPPV. Hodnota NPA sa vypočítala pre všetky expanzie STR. Počet klinických vzoriek testovaných pre danú metriku expanzie a presnosti STR uvádza [Tabuľka 19](#).

Tabuľka 19 TruSight Whole Genome Metrika presnosti pre expanzie STR

Expanzia STR	Testované klinické vzorky	PPA	TPPV	NPA
AFF2	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>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	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>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	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%

Expanzia STR	Testované klinické vzorky	PPA	TPPV	NPA
ATXN8OS	0	Nevzťahuje sa	0,00%	99,74%
ATXN8OS_CTA	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
C9ORF72	21	>99,99%	>99,99%	>99,99%
CACNA1A	5	>99,99%	83,33%	99,74%
CBL	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
CNBP	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
CNBP_CA	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
CNBP_CAGA	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
CSTB	0	Nevzťahuje sa	0,00%	99,74%
DIP2B	0	Nevzťahuje sa	0,00%	99,74%
DMPK	42	>99,99%	>99,99%	>99,99%
FMR1	47	> 99,9%	>99,99%	>99,99%
FXN	0	Nevzťahuje sa	0,00%	99,74%
FXN_A	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
GLS	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
HTT	10	>99,99%	83,33%	99,49%
HTT_CCG	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
JPH3	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
NIPA1	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
NOP56	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
NOP56_CGCCTG	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
NOTCH2NL	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
PABPN1	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
PHOX2B	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
PPP2R2B	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
TBP	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
VŠETKY	160	98,12%	92,35%	99,94%

Hodnotenie celkovej hodnoty PPA detekcie expanzie STR vo všetkých miestach predstavuje dobrú aproximáciu hodnoty PPA špecifickej pre dané miesto pomocou dostupných klinických vzoriek. Hodnotenie hodnoty PPA špecificky pre miesto FMR1 môže slúžiť ako dolná hranica pre hodnotu PPA miest, ktoré neboli priamo profilované z dôvodu veľkého prahu pre abnormalitu veľkosti STR.

Presnosť detekcie alel SMN1

Presnosť detekcie neprítomnosti C alely v SMN1 (NM_000344.3:c.840C) bola hodnotená v 26 klinických vzorkách z prípadov s diagnózou spinálnej svalovej atrofie (SMA) a homozygotnou stratou exónu 7 v SMN1 potvrdenou metódou digitálnej kvapôčkovej PCR alebo MLPA. Presnosť identifikácie prítomnosti alely SMN1 c.840C sa hodnotila na predpokladaných zdravých jednotlivých vzorkách krvi. Každý vzorke bola priradená jedna štatistická metrika (skutočne pozitívna (TP), falošne pozitívna (FP), falošne negatívna (FN) alebo skutočne negatívna (TN)) na základe detegovanej prítomnosti (negatívny stav SSA) alebo neprítomnosti (pozitívny stav SSA) alely C v polohe c.840 génu SMN1 v porovnaní s očakávaným stavom. Odhady PPA, TPPV a NPA boli vykonané v rámci pozitívnej aj negatívnej súpravy vzoriek (pozrite si časť [Tabuľka 20](#)).

Tabuľka 20 Metrika presnosti na detekciu neprítomnosti alel SMN1 c.840C

Metrika presnosti	TP	FP	TN	FN	Hodnota metriky presnosti
PPA	26	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	0	>99,99%
TPPV	26	0	Nevzťahuje sa	Nevzťahuje sa	>99,99%
NPA	Nevzťahuje sa	0	195	Nevzťahuje sa	>99,99%

Opakovateľnosť

Presnosť v rámci laboratória

V rámci laboratória sa hodnotila presnosť pomocou extrahovanej gDNA s rôznymi známymi variantmi v celom genóme. Tieto zahŕňali mtSNV v blízkosti a výrazne nad LoD, vzorky obsahujúce alelu SMN1 c.840C a vzorky s opakovanými expanziami FMR a HTT1 v dĺžkach v blízkosti a výrazne nad LoD. Vzorky sa testovali s použitím deviatich jedinečných podmienok navrhnutých s tromi operátormi, tromi šaržami činidiel na prípravu knižníc, tromi šaržami spotrebného materiálu na sekvenovanie a tromi prístrojmi na sekvenovanie.

Každá vzorka bola spustená duplicitne v tom istom chode na vyhodnotenie variácie v rámci chodov a každý testovací prípad bol testovaný dvakrát pre dva chody na každú podmienku pre variáciu medzi jednotlivými chodmi. Každá vzorka bola hodnotená pomocou 36 pozorovaní a dizajn poskytol 18 stupňov voľnosti na hodnotenie opakovateľnosti. Zoznam členov panelu, typ vzorky a vyhodnotenú variantu pre každého člena panelu uvádza [Tabuľka 21](#). Vzorky 1 – 4 a 9 – 12 boli odvodené od mužov aj žien beloškého, afrického a ázijského pôvodu s cieľom poskytnúť rôznorodú súpravu vzoriek.

Tabuľka 21 Zloženie panelu používaného na štúdiu presnosti v rámci laboratória

Panel	Č. vzorky	Typ vzorky	Varianty
A	1	gDNA z krvi	Malé varianty, CNV, ROH, STR nerozšírené, prítomnosť SMN1 c.840C
	2	gDNA z krvi	Malé varianty, CNV, ROH, STR nerozšírené, prítomnosť SMN1 c.840C
	3	gDNA z krvi	Malé varianty, CNV, ROH, STR nerozšírené, prítomnosť SMN1 c.840C
	4	gDNA z krvi	Malé varianty, CNV, ROH, STR nerozšírené, prítomnosť SMN1 c.840C
	5	Vykonštruovaná zmes gDNA z krvi	Mitochondriálne SNV na nízkej úrovni LoD
	6	Vykonštruovaná bunková línia NA20241 ¹	STR rozšírené na miestach FMR1 na nízkej úrovni LoD
	7	Vykonštruovaná bunková línia NA20208	STR rozšírené na miestach HTT na nízkej úrovni LoD
	8	Vykonštruovaná bunková línia NA23686	Absencia SMN1 c.840C
B	9	gDNA z krvi	Malé varianty, CNV, ROH, STR nerozšírené, prítomnosť SMN1 c.840C
	10	gDNA z krvi	Malé varianty, CNV, ROH, STR nerozšírené, prítomnosť SMN1 c.840C
	11	gDNA z krvi	Malé varianty, CNV, ROH, STR nerozšírené, prítomnosť SMN1 c.840C
	12	gDNA z krvi	Malé varianty, CNV, ROH, STR nerozšírené, prítomnosť SMN1 c.840C
	13	Vykonštruovaná zmes gDNA z krvi	mtSNV na vysokej úrovni LoD
	14	Vykonštruovaná bunková línia NA07862	STR rozšírené na miestach FMR1 na vysokej úrovni LoD
	15	Vykonštruovaná bunková línia NA20253	STR rozšírené na miestach HTT na vysokej úrovni LoD
	16	Vykonštruovaná bunková línia NA03814	Absencia SMN1 c.840C

Vysoká úroveň LoD: Frekvencia variantnej alely približne pri 2,0- až 4,0-násobnom LoD.

Nízka úroveň LoD: Frekvencia variantnej alely približne pri 1,0- až 1,5-násobnom LoD.

¹ Výsledky pre NA20241 neboli hlásené v konečných číslach, pretože sa zistilo, že sú výrazne pod 1,0-násobkom LoD, a preto nespĺnili požiadavky na vzorku.

V kvalitatívnom hodnotení sa metriky reprodukovateľnosti uvádzajú, pričom sa s varianty považujú za kvalitatívne entity (variant je prítomný alebo variant nie je prítomný). Pre každý typ variantu boli vyhodnotené a hlásené rôzne definície pozitívnych alebo negatívnych stanovení a rôzne kvalitatívne metriky (Tabuľka 22). Pri posudzovaní reprodukovateľnosti stanovení malých variantov, CNV a ROH sa stanovenia variantov uskutočnené v replikácii charakterizačného chodu použili pre každú vzorku, ktorá slúžila ako porovnávací bod pre všetky ostatné replikáty tejto vzorky v štúdiu.

Tabuľka 22 Súhrn kvalitatívneho hodnotenia reprodukovateľnosti pre každý typ variantu

Typ variantu	Pozitívne	Negatívne	Typ porovnaní	Kvalitatívna metrika
Malé varianty	Filtre splnenia pre stanovenia variantu	Filtre splnenia pre stanovenia homozygotnej referencie	Súlad so súpravou stanovenia z počiatočných chodov charakterizácie	Priemerná pozitívna zhoda (APA) a priemerná negatívna zhoda (ANA)
CNV	Filtre splnenia pre stanovenie CNV	Genomické polohy neprekrývajúce úspešné stanovenie variantov počtu kópií	Súlad so súpravou stanovenia z počiatočných chodov charakterizácie	APA a ANA
ROH	Stanovenie ROH	Genomické polohy neprekrývajúce stanovenie ROH	Súlad so súpravou stanovenia z počiatočných chodov charakterizácie	APA a ANA
Expanzia STR	Vzorka s expanziou STR aspoň na jednom cieľovom mieste	Vzorka bez expanzie v ktoromkoľvek z cieľových miest	Súlad so stavom vzorky definovaným charakterizáciou vzorky ortogonálnou analýzou	Percento pozitívnych stanovení (PPC) a percento negatívnych stanovení (PNC)
Detekcia SMN1 c.840C	Vzorka bez alely C v polohe c.840 SMN1 (pozitívna SMA)	Vzorka obsahujúca aspoň jednu kópiu alely C v polohe c.840 SMN1 (negatívna SMA)	Súlad so stavom vzorky definovaným charakterizáciou vzorky ortogonálnou analýzou	PPC a PNC
mtSNV	Filtre splnenia pre stanovenie mitochondriálneho SNV	Filtre splnenia pre nevariantnú polohu v mitochondriálnych chromozómoch	Súlad s variantnými a nevariantnými stanoveniami v nezriedených vzorkách	PPC a PNC

Kvantitatívne hodnotenie rôznych typov variantov zahŕňalo hodnotenie variability buď kvantitatívnych metrík, ktoré podporujú kvalitatívne stanovenia, alebo v prípade malých variantov metriky súladu vo vzťahu k súboru referenčných stanovení. Táto štúdia vykonala hodnotenie celkovej variability v kvantitatívnych metrikách naprieč replikátmi, ako aj prínosu rôznych faktorov zahrnutých do štúdie k variabilite v týchto kvantitatívnych metrikách prostredníctvom analýzy komponentov variancie. [Tabuľka 23](#) sumarizuje kvantitatívne metriky použité pri analýze každého typu variantu, ako aj faktory, ktoré boli hodnotené z hľadiska príspevku k variabilite v danej kvantitatívnej metrike.

Tabuľka 23 Súhrn kvantitatívnych metrík použitých pri hodnotení presnosti pre rôzne typy variantov

Typ variantu	Kvantitatívna metrika	Hodnotený faktor prispievajúce k variabilite
Malé varianty	APA a ANA	Operátor, šarža súpravy na prípravu knižnice, prístroj, šarža spotrebného materiálu na sekvenovanie, podtyp variantu, genomický kontext
CNV	Normalizovaná hĺbka pokrytia v oblasti CNV	Operátor, šarža súpravy na prípravu knižnice, prístroj, šarža spotrebného materiálu na sekvenovanie, podtyp variantu, dĺžka variantu
ROH	Skóre ROH v oblasti ROH	Operátor, šarža súpravy na prípravu knižnice, prístroj, šarža spotrebného materiálu na sekvenovanie, podtyp variantu, dĺžka variantu
Expanzia STR	Odhadovaná veľkosť STR	Operátor, šarža súpravy na prípravu knižnice, prístroj, šarža spotrebného materiálu na sekvenovanie, miesto STR, dĺžka STR
Detekcia SMN1 c.840C	Pomer logaritmickej pravdepodobnosti pre prítomnosť referenčnej alely (C) v cieľovej polohe	Operátor, šarža súpravy na prípravu knižnice, prístroj, šarža spotrebného materiálu na sekvenovanie, stav SMA
Mitochondriálne SNV	Frekvencia variantnej alely	Operátor, šarža súpravy na prípravu knižnice, prístroj, šarža spotrebného materiálu na sekvenovanie, poloha variantu, očakávaná frekvencia variantnej alely

Výsledky analýzy komponentov variancie uvádza [Tabuľka 24](#). Pri malých variantoch bola väčšina variancie prisúdená reziduálnej chybe a nebola vysvetlená faktormi súvisiacimi s analýzou zahrnutými v návrhu vrátane šarže súpravy na sekvenovanie, prístroja na sekvenovanie, šarže súpravy na prípravu knižnice, operátora a jednotlivými chodmi. Jedna výnimka bola pozorovaná pre SNV v oblastiach so strednou spoľahlivosťou, pre ktoré bola väčšina odchýlok prisúdená šarži súpravy na sekvenovanie. Vo všeobecnosti sa vyššie množstvo variancie pripisovalo faktorom súvisiacim s analýzou malých variantov v oblastiach s nízkou spoľahlivosťou genómu. Pre všetky ostatné typy variantov bola väčšina variancie prisúdená reziduálnej chybe a nie faktorom súvisiacim s analýzou. Táto štúdia ukazuje, že pre väčšinu podtypov malých variantov sa filtrovanie oblastí s

vysokou a strednou spoľahlivosťou v genóme môže použiť na zvýšenie opakovateľnosti a zníženie variability analýzy. Časť [Externá reprodukovateľnosť na strane 65](#) poskytuje komplexnú analýzu reprodukovateľnosti analýzy.

Tabuľka 24 Výsledky štúdie analýzy komponentov variancie

Metrika	Podtyp variantu	Úroveň spoľahlivosti	Reziduum	Šarža súpravy na sekvenovanie	Medzi chodmi	Prístroj	Šarža súpravy na prípravu knižníc	Operátor
APA	Krátka delécia (1 – 5 bp)	Vysoká	79,36%	17,52%	0,00%	0,00%	3,13%	0,00%
		Stredná	76,97%	18,59%	1,53%	0,00%	2,91%	0,00%
		Nízka	67,85%	24,87%	4,4%	0,00%	2,88%	0,00%
	Stredná delécia (6 – 15 bp)	Stredná	61,17%	29,06%	7,42%	0,00%	2,35%	0,00%
		Nízka	59,33%	31,76%	6,38%	0,17%	2,35%	0,00%
	Dlhá delécia (16 – 31 bp)	Stredná	52,93%	33,72%	11,67%	0,17%	1,51%	0,00%
		Nízka	49,10%	37,01%	11,08%	1,42%	1,39%	0,00%
	Krátka inzercia (1 – 5 bp)	Vysoká	89,93%	7,32%	1,76%	0,00%	0,99%	0,00%
		Stredná	74,52%	19,96%	3,44%	0,00%	2,08%	0,00%
		Nízka	60,64%	29,72%	8,49%	0,00%	1,15%	0,00%
	Stredná inzercia (6 – 15 bp)	Stredná	81,76%	15,78%	0,00%	0,00%	2,41%	0,06%
		Nízka	51,28%	35,07%	12,07%	0,00%	1,58%	0,00%
	Dlhá inzercia (16 – 31 bp)	Stredná	87,59%	9,83%	1,18%	0,00%	1,40%	0,00%
		Nízka	52,47%	35,32%	10,14%	0,23%	1,85%	0,00%
	SNV		Vysoká	78,01%	17,45%	0,00%	0,13%	1,23%
Stredná			79,71%	16,95%	0,77%	0,20%	1,29%	1,09%
Nízka			56,63%	36,08%	6,97%	0,22%	0,00%	0,09%
ANA	SNV	Vysoká	55,07%	21,84%	21,07%	1,80%	0,21%	0,00%
		Stredná	28,53%	49,08%	20,11%	1,27%	1,00%	0,00%
		Nízka	51,78%	36,04%	9,76%	2,42%	0,00%	0,00%

Metrika	Podtyp variantu	Úroveň spoľahlivosti	Reziduum	Šarža súpravy na sekvenovanie	Medzi chodmi	Prístroj	Šarža súpravy na prípravu knižníc	Operátor
Hĺbka	PRÍRASTOK CNV (10 kbp, 25 kbp)	Nevzťahuje sa	73,28%	2,87%	0,00%	0,00%	1.01%	0,00%
	GAIN CNV (25 kbp, 50 kbp)	Nevzťahuje sa	72.99%	5.25%	0,00%	0,00%	0,00%	0.56%
	PRÍRASTOK CNV (50 kbp, 100 kbp)	Nevzťahuje sa	66,40%	5,16%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	PRÍRASTOK CNV (100 kbp, 500 kbp)	Nevzťahuje sa	43,51%	14,92%	14,01%	0,20%	0,00%	15,72%
	STRATA CNV (10 kbp, 25 kbp)	Nevzťahuje sa	83,41%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	STRATA CNV (25 kbp, 50 kbp)	Nevzťahuje sa	84,67%	1,20%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	STRATA CNV (50 kbp, 100 kbp)	Nevzťahuje sa	84,16%	2,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	STRATA CNV (100 kbp, 500 kbp)	Nevzťahuje sa	81,25%	5,22%	0,00%	0,00%	0,00%	0,55%

Metrika	Podtyp variantu	Úroveň spoľahlivosti	Reziduum	Šarža súpravy na sekvenovanie	Medzi chodmi	Prístroj	Šarža súpravy na prípravu knižníc	Operátor
Skóre pre oblasť	ROH (1 kbp, 10 kbp)	Nevzťahuje sa	74,32%	1,65%	0,00%	0,00%	0,00%	0,52%
	ROH (10 kbp, 25 kbp)	Nevzťahuje sa	84,78%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (25 kbp, 50 kbp)	Nevzťahuje sa	84,92%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (50 kbp, 100 kbp)	Nevzťahuje sa	85,63%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH (100 kbp, 500 kbp)	Nevzťahuje sa	85,76%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	ROH \geq 500 kbp	Nevzťahuje sa	84,81%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Metrika	Podtyp variantu	Úroveň spoľahlivosti	Reziduum	Šarža súpravy na sekvenovanie	Medzi chodmi	Prístroj	Šarža súpravy na prípravu knižníc	Operátor
Odhadovaná veľkosť pre miesta STR1 ¹	AFF2	Nevzťahuje sa	99,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Metrika	Podtyp variantu	Úroveň spoľahlivosti	Reziduum	Šarža súpravy na sekvenovanie	Medzi chodmi	Prístroj	Šarža súpravy na prípravu knižníc	Operátor
	ATXN7	Nevzťahuje sa	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Metrika	Podtyp variantu	Úroveň spoľahlivosti	Reziduum	Šarža súpravy na sekvenovanie	Medzi chodmi	Prístroj	Šarža súpravy na prípravu knižníc	Operátor
	ATXN7_GCC	Nevzťahuje sa	99,43%	0,57%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNBP	Nevzťahuje sa	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CNBP_CA	Nevzťahuje sa	95,45%	4,55%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	CSTB	Nevzťahuje sa	96,45%	0,87%	2,57%	0,00%	0,00%	0,11%
	DIP2B	Nevzťahuje sa	100%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	FMR1	Nevzťahuje sa	71,02%	10,06%	0,00%	17,33%	0,64%	0,95%
	FXN_A	Nevzťahuje sa	94,52%	1,37%	0,00%	1,37%	1,37%	1,37%
	HTT	Nevzťahuje sa	82,23%	0,00%	11,99%	3,81%	0,00%	1,97%
	HTT_CCG	Nevzťahuje sa	99,43%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	NOTCH2NL	Nevzťahuje sa	99,43%	0,00%	0,00%	0,29%	0,29%	0,00%
	TBP	Nevzťahuje sa	90,91%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Metrika	Podtyp variantu	Úroveň spoľahlivosti	Reziduum	Šarža súpravy na sekvenovanie	Medzi chodmi	Prístroj	Šarža súpravy na prípravu knižníc	Operátor
Pomer pravdepodobnosti logaritmu	c.840C v NA03814	Nevzťahuje sa	65,71%	18,98%	0,00%	0,00%	0,00%	15,32%
	c.840C v NA23686	Nevzťahuje sa	87,64%	0,00%	0,00%	5,90%	0,00%	6,46%
VAF	mtSNV v blízkosti LOD	Nevzťahuje sa	83,13%	0,37%	0,00%	0,00%	0,00%	0,05%

¹ Analýza komponentov variancie nebola vykonaná pre miesta, pre ktoré nebola pozorovaná žiadna variancia.

Príbalový leták

Externá reprodukovateľnosť

Externá reprodukovateľnosť sa stanovila použitím jednej šarže reagensov na prípravu a sekvenovanie knižnice na troch externých pracoviskách skúšania s dvoma operátormi na každom pracovisku. V štúdiu boli použité rovnaké vzorky ako v štúdiu [Presnosť v rámci laboratória na strane 53 \(Tabuľka 21\)](#) s jednou výnimkou: vzorka NA20241 bola nahradená NA20239 na vyhodnotenie expanzie STR miesta FMR1 pri nízkej LoD. Každý operátor na každom pracovisku testoval celkovo 16 jedinečných vzoriek ako dva podpanely po osem jedinečných vzoriek (panel A a panel B). Pre duplicitné knižnice každého podpanelu sa vykonali tri chody sekvenovania, celkovo 36 chodov sekvenovania na jednu jedinečnú vzorku.

Miera úspešnosti vzorky v rámci 576 knižníc vzoriek s platnými chodmi sekvenovania, definovaná ako počet vzoriek, ktoré prešli metrikou QC knižnice vzoriek na prvý pokus, bola 99,1% (571/576; 95% IS: 98,0%, 99,6%). Všetky výsledky testu sú založené na počiatočnom testovaní.

Reprodukovateľnosť SNV, inzercíí, delécií, CNV a ROH sa hodnotila porovnaním údajov s referenčným súborom stanovením na základe obvyklého výkonu v rámci troch chodov charakterizácie ([Tabuľka 25](#) a [Tabuľka 26](#)).

Reprodukovateľnosť expanzií STR, neprítomnosť alely SMN1 c.840C a mtSNV sa hodnotili porovnaním údajov so známym stavom ([Tabuľka 27](#)).

Tabuľka 25 Reprodukovateľnosť analýzy TruSight Whole Genome pre SNV, CNV a ROH

Typ variantu – stratifikácia	Konkordantné pozitívne stanovenia ¹ / Pozitívne stanovenia ²			Priemerná pozitívna zhoda (%) (95% CI) ³
	Pracovisko 1	Pracovisko 2	Pracovisko 3	
Malé varianty (vysoká spoľahlivosť)				
SNV	687 996 150 /	666 509 635 /	688 001 697 /	99,9
	688 770 402	667 253 493	688 766 887	(99,9 – 99,9)
Inzercie – 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)
Delécie – 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)
Malé varianty (stredná spoľahlivosť)				
SNV	42 238 226 /	40 920 370 /	42 236 751 /	98,8
	42 737 228	41 391 560	42 725 827	(98,8 – 98,9)
Inzercie – 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)
Inzercie – 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)
Inzercie – ≥ 16 bp	611 952 /	593 114 /	612 222 /	96,8
	632 214	612 877	632 498	(96,8 – 96,8)
Delécie – 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)
Delécie – 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)
Delécie – ≥ 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)
Malé varianty (nízka spoľahlivosť)				
SNV	78 507 103 /	76 365 789 /	78 863 977 /	81,2
	96 859 682	94 066 720	97 058 652	(81,2 – 81,2)

Typ variantu – stratifikácia	Konkordantné pozitívne stanovenia ¹ / Pozitívne stanovenia ²			Priemerná pozitívna zhoda (%) (95% CI) ³
	Pracovisko 1	Pracovisko 2	Pracovisko 3	
Inzercie – 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)
Inzercie – 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)
Inzercie – ≥ 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)
Delécie – 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)
Delécie – 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)
Delécie – ≥ 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 – prírastky ≥ 10 kbp	7 883 /	7 664 /	7 916 /	95,5
	8 275	8 012	8 282	(95,2 – 95,8)
CNV – straty ≥ 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 Celkový počet konkordantných pozitívnych stanovení = Konkordantné pozitívne dotazy (QCP) + Konkordantné pozitívne referencie (RCP).

² Celkový počet pozitívnych stanovení = Konkordantné pozitívne dotazy (QCP) + Exkluzívne pozitívne dotazy (QEP) + Konkordantné pozitívne referencie (RCP) + Exkluzívne pozitívne referencie (REP).

³ Obojstranný 95% interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 26 Reprodukovateľnosť SNV, CNV a ROH analýzy TruSight Whole Genome pre AN

Typ variantu – stratifikácia	Konkordantné negatívne stanovenia ¹ / Negatívne stanovenia ²			Priemerná negatívna zhoda (%) (95% CI) ³
	Pracovisko 1	Pracovisko 2	Pracovisko 3	
Malé varianty (vysoká spoľahlivosť)	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)
Malé varianty (stredná spoľahlivosť)	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)
Malé varianty (nízka spoľahlivosť)	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 – prírastky ≥ 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 – straty ≥ 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 Celkový počet konkordantných negatívnych stanovení = 2 × konkordantné negatívne (CN).

² Celkový počet negatívnych stanovení = 2 × konkordantné negatívne (CN) + exkluzívne negatívne referencie (REN) + exkluzívne negatívne dotazy (QEN).

³ Obojstranný 95% interval spoľahlivosti (CI) vypočítaný pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Tabuľka 27 Reprodukovateľnosť analýzy pre TruSight Whole Genome STR, SMN1 a mtSNV

Typ variantu – stratifikácia	Celkový počet očakávaných pozitívnych stanovení	Pozitívne stanovenia			Celkový počet očakávaných negatívnych stanovení	Negatívne stanovenia			Percento pozitívnych stanovení (95% CI) ¹	Percento negatívnych stanovení (95% CI) ¹
		Pracovisko 1	Pracovisko 2	Pracovisko 3		Pracovisko 1	Pracovisko 2	Pracovisko 3		
Expanzie STR – vysoká úroveň detekcie (2x – 4x LOD)										
Expanzie STR – FMR1	35	12	11	12	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	100 (90,1 – 100)	Nevzťah uje sa
Rozšírenia STR – HTT	36	12	12	12	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	100 (90,4 – 100)	Nevzťah uje sa
Expanzie STR – kombinácia FMR1 a HTT	71	24	23	24	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	100 (94,9 – 100)	Nevzťah uje sa
Expanzie STR – nízka úroveň detekcie (1x – 1,5x LOD)										
Expanzie STR – FMR1	36	11	10	11	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	88,9 (74,7 – 95,6)	Nevzťah uje sa
Rozšírenia STR – HTT	36	12	12	12	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	100 (90,4 – 100)	Nevzťah uje sa

Typ variantu – stratifikácia	Celkový počet očakávaných pozitívnych stanovení	Pozitívne stanovenia			Celkový počet očakávaných negatívnych stanovení	Negatívne stanovenia			Percento pozitívnych stanovení (95% CI) ¹	Percento negatívnych stanovení (95% CI) ¹
		Pracovisko 1	Pracovisko 2	Pracovisko 3		Pracovisko 1	Pracovisko 2	Pracovisko 3		
Expanzie STR – kombinácia FMR1 a HTT	72	23	22	23	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	94,4 (86,6 – 97,8)	Nevzťah uje sa
Expanzie STR – kombinovaných 28 hlavných cieľových miest STR	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	Nevzťah uje sa	285	96	93	96	Nevzťah uje sa	100 (98,7 – 100)
Absencia SMN1 c.840C	71	24	24	23	285	96	93	96	100 (94,9 – 100)	100 (98,7 – 100)
mtSNV – vysoká úroveň (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 – nízka úroveň (1 x – 1,5 x 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 Obojstranný 95% interval spoľahlivosti vypočítaný pomocou metódy Wilsonovho skóre.

Riešenie problémov

Pomocou nasledujúcej tabuľky sa môžete pokúsiť vyriešiť prípadné problémy v rámci pracovného postupu. Ak cyklus sekvenovania alebo príprava knižnice na vzorku dvakrát zlyhá, môžu sa vyžadovať ďalšie opatrenia na riešenie problémov. Obráťte sa na technickú podporu spoločnosti Illumina.

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Problém s vytvorením chodu	Po vložení spotrebného materiálu nie je možné manuálne vybrať príslušný plánovaný chod v softvéri Riadiaci softvér NovaSeq 6000Dx.	Počas plánovania chodu bolo zadané nesprávne ID skúmavky knižnice.	Pozrite si časť Revízia chodu v dokumente TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument č. 200049931).

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Problém so sekvenovaním	Stav zlyhania sekvenovania v softvéri Illumina Run Manager	Chod sekvenovania bol prerušený alebo sa ho nepodarilo dokončiť z dôvodu problému s prístrojom NovaSeq 6000Dx alebo s manipuláciou so spotrebným materiálom na sekvenovanie.	<p>Pozrite si dokument Produktová dokumentácia k NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument č. 200010105).</p> <p>Po vyriešení problému je možné knižnicu opätovne združiť a opätovne sekvenovať maximálne jedenkrát (z dôvodu objemu).</p>
		Chod bol dokončený, ale nepodarilo sa vykonať klastrovanie. Možný problém s prístrojom NovaSeq 6000Dx, problém s manipuláciou so spotrebným materiálom sekvenovania alebo katastrofická chyba pri príprave knižnice z dôvodu problému s manipuláciou s reagentami alebo chyby operátora (napr. preskočenie kroku alebo odstránenie supernatantu namiesto jeho prenesenia počas výberu veľkosti).	<p>Posúďte výťažnosti jednotlivých knižníc v rámci FLP prostredníctvom qPCR pre $\geq 0,94$ nM (predpokladajme veľkosť vložky 450 bp) na potvrdenie/vylúčenie chyby prípravy knižnice alebo problémov súvisiacich so sekvenovaním.</p> <p>Ak sa vylúčia problémy s prípravou knižnice a existuje podozrenie na problém súvisiaci so sekvenovaním, pozrite si dokument Produktová dokumentácia k NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument č. 200010105).</p> <p>Ak máte podozrenie na problém s prípravou knižnice, pred opakovaním prípravy a sekvenovania knižnice si prečítajte Tipy a techniky na strane 12 a Návod na použitie na strane 15. Ak sa vyskytnú opakované zlyhania, obráťte sa na technickú podporu Illumina.</p>

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Údaje sekvenovania sa nepodarilo preniesť na server	Stav zlyhania prenosu súboru sekvenovania na analýzu v softvéri Illumina Run Manager.	Problém so sieťovým pripojením alebo prerušenie napájania prístroja alebo servera počas prenosu údajov o chode	<p>Skontrolujte prerušenie napájania alebo stratu pripojenia k sieti prístroja. Počkajte, kým bude systém nečinný (po dokončení sekvenovania), potom prejdite do časti Instrument Settings (Nastavenia prístroja), IVD SETTINGS (NASTAVENIA IVD), aby ste potvrdili pripojenie k určenému miestu výstupu pomocou funkcie Browse (Prehľadávať).</p> <p>Ak je potrebné ďalšie riešenie problémov, pozrite si dokument Produktová dokumentácia k NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument č. 200010105). Ak sa po vyriešení problémov s pripojením alebo napájaním prenos súborov nerešartuje a nedokončí, obráťte sa na oddelenie technickej podpory Illumina.</p>

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Analýza sa nespustila	Stav Analysis not started (Analýza sa nespustila) v softvéri Illumina Run Manager, hoci sa prenos súboru sekvenovania na analýzu dokončil.	Párovanie alebo spojenie medzi prístrojom a serverom DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx sa prerušilo alebo exspirovala licencia DRAGEN.	<p>Počkajte, kým bude systém nečinný (po dokončení sekvenovania), potom prejdite na server DRAGEN aby ste potvrdili, že je licencia DRAGEN platná. Ak platnosť licencie vypršala, kontaktujte spoločnosť Illumina. Ak je licencia platná, vyberte položku Run Self-Test (Spustiť autotestovanie). Ak test zlyhá alebo ak možnosť spustiť vlastné autotestovanie nie je k dispozícii, prihláste sa do prístroja a skontrolujte chybu súvisiacu s párovaním k serveru. Pozrite si časť Konfigurácia systému v dokumente Produktová dokumentácia k NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument č. 200010105).</p> <p>Analýza by sa mala po vyriešení problému spustiť automaticky. Ukončíte stránku a prejdite na kartu Active Runs (Aktívne chody), aby ste potvrdili priebeh analýzy. Ak problém pretrváva, kontaktujte spoločnosť Illumina.</p>

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Analýza sa zasekne	Stav Analysis in progress (Prebieha analýza) v softvéri Illumina Run Manager trvá oveľa dlhšie, ako sa očakávalo.	Pripojenie k sieti alebo napájanie prístroja alebo servera mohli byť počas analýzy narušené, čo spôsobilo, že analýza sa zasekla.	<p>Zrušte analýzu a skontrolujte prerušenie napájania alebo stratu pripojenia k sieti prístroja.</p> <p>Počkajte, kým bude systém nečinný (po dokončení sekvenovania), potom prejdite do časti Instrument Settings (Nastavenia prístroja) (IVD SETTINGS (NASTAVENIA IVD)) a potvrdte pripojenie k určenému miestu výstupu. Ak je potrebné ďalšie riešenie problémov, pozrite si dokument Produktová dokumentácia k NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument č. 200010105).</p> <p>Po vyriešení problému obnovte analýzu bez zmien. Pozrite si dokument TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument č. 200049931).</p>

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Súbory analýzy sa nepodarilo preniesť	Stav zlyhania prenosu súboru analýzy do úložiska v softvéri Illumina Run Manager .	Počas prenosu analytických súborov došlo k prerušeniu sieťového pripojenia alebo výpadku napájania prístroja alebo servera	<p>Zrušte analýzu a skontrolujte prerušenie napájania alebo stratu pripojenia k sieti prístroja.</p> <p>Počkajte, kým bude systém nečinný (po dokončení sekvenovania), potom prejdite do časti Instrument Settings (Nastavenia prístroja) (IVD SETTINGS (NASTAVENIA IVD)) a potvrdte pripojenie k určenému miestu výstupu. Ak je potrebné ďalšie riešenie problémov, pozrite si dokument Produktová dokumentácia k NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument č. 200010105).</p> <p>Po vyriešení problému obnovte analýzu bez zmien. Pozrite si dokument TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument č. 200049931).</p>
Analýza zlyhala pri opakovanom zaradení	Analýza zlyhala po opakovanom zaradení.	Ak opakujete zaradenie analýzy, pôvodný chod mohol byť odstránený alebo archivovaný a už nie je na mieste určenom pre umiestnenie externého úložiska	Skontrolujte, či je pôvodný chod stále na mieste externého úložiska. Ak je archivovaný, obnovte ho z archívu a potom znova zaradte analýzu.

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Kontrola kvality sekvenovania zlyhala	Súhrnný výsledok kontroly kvality sekvenovania v konsolidovanej správe je FAIL (Neúspešné).	„Celkové% >=Q30“ pod analytickou špecifikáciou z dôvodu nesprávneho zaobchádzania so spotrebným materiálom sekvenovania (neúplné rozmrazenie alebo prevracanie na premiešanie po rozmrazení)	Pozrite si dokument Produktová dokumentácia k NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument č. 200010105). po preštudovaníPo vyriešení problému je možné knižnicu opätovne združiť a opätovne sekvenovať maximálne jedenkrát (z dôvodu objemu).
Kontrola kvality FASTQ zlyhá pre všetky vzorky	Súhrn výsledkov kontroly kvality FASTQ a Súhrnná kontrola kvality knižnice vzoriek má výsledok FAIL (Neúspešné), s výsledkami metriky kontroly kvality jednotlivých knižníc hlásenými ako ND pre všetky vzorky s výsledkom PASS (Úspešné) v konsolidovanej správe so súhrnným výsledkom kontroly kvality sekvenovania.	Súprava adaptéra indexu špecifikovaná počas vytvárania chodu nie je zhodná s tou, ktorá sa použila pri príprave knižnice.	Zobrazte vzorky na kontrolu informácií o indexe použitom v analýze v softvéri IRM. Ak je potrebná oprava, pozrite si časť Opätovné zaradenie analýzy v dokumente TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (dokument č. 200049931).

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Kontrola kvality FASTQ zlyhá pre jednu alebo viac vzoriek bez nízkej výťažnosti chodu; neindexovaný celkový výnos (GB) $\geq 2\ 800$ GB na S4 alebo $\geq 1\ 000$ GB na S2.	Súhrnný výsledok kontroly kvality FASTQ a súhrnná kontrola kvality knižnice vzoriek má výsledok FAIL (Neúspešné), s výsledkami metriky kontroly kvality hlásenými ako ND pre minimálne jednu, ale nie pre všetky vzorky v konsolidovanej správe bez nízkej výťažnosti chodu.	Chyby pri používaní počas prípravy alebo združovania knižníc	<p>Vyhodnoťte zvyšný objem (objemy) na platničke konečnej knižnice (FLP) na potvrdenie chyby pri používaní vynechaných vzoriek zo združených knižníc. Objem umožňuje operátorovi znova združiť a opätovne sekvenovať maximálne raz. Prípadne znova zaradte neúspešné vzorky v ďalšej šarži prípravy knižnice a spustite ich po preštudovaní časti Návod na použitie na strane 15.</p> <p>Prípadne posúďte výťažnosti jednotlivých knižníc v rámci FLP prostredníctvom qPCR pre $\geq 0,94$ nM (predpokladajme veľkosť vložky 450 bp) na potvrdenie/vylúčenie chýb prípravy knižnice. Znova zaradte neúspešné vzorky v ďalšej šarži prípravy knižnice a spustite ich po preštudovaní časti Návod na použitie na strane 15.</p> <p>Neodporúča sa združovať knižnice medzi viacerými dávkami prípravy knižníc z dôvodu fluktuácií vo výťažnostiach medzi dávkami, ktoré môžu viesť k vyššej CV a vyššej incidencii zlyhania „priemerného autozomálneho pokrytia“.</p>

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Kontrola kvality FASTQ zlyhá pri niektorých vzorkách s nízkou výťažnosťou chodu; neindexovaná celková výťažnosť (GB) nízka, < 2 800 GB pri S4 alebo < 1 000 GB pri S2	Súhrnný výsledok kontroly kvality FASTQ a súhrnná kontrola kvality knižnice vzoriek má výsledok FAIL (Neúspešné), s výsledkami metriky kontroly kvality hlásenými ako ND pre minimálne jednu, ale nie pre všetky vzorky v konsolidovanej správe s nízkou výťažnosťou chodu.	Môže naznačovať problém s prípravou knižnice alebo sekvenovaním.	<p>Posúďte výťažnosti jednotlivých knižníc v rámci FLP prostredníctvom qPCR pre $\geq 0,94$ nM (predpokladá sa veľkosť vložky 450 bp) na potvrdenie/vylúčenie chyby prípravy knižnice alebo problémov súvisiacich so sekvenovaním.</p> <p>Ak máte podozrenie na problém so sekvenovaním, pozrite si dokument Produktová dokumentácia k NovaSeq 6000Dx Instrument (dokument č. 200010105). Po vyriešení problému je možné knižnice opätovne združiť a opätovne sekvenovať maximálne jedenkrát (z dôvodu obmedzeného objemu).</p> <p>Ak máte podozrenie na problém s prípravou knižnice, pred opakovaním prípravy a sekvenovania knižnice si prečítajte Tipy a techniky na strane 12 a Návod na použitie na strane 15. Ak sa vyskytnú opakované zlyhania, obráťte sa na technickú podporu Illumina.</p>

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Kontrola kvality knižnice zlyhala z dôvodu nízkeho pokrytia	Súhrnný výsledok kontroly kvality knižnice vzoriek má výsledok FAIL (Neúspešné) pre jednu alebo viac vzoriek v konsolidovanej správe z dôvodu priemerného autozomálneho pokrytia a/alebo percenta autozómov s pokrytím väčším ako 20X a/alebo priemerného mitochondriálneho pokrytia genómu, ktoré neprekračujúce analytickú špecifikáciu.	Problém (problémy) s kvalitou vzorky alebo prípravou knižnice	<p>Vykonajte opätovnú kvantifikáciu pomocou kontrol procesu, aby ste vylúčili problémy súvisiace so vstupom DNA.</p> <p>Pred opakovaným zaradením neúspešnej vzorky (vzoriek) v ďalšej dávke prípravy knižnice a pred spustením si prečítajte Tipy a techniky na strane 12 a Návod na použitie na strane 15. Ak dôjde k opakovanému zlyhaniu (neúspešnosti) tej istej vzorky (vzoriek), môže to naznačovať problém (problémy) s kvalitou vzorky.</p> <p>Ak sa zlyhanie vyskytne znova, ale pri rôznych vzorkách, môže to naznačovať problém súvisiaci s prípravou knižnice spojený s operátorom, reagensiou, spotrebným materiálom alebo vybavením. Ak problém pretrváva, obráťte sa na oddelenie technickej podpory spoločnosti Illumina.</p>

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Kontrola kvality knižnice zlyhala na základe skreslenia GC	Súhrnný výsledok kontroly kvality knižnice vzoriek je FAIL (Neúspešné) pre jednu alebo viac vzoriek v konsolidovanej správe, pretože normalizované pokrytie pri 60% až 79% GC a/alebo normalizované pokrytie pri 20% až 39% GC neprekračuje analytickú špecifikáciu.	Nadmerné prenesenie ELM alebo preskočenie preplachovania, čo spôsobuje skreslenie GC v pokrytí.	Pred opakovaným zaradením neúspešnej vzorky (vzoriek) v ďalšej dávke prípravy knižnice a pred spustením si pozrite Tipy a techniky na strane 12 a Návod na použitie na strane 15 .
Kontrola kvality knižnice zlyhala na základe kontaminácie jednej alebo viacerých vzoriek, ale nie všetkých vzoriek v chode	Súhrnný výsledok kontroly kvality knižnice vzoriek FAIL (Neúspešné) pre jednu alebo viac vzoriek v konsolidovanej správe, pretože odhadovaná kontaminácia vzorky neprešla analytickou špecifikáciou.	Kontaminovaná vzorka (vzorky) alebo nevymenené špičky počas prípravy vzorky alebo knižnice	Pred opakovaným zaradením neúspešnej vzorky (vzoriek) v ďalšej dávke prípravy knižnice a pred spustením si pozrite Tipy a techniky na strane 12 a Návod na použitie na strane 15 . Ak dôjde k opakovanému zlyhaniu (neúspešnosti) tej istej vzorky (vzoriek), DNA vzorky môže byť kontaminovaná.

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Kontrola kvality knižnice zlyhala na základe kontaminácie všetkých vzoriek v chode	Súhrnný výsledok kontroly kvality knižnice vzoriek sa uvádza ako FAIL (Neúspešné) pre všetky vzorky v konsolidovanej správe, pretože odhadovaná kontaminácia vzorky neprešla analytickou špecifikáciou.	Kontaminovaná reagentia alebo nevymenené špičky počas riedenia vzorky alebo prípravy knižnice	Prečítajte si Tipy a techniky na strane 12 , aby ste zabránili kontaminácii. V ďalšej dávke prípravy knižnice znova zaraďte neúspešné vzorky a spustite ich pomocou čerstvých riedení vzoriek a súpravy na prípravu knižnice.
Súhrnný výsledok ploidie ND	Súhrnný výsledok ploidie v konsolidovanej správe hlásený ako ND (neurčený).	Počas vytvárania chodu bolo pohlavie uvedené ako neznáme. Server DRAGEN hlási výsledok ploidie pohlavia iný ako XX alebo XY, ako napríklad X0 alebo XXY.	Potvrďte, že „poskytnutá ploidia pohlavných chromozómov“ v konsolidovanej správe bola „neznáma“. V údajoch o vzorke sa odporúča uviesť pohlavie ako „muž“ alebo „žena“, ak je pohlavie počas vytvárania chodu známe. Pozrite si výstup „Odhad ploidie“ servera DRAGEN v konsolidovanej správe.

Typ problému	Pozorovanie	Možná príčina	Odporúčané Opatrenie
Súhrnný výsledok ploidie DISCORDANT (Nezhodujúci)	Súhrnný výsledok ploidie hlásený ako DISCORDANT (Nezhodujúci) v konsolidovanej správe.	Potenciálny problém so zámenou vzoriek	Skontrolujte, či boli údaje o vzorke zadané počas vytvárania chodu správne. Ak boli nesprávne, znova zaradte analýzu so zmenami. Ak boli správne a existuje podozrenie na problém so zámenou vzorky, odporúča sa znova zaradiť vo vzorku (vzorky) s výsledkom DISCORDANT (Nezhodujúci) v ďalšej dávke prípravy knižnice a spustiť ju, aby sa zabránilo hláseniu nesprávnych výsledkov. Softvér pre vzorky nevynúti zlyhanie vzorky so súhrnným výsledkom ploidie DISCORDANT (Nezhodujúci).

Referencie

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, 21. apríla 2022. 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, 24. februára 2010. PMID: 20179748; PMCID: PMC2987480.
8. Perlman S. Hereditary Ataxia Overview. 28. október 1998 [aktualizované 16. novembra 2023]. V: 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, 20. októbra 2015. 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 21. septembra 2011. 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, 19. novembra 2007. 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, 30. mája 2012. 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, 17. septembra 2014. 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, 19. septembra 2012. 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 v: *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, 16. júna 2011. 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, 3. apríla 2012. 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, 22. júla 2019. 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, 22. júla 2019. 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, 17. marca 2003. PMID: 12640453.

Príloha A

Súprava indexov S4 1

Index Plate Well ID	Názov indexu	Bázy i7	Bázy i5
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG
G01	UDP0043	CCATCTCGCC	TTCTATGGTT
H01	UDP0044	CTGCGAGCCA	AATCCGGCCA
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA
G02	UDP0071	CTTGTACACC	AAGCGCGCTT
H02	UDP0072	ACACAGGTGG	TGAGCGTTGT

Súprava indexov S4 2

Index Plate Well ID	Názov indexu	Bázy i7	Bázy i5
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

Index Plate Well ID	Názov indexu	Bázy i7	Bázy i5
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	ACATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG
G04	UDP0095	GTATTCCACC	ATGTAGACAA
H04	UDP0096	CCTCCGTCCA	CACATCGGTG

Súprava indexov S2 1

Index Plate Well ID	Názov indexu	Bázy i7	Bázy i5
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACCTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG

Súprava indexov S2 2

Index Plate Well ID	Názov indexu	Bázy i7	Bázy i5
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA

Súprava indexov S2 3

Index Plate Well ID	Názov indexu	Bázy i7	Bázy i5
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

Súprava indexov S2 4

Index Plate Well ID	Názov indexu	Bázy i7	Bázy i5
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG

Príloha B

Ďalšie výpočty pre možnosť 1: 280 ng Vstup DNA pre metódy kvantifikácie Quant a Qubit Broad Range

Výpočet limitov koncentrácie pre koncentráciu zásob DNA 11,2 až 154,0 ng/μl:

Minimálna koncentrácia je založená na vstupe DNA 280,0 ng/objeme 25,0 μl = 11,2 ng/μl.

Na základe minimálneho objemu pipetovania 2,0 μl je maximálna koncentrácia $280 \text{ ng} \cdot 1,1$ (10% prebytok)/2,0 μl = 154,0 ng/μl, v celkovom objeme 27,5 μl.

Príklady výpočtov so vstupom DNA 280,0 ng

Príklad použitia pre koncentráciu zásob DNA = 95,0 ng/μl:

- Objem zásob DNA (μl) = $280,0 \text{ ng} \times 1,1/95,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, zaokrúhli sa na 3,24 μl pre presné pipetovanie s P-10.
- Celkový objem zriedenej DNA je pevne stanovený na 27,5 μl.
- Objem RSB (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, zaokrúhli sa na 24,3 μl pre presné pipetovanie s P-200.

Príklad použitia pre koncentráciu zásob DNA = 308,0 ng/μl:

- Objem zásob DNA (μl) je pevne stanovený na 2,0 μl
- Celkový objem zriedenej DNA (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = 55,0 \mu\text{l}$
- Objem RSB (μl) = $55,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 53,0 \mu\text{l}$

Ďalšie výpočty pre možnosť 2: Vstup DNA 350 ng pre metódu kvantifikácie Accuclear Ultra High Sensitivity

Výpočet limitov koncentrácie pre koncentrácie zásob DNA 14,0 až 192,5 ng/μl:

Minimálna koncentrácia je založená na vstupe DNA 350,0 ng/objeme 25,0 μl = 14,0 ng/μl.

Na základe minimálneho objemu pipetovania 2,0 μl je maximálna koncentrácia $350 \text{ ng} \cdot 1,1$ (10% prebytok)/2,0 μl = 192,5 ng/μl.

Príklad výpočtov s 350,0 ng vstupom DNA

Príklad použitia pre koncentráciu zásob DNA = 118,75 ng/μl:

- Objem zásob DNA (μl) = $350,0 \text{ ng} \times 1,1/118,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, zaokrúhli sa na 3,24 μl pre presné pipetovanie s P-10
- Celkový objem zriedenej DNA je pevne stanovený na 27,5 μl.
- Objem RSB (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, zaokrúhli sa na 24,3 μl pre presné pipetovanie s P-200.

Príklad použitia pre koncentráciu zásob DNA = 308,0 ng/μl:

- Objem zásob DNA (μl) je pevne stanovený na 2,0 μl
- Celkový objem zriedenej DNA (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- Objem RSB (μl) = $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

História revízií

Dokument	Dátum	Popis zmeny
Dokument č. 200050132 v00.1	Máj 2024	Opravený vstupný objem pre metódu kvantifikácie Accuclear Ultra High Sensitivity.
Dokument č. 200050132 v00	Apríl 2024	Úvodné vydanie.

Príbalový leták

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. a jej pridružených spoločností (ďalej len „Illumina“) a sú určené výlučne na zmluvné použitie u zákazníka v súvislosti s používaním výrobku (výrobkov) opísaného (opísaných) v tomto dokumente a na žiadny iný účel. Tento dokument a jeho obsah sa nesmú používať ani šíriť na žiadny iný účel a/alebo inak poskytovať, zverejňovať alebo reprodukovať akýmkoľvek spôsobom bez predchádzajúceho písomného súhlasu spoločnosti Illumina. Spoločnosť Illumina týmto dokumentom neposkytuje žiadnu licenciu na základe patentu, ochrannej známky, autorských práv alebo práv podľa zvykového práva, či podobných práv tretích strán.

Pokyny v tomto dokumente musia byť prísne a výslovne dodržiavané kvalifikovaným a riadne vyškoleným personálom, aby sa zabezpečilo správne a bezpečné používanie tu popísaného výrobku (výrobkov). Pred použitím takéhoto výrobku (výrobkov) je nutné prečítať si a pochopiť celý obsah tohto dokumentu.

NEPREČÍTANIE VŠETKÝCH TU OBSIAHNUTÝCH POKYNOV A ICH VÝSLOVNÉ NEDODRŽANIE MÔŽE MAŤ ZA NÁSLEDOK POŠKODENIE VÝROBKU (VÝROBKOV), ZRANENIE OSOBY VRÁTANE POUŽÍVATEĽOV ALEBO INÝCH OSÔB, POŠKODENIE ĎALŠIEHO MAJETKU A ZRUŠENIE PLATNOSTI ZÁRUKY VZŤAHUJÚCEJ SA NA VÝROBKOV (VÝROBKOVY).

SPOLOČNOSŤ ILLUMINA NEPREBERÁ ŽIADNU ZODPOVEDNOSŤ VYPLÝVAJÚCU Z NEBEZPEČNÉHO POUŽITIA TU POPÍSANÉHO VÝROBKU (VÝROBKOV) (VRÁTANE JEHO SÚČASTÍ ALEBO SOFTVÉRU).

© 2024 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

Všetky ochranné známky sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. alebo príslušných vlastníkov. Informácie o konkrétnych ochranných známkach nájdete na stránke www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktné informácie



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (okrem Severnej Ameriky)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Austrálsky zadávateľ

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

Označenie produktu

Úplné informácie o symboloch, ktoré sa môžu nachádzať na obale a označení produktu, nájdete vo vysvetlivkách symbolov pre vašu súpravu na stránke support.illumina.com na karte *Documentation* (Dokumentácia).