



LNP lemez mindegyik regébe I-t a könyvtár-normalizálási oldószert és a könyvtárgyöngyöket tartalmazó munkaoldatból

- árja le az LNP lemezt Microseal B és egy görg vagy ék használatával majd rázza mikrolemezrázó kész lékkel 1 rpm-en percig



A 9 ; > 9 ; MN Å G

Ha ugyanazon a napon folytatja a szekvenálással most érdemes elkezdni a reagenszetta felolvasztását A megfelelő termék tájékoztatóban található utasításoknak megfelelően olvassa fel a reagenszettt

Helyezze a lemezt mágneses állványra legalább 2 percig vagy amíg a fel lúszó tiszta nem lesz Amíg az LNP lemez a mágneses állványon van távolítsa el a zárófóliát majd óvatosan távolítsa el és ártalmatlanítsa a fel lúszót

Vegye le az LNP lemezt a mágneses állványról és mossa meg a gyöngyöket a könyvtár-normalizálási mosószerttel a következő módon

- a Adjon I könyvtár-normalizálási mosószert LNP lemezen található gyöngyökhöz
- b - árja le az LNP lemezt Microseal B és egy görg vagy ék használatával majd rázza mikrolemezrázó kész lékkel 1 rpm-en percig
- c Helyezze az LNP lemezt a mágneses állványra legalább 2 percig vagy amíg a fel lúszó tiszta nem lesz
- d Szívja le és ártalmatlanítsa a fel lúszót

Ismételje meg a el z lépésben leírt könyvtár-normalizálási mosási eljárást

- árja le az LNP lemezt öntapadós lemezfóliával

A megmaradt mosópuffer el távolításához centrifugálja az LNP lemezt 1 g-vel 2 C-on másodpercig

- 1 Helyezze az LNP lemezt 2 percre a mágneses állványra
- 11 2 I-re állított P2 többszörös pipettával óvatosan szívja le a felesleges könyvtár-normalizálási mosófolyadékot Ne keverje fel a gyöngyöket
- 12 Vegye le az LNP lemezt a mágneses állványról és minden regbe adjon I 1 N Na" H-ot
- 1 - árja le az LNP lemezt Microseal B és egy görg vagy ék használatával majd rázza mikrolemezrázó kész lékkel 1 rpm-en percig
- 1 Az perces elúció közben kezdjen egy új reg PCR-lemezt (ennek az elnevezése es PCR lemez)
- 1 Adjon I könyvtártárolási puffer LNP lemez mindegyik használatban lévő regébe

- 16 Az 5 perces elúció után ellenőrizze, hogy az **LNP** lemezen található minden gyöngy reszuszpendálva van-e. Ha a gyöngyök nincsenek teljesen reszuszpendálva, óvatosan pipettázza fel és le azz üregek tartalmát, vagy ütögesse a lemezt az asztalhoz a reszuszpendáláshoz, majd rázza még 5 percig.
- 17 Helyezze az **LNP** lemezt legalább 2 percre a mágneses állványra.
- 18 Lassan vigye át a felülúszót (körülbelül 30 μ l) az **LNP** lemezből az **SGP** lemeze. Az összekeveréshez óvatosan pipettázza fel és le 5 alkalommal. Minden átvitelhez használjon új pipettahegyet.
- 19 Zárja le az **SGP** lemezt, és centrifugálja 1000 g-vel, 20 °C-on, 1 percig. Folytassa azonnal a *Könyvtár összekeverése* résszel. Ártalmatlanítsa az **LNP** lemezt.

Előkészítés a könyvtár-szekvenáláshoz

Előkészítés

- 1 Állítson be egy 1,5 ml-es centrifugacsövekhez való fűtőblokkot 96 °C-ra.
- 2 Jégvödörben készítsen jeges vizes fürdőt.
- 3 Vegye ki a könyvtárhígítási puffert és a PhiX belső kontrollt a -25 °C és -15 °C közötti tárolóból, és olvassza fel.
- 4 Miután felolvadtak, hűtse le a könyvtárhígítási puffert és a PhiX belső kontrollt a jeges vizes fürdőben.
- 5 Vortexelje a könyvtárhígítási puffert, röviden centrifugálja, és ellenőrizze, hogy minden csapadék feloldódott-e.

A PhiX belső kontroll denaturálása és hígítása

A PhiX belső kontroll 10 nM koncentrációban kerül szállításra, és használat elő denaturálni kell egyszálú DNS-sé, és 20 pM-ra kell hígítani. A következő utasítások 1 ml 20 pM koncentrációjú PhiX belső kontroll előállítására vonatkoznak; ez több (>20) DAL létrehozására elég.

- 1 Készítsen 0,1 N NaOH-oldatot.
- 2 Keverje össze a kémcső több alkalommal történő átfordításával.



VIGYÁZAT!

A frissen elkészített NaOH használata alapvető fontosságú a minták teljes mértékű denaturálásához a szekvenálókészüléken történő klasztergeneráláshoz.



TIPP

Ha a PhiX készítése ugyanazon a napon történik, mint a könyvtár-normalizálás, mindkettőhöz használható ugyanaz a 0,1 N NaOH-készlet.

- 3 Hígítsa a PhiX belső kontroll könyvtárat 2 nM-ra a következők összekeverésével:
 - 2 μ l 10 nM PhiX belső kontrollkönyvtár
 - 8 μ l 1X TE puffer
- 4 Hígítsa a PhiX belső kontroll könyvtárat 1 nM-ra a következők összekeverésével:
 - 10 μ l 2 nM PhiX belső kontrollkönyvtár
 - 10 μ l 0,1 N NaOH
- 5 Az 1 nM PhiX belső kontrollkönyvtár összekeveréséhez röviden vortexelje.
- 6 A tartalom összegyűjtéséhez röviden centrifugálja az 1 nM PhiX belső kontrollkönyvtárat.
- 7 Inkubálja a PhiX belső kontrollkönyvtárat 5 percig, szobahőmérsékleten, hogy egyes DNS-szálakká denaturálódjon.
- 8 A PhiX belső kontrollkönyvtárat tartalmazó csőhöz adjon 980 μ l előhűtött könyvtárhígítási puffert. A denaturált PhiX belső kontrollkönyvtár végső koncentrációja 20 pM.



TIPP

A denaturált 20 pM PhiX belső kontroll könyvtár egyszeri használatra szolgáló adagokra kiosztva 3 hétig tárolható -25°C és -15°C között.

Könyvtárak összekeverése

- 1 Vortexelje a könyvtárhígítási puffert, és ellenőrizze, hogy minden csapadék feloldódott-e.
- 2 A tartalom összegyűjtéséhez röviden centrifugálja.
- 3 Vegyen egy új csavaros kupakos csövet [ennek az elnevezése ezentúl **PAL** (kevert ampliconkönyvtár, Pooled Amplicon Library)].

- 4 Azonosítsa a szekvenáláshoz összekeverendő mintákat. Összesen 96 minta keverhető össze szekvenáláshoz.
- 5 Távolítsa el az **SGP** lemez zárófoliáját. Vigyen át 10 µl-t minden szekvenálni kívánt könyvtárból az **SGP** lemeztől egy 8 csöves PCR-csőbe, minden alkalommal új pipettahegyet használva.
- 6 Zárja vissza az **SGP** lemezt öntapadós zárófoliával, és tárolja -25 °C és -15 °C között legfeljebb 48 óráig.

**TIPP**

Az **SGP** használható kevesebb minta összekeverésére, ha a kezdeti szekvenálási lefedettség nem elegendő.

- 7 Öntse össze a 8 csöves PCR-cső tartalmát a **PAL** csőbe. Alaposan keverje össze a **PAL** cső tartalmát.
- 8 Vegyen 3 új csavaros kupakos csövet [ezek az elnevezése ezentúl **DAL** (hígított ampliconkönyvtár, Diluted Amplicon Library)].
- 9 Adjon 585 µl könyvtárhígítási puffert a **DAL** csövekbe.
- 10 Vigyen át 5 µl denaturált PhiX oldatot (20 pM) mindegyik, könyvtárhígítási puffert tartalmazó **DAL** csőbe. Pipetázza fel és le 3–5 alkalommal, hogy leöblítse a pipettahegyben maradt anyagot, és a teljes mennyiség átvitelre kerüljön.
- 11 Vigyen át 10 µl-t a **PAL** csőből mindegyik **DAL** csőbe. Pipetázza fel és le 3–5 alkalommal, hogy leöblítse a pipettahegyben maradt anyagot, és a teljes mennyiség átvitelre kerüljön.
- 12 Röviden vortexelje a **DAL** csöveket, majd a folyadék összegyűjtéséhez röviden centrifugálja a **DAL** csöveket.

**TIPP**

A használt készlettől függően további könyvtárhígítási puffer lehet szükséges egy másik, a megfelelő szekvenáló készülék Illumina szekvenálási fogyóanyagokat tartalmazó készletéből.

**BIZTONSÁGOSABBAHAGYÁSI PONT**

Ha nem folytatja azonnal a szekvenálással, a **DAL** csövek -25 °C és -15 °C között tárolhatók 84 napig.

Előkészületek a szekvenáláshoz a MiSeqDx készülékkel

- 1 Készüljön elő egy **DAL** cső szekvenálására.
- 2 Ha a **DAL** csövet fagyasztva tárolták, olvassza fel teljesen.
- 3 Keverje össze a **DAL** cső tartalmát teljes sebességgel végzett vortexeléssel.
- 4 Röviden centrifugálja a **DAL** csövet.
- 5 Inkubálja a **DAL** csövet fűtőblokkon, 96 °C-on, 2 percig.
- 6 Az inkubálás után a **DAL** cső összekeveréséhez fordítsa át 1–2 alkalommal, majd azonnal helyezze jeges vizes fürdőbe.
- 7 Hagyja a **DAL** csövet a jeges vizes fürdőben 5 percig.

**VIGYÁZAT!**

A hődenaturálási lépést közvetlenül a **DAL** cső reagenskazettába történő behelyezése előtt végezze el, hogy biztosítsa a sablon hatékony eloszlását a szekvenálási áramlási cellában.

A reagenskazetta előkészítését, a mintakönyvtárak reagenskazettába történő betöltését és a szekvenálási futtatás beállítását lásd a MiSeqDx készülék *terméktájékoztatójában*.

Előkészületek a szekvenáláshoz a NextSeq 550Dx készülékkel

- 1 Készüljön elő egy **DAL** cső szekvenálására.
- 2 Vegyen egy új csavaros kupakos csövet [ennek az elnevezése ezentúl **FDT** (végső hígítási cső, Final Dilution Tube)].
- 3 Ha a **DAL** csövet fagyasztva tárolták, olvassza fel teljesen.
- 4 Keverje össze a **DAL** cső tartalmát teljes sebességgel végzett vortexeléssel.
- 5 Röviden centrifugálja a **DAL** csövet.
- 6 Vigyen át a **DAL** cső tartalmából egy részt az **FDT** csőbe. A megfelelő klasztersűrűség eléréséhez szükséges **DAL**-mennyiség a használt oligonukleotid-keveréktől függ, és jellemzően 130–160 µl között alakul.
- 7 Adjon az **FDT** csőbe könyvtárhígítási puffert, hogy összesen 1300 µl legyen a térfogata.
- 8 Keverje össze az **FDT** csövet maximális sebességgel végzett vortexeléssel.
- 9 Röviden centrifugálja az **FDT** csövet.
- 10 Inkubálja az **FDT** csövet fűtőblokkon, 96 °C-on, 2 percig.

- 11 Az inkubálás után az **FDT** cső összekeveréséhez fordítsa át 1–2 alkalommal, majd azonnal helyezze jeges vizes fürdőbe.
- 12 Hagyja az **FDT** csövet a jeges vizes fürdőben 5 percig.

**VIGYÁZAT!**

A hődenaturálási lépést közvetlenül az **FDT** cső reagenskazettába történő behelyezése előtt végezze el, hogy biztosítsa a sablon hatékony eloszlását a szekvenálási áramlási cellában.

A reagenskazetta előkészítését, a mintakönyvtárak reagenskazettába történő betöltését és a szekvenálási futtatás beállítását lásd a *NextSeq 550Dx készülék* terméktájékoztatójában.

Minőség-ellenőrzési eljárások

A helyes laboratóriumi gyakorlat megköveteli, hogy minden könyvtár-előkészítési használat alkalmával egy pozitív kontrollként szolgáló DNS-mintát és egy negatív (nincs sablon) kontrollmintát használjanak. A pozitív kontrollként szolgáló DNS-mintának egy jól jellemzett, a vizsgált területen ismert variánsokat tartalmazó mintának kell lennie.

A szomatikus munkafolyamathoz minden könyvtár (a kontrollkönyvtárak is) gélelektroforézises vizsgálata történik a korábbiakban leírtak szerint.

Teljesítményjellemzők

A csírvonalbeli géneket tanulmányozó vizsgálatokban vagy a MiSeqDx™ Universal Kit 1.0 (DNS-extrakciós és zavaró anyagok), vagy a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (bemeneti DNS-mennyiség) készletet használták. A két készlet reagenszei azonosak, és a munkafolyamat csak egyetlen lépésben különbözik: a polimeráz-láncreakciós (PCR) lépések számában (28, illetve 32). A TruSeq Custom Amplicon Kit Dx esetében a PCR-ciklusok nagyobb száma lehetővé teszi az alacsonyabb bemeneti DNS-mennyiséget (50 ng) az MiSeqDx Universal Kit 1.0 termékhez képest (250 ng), amit a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx készlettel végzett, a bemeneti DNS-mennyiséget értékelő vizsgálatban mutattak ki. Mindegyik vizsgálatban meg vannak adva a felhasznált könyvtár-előkészítési reagensok és szekvenálási fogyóeszközök, de mindegyik vizsgálat eredményei a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx teljesítményjellemzőit tükrözik, mert egyenértékű a Universal Kit 1.0 készlettel.

A szomatikus variánsokat tanulmányozó vizsgálatokban a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx készletet használták.

A MiSeqDx Universal Kit 1.0 készlettel előkészített vizsgálatokban az Illumina 1-es verziójú szekvenálási fogyóeszközöket használták, míg a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx készlettel előkészített vizsgálatokban a 3-as verziójúakat. A szekvenálás MiSeqDx készülékeken történt. A reprezentatív mutációs panelként kétféles, illetve egygénes pannellel végzett vizsgálatok az illető vizsgálatra specifikus munkafolyamattal és elemzési modulokkal történtek.

A teljesítményjellemzők számításaiban használt definíciók

- 1 A pozitív százalékos egyezés (PPA) a referencia-módszerrel variánsként azonosított locusok közül a vizsgálat által helyesen azonosítottak aránya.
 - $(\text{a vizsgálat által helyesen azonosított variáns locusok száma}) / (\text{variáns locusok száma})$
A vizsgálat és a referencia-módszerrel is helyesen azonosított variáns locusok a valódi pozitívak (TP).
A referenciaként vagy másféle variánsként azonosított, valójában variáns locusok az álnegatívok (FN).
- 2 A negatív százalékos egyezés (NPA) a referencia-módszerrel vad típusúként azonosított locusok közül a vizsgálat által helyesen azonosítottak aránya.
 - $(\text{a vizsgálat által helyesen azonosított vad típusú locusok száma}) / (\text{vad típusú locusok száma})$
A vizsgálat és a referencia-módszerrel is helyesen azonosított vad típusú locusok a valódi negatívok (TN).
A vizsgálat által variánsként azonosított, valójában vad típusú locusok az álpozitívak (FP).
- 3 A teljes százalékos egyezés (OPA) a vizsgálat által a referencia-módszernek megfelelően azonosítottak aránya.
 - $((\text{a vizsgálat által helyesen variánsként azonosított locusok száma}) + (\text{a vizsgálat által helyesen vad típusúként azonosított locusok száma})) / ((\text{variáns locusok teljes száma}) + (\text{vad típusú locusok teljes száma}))$

- 4 A PPA, NPA és OPA számításában nem szerepelnek a nem azonosított locusok (a bármelyik minőségi szűrőnek meg nem felelő variáns vagy referencialocusok). Két vizsgálatban külön szerepelnek a nem azonosított locusok a "helyes azonosítások aránya" mérőszámán belül, és ez meg van jelölve a megfelelő táblázatokban.
- 5 Az azonosítási arány a szűrőknek megfelelő locusok száma osztva a szekvenált vagy jelentendő pozíciók számával. Ebben a mérőszámában nincs figyelembe véve, hogy az azonosítások megegyeznek-e a referencia-módszer eredményével.

Mintaátvitel

Mind a csírvonal, mind a szomatikus munkafolyamat során többféle minta és kontroll könyvtár-előkészítése és szekvenálása történik egyidejűleg. A mintaátviteli vizsgálatban azt értékelték, hogy a könyvtár-előkészítés során az egyik üregből a másikba történő mintaátvitel vagy az egymás utáni futtatások közötti szennyeződés miatti álpozitív eredmények érintik-e a vizsgálati eredményeket. Szomatikus variánsokat vizsgáltak, mert ezek kimutathatók alacsonyabb allélgyakoriság esetén, mint a csírvonalbeli variánsok.

Két panel által kimutatott különböző mutációkat hordozó 4 sejtvonalból származó DNS-mintákat vizsgáltak. A minták közül az egyik egy pozícióban mutációt tartalmazott, a másik pedig vad típusú volt.

Az egyik üregből a másikba történő mintaátvitel definíció szerint olyan hibamód, amely a manuális feldolgozási lépések (pipettázás, minták keverése stb.) során keletkezik. Az egyik mintaüregből a másikba történő mintaátvitel értékeléséhez 2 vizsgálati futtatás történt:

- Két mintát, nagy mennyiségű genomikus DNS-t és az 1. gén mutációját tartalmazó, illetve kis mennyiségű genomikus DNS-t és a 2. gén mutációját tartalmazó mintát helyeztek egy lemez pozícióira felváltva, sakktabla-elrendezésben.
- Két mintát, nagy mennyiségű genomikus DNS-t és a 2. gén mutációját tartalmazó, illetve kis mennyiségű genomikus DNS-t és az 1. gén mutációját tartalmazó mintát helyeztek egy másik lemez pozícióira felváltva, sakktabla-elrendezésben.

Mindegyik futtatásnál összesen 12 ismétlést értékelték álpozitív eredmények szempontjából (vagyis ha az 1. gén mutációját találták a 2. gén mutációját tartalmazó változatként megjelölt mintában vagy fordítva).

A futtatások közötti mintaátvitel definíciója az előző szekvenálási futtatásból esetleg megmaradt anyag által okozott hibamód. A szekvenálási futtatások közötti mintaátvitel meghatározása érdekében 2 lemezt futtattak, mindkettő egyetlen nagy bemeneti DNS-mennyiségű minta 11 ismétlését és egy vakmintát tartalmazott, amelyeket egymás után szekvenáltak egy MiSeqDx készüléken, és értékelték az álpozitív eredményeket. Az első futtatás a 2. gén mutációját tartalmazó 11 ismétlést és 1 vakmintát tartalmazott. A második futtatás az 1. gén mutációját tartalmazó 11 ismétlést és 1 vakmintát tartalmazott. Először a 2. gén mutációját tartalmazó mintakönyvtárat szekvenálták, majd az 1. gén mutációját tartalmazó mintakönyvtárat szekvenálták, majd ismét a 2. gén mutációját tartalmazó mintakönyvtárat. Ha a 2. gén mutációját lehetne megfigyelni a csak az 1. gén mutációját tartalmazó futtatásban, vagy fordítva, ez mintaátvitelt jelentene.

Nulla (0/24, 0%) *mintaiüreges* közötti átvitelre utaló álpozitív eredményt találtak. Mindegyik várt mutációt kimutatták.

Nulla (0/24, 0%) *futtatások közötti* átvitelre utaló álpozitív eredményt találtak. Mindegyik várt mutációt kimutatták.

Nulla (0/48, 0%) *összes* (mintaüreges közötti és futtatások közötti) mintaátvitelre utaló álpozitív eredményt találtak.

A csírvonal munkafolyamat teljesítményjellemzői

A DNS-bemeneti vizsgálatban 23 kromoszómát tartalmazó panelt vizsgáltak reprezentatív mutációs panelként.

A többi vizsgálatban egyetlen gént tartalmazó panelt használtak reprezentatív mutációs panelként.

DNS-extrakció

Három különböző kivonási módszert (mágneses gyöngyökkel, alkoholos kicsapással, illetve szilikon szűrőoszloppal) értékelték K₂-EDTA-val alvadástól teljes vérből. A könyvtárak elkészítése MiSeqDx Universal Kit 1.0 segítségével történt. A vizsgálatban tizennégy (14) egyedi vérmintát használtak, amelyek egy egyénes panelből többféle genotípust képviseltek. A 3 DNS-extrakciós módszert külön vizsgálta 2 különböző felhasználó, akik kivonási módszerként 3 szekvenálási futtatást végeztek. Mindegyik extrakciót mindegyik felhasználó különböző napon végezte. A kivont gDNS-minták DNS-koncentrációját és A260/A280 arányát megmérték spektrofotometriával. A vizsgálatban mindegyik extrakciós módszernél a minták teljes száma 168 volt (14 minta x 2 felhasználó/módszer x 3 futtatás/felhasználó x 2 ismétlés/kivont gDNS-minta). Az egyes módszerekkel kapott eredményeket az [11. táblázat](#) mutatja.

11. táblázat Pontosság, azonosítási arány és a minták első sikerességi aránya kivonási módszerként

Kivonási módszer	Vizsgált minták száma	Azonosítási arány	Pontosság ¹	Minta első sikerességi aránya ²
Alkoholos kicsapás	168	100%	100%	100%
Szilikon szűrőoszlopos elválasztás	168	100%	100%	100%
Mágneses gyöngyökkel végzett kivonás	168	100%	100%	100%

¹Pontosság – A referenciamódszerrel (kétirányú szekvenálás Sanger szerint) való egyezés százalékos aránya azon bázispozíciók között, amelyeknél történik bázisazonosítás.

²Minta első sikerességi aránya – A megadott azonosítási arálynak az első feldolgozás alkalmával (tehát ismételt futtatás vagy feldolgozás nélkül) megfelelt minták száma a MiSeqDx szekvenálási kísérlet során futtatott összes minta százalékos arányaként.

Bemeneti DNS mennyisége

A könyvtárkészítéshez (TruSeq Custom Amplicon Kit Dx) bevitt DNS mennyiségének tartományát egy sorozatos hígítási vizsgálatban értékelték, amelyben 13 DNS-mintán reprezentatív vizsgálatot végeztek 23 különböző kromoszómán található, összesen 12 588 bázist tartalmazó különböző gének leolvasásával. A szekvenáláshoz a MiSeqDx Reagent Kit v3 készletet használták.

Mindegyik mintát 5 bemeneti DNA-mennyiségben vizsgálták 250 ng és 12 ng között (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng és 12 ng). A pontosság meghatározásához a minták genotípusát a Platinum Genomes 2016-01 verziójával hasonlították össze. Az eredményeket meghatározták mindegyik bemeneti mennyiség esetében. Minden variánstípus (deléció, inzerció és SNV) PPA-értékét mutatja az [12. táblázat](#); az NPA-t a [13. táblázat](#) tartalmazza. Mindegyik bemeneti szint hasonló pontosságot mutatott. Az ajánlott bemeneti DNS-mennyiség 50 ng; a pontossági nyilatkozat érvényességének határértékei 25 ng, illetve 100 ng.

12. táblázat Mindegyik bemeneti DNS-mennyiség PPA-értéke variánstípusok szerint

Bemeneti DNS mennyisége (ng)	Variáns típusa	Várt variáns	Teljes TP	Teljes FN	Variáns azonosításának hiánya	PPA (%)
12	Deléció	552	534	3	15	99,4
25			541	0	11	100
50			542	0	10	100
100			542	0	10	100
250			542	0	10	100
12	Inzerció	588	569	0	19	100
25			572	0	16	100
50			572	0	16	100
100			572	0	16	100
250			572	0	16	100
12	SNV	1752	1725	2	25	99,9
25			1739	3	10	99,8
50			1742	0	10	100
100			1740	0	12	100
250			1735	0	17	100

13. táblázat NPA az egyes bemeneti DNS-mennyiségek esetén

Bemeneti DNS mennyisége (ng)	Várt variáns	TN	FP	Referencia azonosítás hiánya	NPA (%)
12	2892	307179	0	3935	100
25	2892	309767	0	1347	100
50	2892	309999	0	1115	100
100	2892	309754	0	1360	100
250	2892	308922	0	2192	100

Zavaró anyagok

A zavaró anyagok könyvtár-előkészítésre gyakorolt hatásának felméréséhez reprezentatív vizsgálatot végeztek egy 11 529 bázisból álló gén leolvasásával a potenciálisan zavaró anyagok jelenlétében és azok hiányában. A könyvtárak elkészítése Universal Kit 1.0 segítségével történt. A vizsgálatban nyolc (8) egyedi genotípusú 8 teljesvérmintát használtak. Négy endogén anyag (bilirubin, koleszterin, hemoglobin és triglicerid) vizsgálatához azokat hozzáadták a vérmintákhoz a DNS kivonása előtt. A vérvételből eredő interferencia (túl kevés vér levétele) értékeléséhez 2 különböző koncentrációban EDTA-t adtak a vérmintához. Az egyes anyagok koncentráció-határértékei a 14. táblázatban láthatók. A minta-előkészítésből eredő zavaró hatás értékelésére 8 tisztított genomikus DNS-hez 15% mosópuffert adtak. Az egyénes panelt használták. 100%-os azonosítási arányt értek el minden vizsgált minta esetében, valamint a genotípus-azonosítás 100%-os reprodukálhatóságát a zavaró anyagok jelenlétében és hiányában vizsgált minták között.

14. táblázat Azonosítási arány a vizsgált anyagok esetén

Vizsgált anyag	Ismétlések teljes száma	Vérkoncentráció (felső határ)	Vérkoncentráció (alsó határ)	Azonosítási arány
Bilirubin	16	684 µmol/L	137 µmol/L	100%
Koleszterin	16	13 mmol/L	2,6 mmol/L	100%
Hemoglobin	16	2 g/L	0,4 g/L	100%
Triglicerid	16	37 mmol/L	7,4 mmol/L	100%
EDTA	16	7 mg/mL	2,8 mg/mL	100%

A szomatikus munkafolyamat teljesítményjellemzői

A DNS-bemeneti vizsgálatban 26 gént tartalmazó panelt vizsgáltak reprezentatív mutációs panelként. A többi vizsgálatban 2 gént tartalmazó panelt használtak reprezentatív mutációs panelként.

Bemeneti DNS mennyisége

FFPE mintákból kivont, 9 különböző szövetből származó DNS-mintákat értékelték a TruSeq Custom Amplicon Dx - FFPE QC használatával. Az FFPE QC szerint minden minta esetében megmérték a Cq értéket, és összehasonlították egy kontrollal a ΔCq értékek számításához, amelyek -1,2 és 6,4 között alakultak. A mintákat 1:8, 1:4 és 1:2 arányban hígítva, illetve hígítatlanul elemezték a készlet utasításainak megfelelően. Egyes mintákat tovább hígítottak (legfeljebb 1:64 arányban) a ΔCq értékek növelése érdekében. Két olyan mintát, amelyek ΔCq értéke 1:8 arányú hígítást indokolt, hígítás nélkül dolgoztak fel az ajánlottnál magasabb bemeneti koncentrációk vizsgálatához. Minden hígítást feldolgozták könyvtár-előkészítéssel és szekvenálással. A szövettípustól függő célgéneken a szomatikus variáns modullal végzett variánsazonosításokat összehasonlították a kétirányú, Sanger szerinti szekvenálás eredményével. A hígításokat a ΔCq négyféle tartományának egyikébe sorolták, és elemezték a pontosság és az azonosítás hiánya tekintetében (15. táblázat). A bemenet felső határértéke a ΔCq 2-es értéke, amelyet a <2 -es ΔCq értékű minták többszöri hígításával érnek el. A ΔCq alsó határértéke 4. A 2-4 közötti ΔCq értékek esetén egyforma pontosság érhető el. Az FFPE mintáknál a ΔCq érték használata a kívánt pontosság és precizitás eléréséhez szükséges határérték meghatározására szolgál.

15. táblázat Pontosság és az azonosítás hiánya ΔCq csoportonként

ΔCq csoport	Variánsok				Vad típusú pozíciók				
	Várt	TP	FN	Nincs azonosítás	PPA	TN	FP	Nincs azonosítás	NPA
ΔCq -1,2 és -0,8	1	1	0	0	100	1387	1	0	99,9
ΔCq 1,5-4	19	18	0	1	100	14358	1	78	99,9
ΔCq ~4	19	18	0	1	100	14333	1	103	99,9
ΔCq ~5	22	20	2	0	90,9	15878	1	439	99,9

Extrakció

Az extrakciós módszereket összehasonlító vizsgálat történt a kereskedelmi forgalomban lévő 3 kivonási készlet könyvtár-előkészítésre gyakorolt hatásának értékelésére. A készletek alapját oszlopok képezték, és tartalmaztak reagenseket a paraffin eltávolítására és az FFPE szövetekre jellemző, formalin által okozott keresztkötések részleges eltávolítására. A módszereket módosították a proteináz K mennyiségének megkétszerezésével és az emésztés egy éjszakán keresztül, rázással történő elvégzésével. A kivont DNS mennyisége az illető készlet legkisebb ajánlott mennyisége, de legalább 30 µl volt. Mindegyik extrakciós készlettel tíz (10) minta vizsgálata történt 2-2 példányban. Minden kivonási készlettel végzett összes ismétlés (20/20) megfelelt a minőség-ellenőrzési specifikációknak. A reprezentatív vizsgálat két gént tartalmazott.

A PPA 100% (16/16) és az NPA 100% (1104/1104) volt mindegyik készlet esetén. Referenciamódszerként a Sanger szerint végzett szekvenálás történt.

Zavaró anyagok

A zavaró anyagokat értékelő vizsgálatot végeztek a potenciálisan zavaró anyagok könyvtár-előkészítésre gyakorolt hatásának értékelésére. A vizsgálat teljesítményét értékelték exogén anyagok (paraffinviasz, xilol, etanol, proteináz K, kivonási oldatok), valamint endogén anyagok (nekrotikus szövetek és hemoglobin) jelenlétében.

Exogén anyagok

A vizsgált exogén anyagok a [16. táblázatban](#) a vizsgált mennyiségekkel együtt felsorolt, a DNS-extrakció során gyakran használt kivonási oldatok. Minden zavaró anyag esetén tizenöt (15) mintát vizsgáltak, és ezeket összehasonlították a nem kezelt kontrollokkal. A minták között voltak az 1. génpanelhez tartozó mutációktól mentes, vad típusú minták (5 minta a 15-ből), valamint mutációkat tartalmazó minták (10 minta a 15-ből). A mintákat maximális multiplexelési szinten, futtatásonként 10 mintával plusz kontrollokkal futtatták.

16. táblázat Vizsgált anyagok

Zavaró anyag	Tényleges mennyiség [μl / 25 μl eluátum]
Deparaffinizálási oldat	$1,69 \times 10^{-04}$
Paraffinviasz (xilolban oldva)	$2,50 \times 10^{-05}$
Xylol	$2,50 \times 10^{-05}$
Etanol	$1,69 \times 10^{-04}$
Proteináz K ¹	$3,30 \times 10^{-06}$
Mosóoldat ²	$6,25 \times 10^{-01}$
1X mosóoldat ³	$6,25 \times 10^{-01}$
AW1 mosópuffer ¹	$6,25 \times 10^{-02}$
AW2 mosópuffer ¹	$6,25 \times 10^{-01}$

¹⁻³Három, a kereskedelemben kapható DNS-elkülönítési készlet.

Minden vizsgált exogén anyag esetén mind a 15 minta megfelelt a mintaminősítési feltételnek (15/15, a mintaminőség-ellenőrzési megfelelési arány 100%) és érvényes eredményt adtak a könyvtár-előkészítés és szekvenálás után (15/15, a minta első megfelelésének aránya 100%).

A PPA kiszámítása csövenkénti alapon történik. Az OPA és az NPA kiszámítása DNS-szinten, mutációnkénti alapon történik, mintánként 56 mutáció van DNS-szinten. Mind a 9 exogén anyag esetében mind a 15 minta eredménye megegyezett a nem kezelt kontrollmintáéval mindegyik mutáns (10/10) és nem mutáns pozíció (830/830) esetében. Az FFPE szövetből történő genomikus DNS (gDNS) kivonási folyamata során várható maximális koncentrációban jelen lévő potenciálisan zavaró anyagok egyike sem befolyásolja a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx teljesítményét.

Endogén anyagok (hemoglobin)

Tizenöt (15) colorectalis FFPE mintát vizsgáltak a CLSI szerint „magas”, 2 mg/mL koncentrációjú hemoglobin jelenlétében és hiányában. A minták között voltak reprezentatív panelmutációktól mentes, vad típusú minták (5 minta a 15-ből), valamint reprezentatív panelmutációkat tartalmazó minták (10 minta a 15-ből). A mintákat maximális multiplexelési szinten, futtatásonként 10 mintával plusz kontrollokkal futtatták. Mind a 15 minta megfelelt a mintaminősítési feltételnek (15/15, a mintaminőség-ellenőrzési megfelelési arány 100%) és érvényes eredményt adtak a könyvtár-előkészítés és szekvenálás után (15/15, a minta első megfelelésének aránya 100%). Mind a 15 minta eredménye megegyezett a nem kezelt kontrollmintáéval mindegyik mutáns (10/10) és nem mutáns pozíció (830/830) esetében. A vizsgált minta hemoglobintartalma nem befolyásolja a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx teljesítményét.

Endogén anyagok (nekrotikus szövetek)

Az endogén nekrotikus minták értékelése céljából tizenöt (15) colorectalis FFPE mintát, köztük panelmutációktól mentes, vad típusú mintákat (10 minta a 15-ből), valamint reprezentatív panelmutációkat tartalmazó mintákat (5 minta a 15-ből) és patológiai vizsgálattal meghatározott, 10–80%-nyi nekrotikus szövetet tartalmazó mintákat vizsgáltak. A mintákat maximális multiplexelési szinten, futtatásonként 10 mintával plusz kontrollokkal futtatták. A 15 mintából 14 esetben érvényes eredmény született a könyvtár-előkészítés és szekvenálás után (a minta első sikerességi aránya 93,3%). A Sanger szerinti szekvenálással összehasonlítva a teljes százalékos egyezési arány 99,9% (783/784) volt. A PPA értéke 100% (4/4), az NPA értéke pedig 99,87% (779/780) volt. Az 1 kimutatott álpozitív mintát valószínűleg a Sanger szerinti szekvenálás kimutatási határértéke alatti gyakoriságú mutáció okozta. Összességében, a TruSeq Custom Amplicon Kit Dx megfelel a teljesítményjellemzőknek a 10–80% nekrotikus szövetet tartalmazó minták esetében.

Szabadalmak és védjegyek

A jelen dokumentum és annak tartalma az Illumina, Inc. és annak leányvállalatai („Illumina”) tulajdonát képezi, és kizárólag a jelen dokumentumban ismertetett termék(ek) szerződésszerű működtetéséhez használható. Egyéb célokra nem használható. A dokumentum és annak tartalma az Illumina előzetes írásos engedélye nélkül ettől eltérő célokra nem használható és forgalmazható, továbbá semmilyen formában nem kommunikálható, hozható nyilvánosságra vagy reprodukálható. Az Illumina a jelen dokumentummal nem adja át a tulajdonában lévő szabadalmi, védjegyjogi, szerzői jogi vagy szokásjogi licenceket, illetve a harmadik felek birtokában lévő hasonló jogosultságokat.

A jelen dokumentumban szereplő utasításokat a kvalifikált és megfelelően képzett személyzetnek szigorúan be kell tartania az itt ismertetett termék(ek) megfelelő és biztonságos használata érdekében. A termék(ek) használata előtt a felhasználó köteles átolvasni és értelmezni a jelen dokumentumban leírtakat.

AZ ITT SZEREPLŐ INFORMÁCIÓK ELOLVASÁSÁNAK VAGY AZ UTASÍTÁSOK BETARTÁSÁNAK ELMULASZTÁSA ESETÉN A TERMÉK(EK) MEGSÉRÜLHETNEK, ILLETVE SZEMÉLYI SÉRÜLÉS KÖVETKEZHET BE, IDEÉRTVE A FELHASZNÁLÓKAT ÉS MÁSOKAT IS, ILLETVE EGYÉB ANYAGI KÁROK KÖVETKEZHETNEK BE. EZENFELÜL ILYEN ESETEKBE A TERMÉK(EK)RE VONATKOZÓ GARANCIA ÉRVÉNYÉT VESZTI.

AZ ILLUMINA SEMMIFÉLE FELELŐSSÉGET NEM VÁLLAL AZ ITT BEMUTATOTT TERMÉK(EK) HELYTELEN HASZNÁLATÁBÓL FAKADÓ KÁROKÉRT (AZ ALKATRÉSZEKET ÉS A SZOFTVERT IS IDEÉRTVE).

© 2021 Illumina, Inc. Minden jog fenntartva.

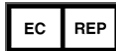
Minden védjegy az Illumina, Inc., illetve az adott tulajdonosok tulajdonát képezi. A védjegyekkel kapcsolatos információkat lásd a www.illumina.com/company/legal.html oldalon.

Az AMPure, a Beckman és a Beckman Coulter a Beckman Coulter, Inc. védjegyei vagy bejegyzett védjegyei.

Kapcsolat



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 Egyesült
Államok
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (Észak-Amerikán kívül)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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



Ausztrál szponzor:
Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Ausztrália

A terméken található címkék

A terméken és a csomagolásán megjelenő címkéken látható szimbólumok teljes magyarázatát megtekintheti a support.illumina.com honlapon az Ön készletére vonatkozó *Documentation and Literature* (Dokumentáció és irodalom) lapon található szimbólum ikonra kattintva.