

Priložene upute

ZA IN VITRO DIJAGNOSTIKU.

Namjena

TruSight™ Whole Genome je kvalitativni *in vitro* dijagnostički uređaj namijenjen sekvenciranju cijelog genoma i detekciji pojedinačnih nukleotidnih varijanti, umetanja/brisanja, varijanti broja kopija, nizova homozigotnosti, kratkih tandemskih ponovljenih ekspanzija i mitohondrijskih varijacija u ljudskoj genomskoj DNK ekstrahiranoj iz krvi.

TruSight Whole Genome sadrži TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes i TruSight Whole Genome Analysis Application Softverom. Uređaj je namijenjen za upotrebu s kompatibilnim daljnjim aplikacijama zametne linije za razvoj *in vitro* dijagnostičkih testova te od strane kvalificiranog laboratorijskog osoblja i dizajnera testova.

TruSight Whole Genome namijenjen je za uporabu s NovaSeq™ 6000Dx Instrument.

Sažetak i objašnjenje

TruSight Whole Genome je test sekvenciranja sljedeće generacije koji koristi pripremu biblioteke bez PCR-a temeljenu na označavanju, počevši od genomske DNK (gDNK) ekstrahirane iz periferne pune ljudske krvi, te sekvenciranja i primarne analize na Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument.

Sekundarna analiza izvodi se softverom TruSight Whole Genome Analysis Application na uključenom i potrebnom Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx i uključuje demultipleksiranje, usklađivanje s GrCh38/hg38 ljudskim referentnim genomom i očitavanje varijanti, kao i označavanje i primjenu specifikacija metričke kontrole kvalitete (QC) [Tablica 1](#) kako bi se osigurala analitička izvedba. Izlazi analize uključuju izvješća o kontroli kvalitete obrade i uzorka te datoteke formata očitavanja varijanti genoma (VCF) za upotrebu s kompatibilnim softverom za daljnju analizu i izvješćivanje.

TruSight Whole Genome široko procjenjuje genomske varijante u kodirajućim i nekodirajućim regijama ljudskog genoma. Procjena varijanti uključuje otkrivanje malih varijanti, varijanti broja kopija (CNV), obrada homozigotnosti (ROH) i ekspanzija ponavljanja kratkog tandema (STR). Osim toga, TruSight Whole Genome otkriva odsutnost alela SMN1 c.840C (NM_000344.3:c.840C>T), što može ukazivati na brisanje gena SMN1 ili konverziju gena SMN1/SMN2.^{1,2} Bialelni gubitak alela SMN1 c.840C odgovoran je za približno 95 % slučajeva spinalne mišićne atrofije (SMA).³

[Tablica 2](#) pruža informacije o vrstama varijanti koje su potvrđene putem TruSight Whole Genome.

Tablica 1 TruSight Whole Genome Specifikacije metrike kvalitete

Vrsta izlaza	Metrika	Specifikacija
Kontrola kvalitete obrade sekvenciranjem	Ukupni % \geq Q30	\geq 85,0
FASTQ QC	Podatci po uzorku (bps)	\geq 90.000.000.000
Kontrola kvalitete biblioteke uzoraka	Prosječna autosomna pokrivenost	\geq 35,0
	Postotak autosoma s pokrivenošću većom od 20X	\geq 93,94
	Normalizirana pokrivenost od 60 % do 79 % GC spremnika	$0,82 \leq x \leq 1,13$
	Normalizirana pokrivenost od 20 % do 39 % GC spremnika	$0,97 \leq x \leq 1,06$
	Prosječna mitohondrijska pokrivenost	\geq 500,0
	Postotak baza Q30	\geq 85,0
	Procijenjena kontaminacija uzorka	\leq 0,005

Tablica 2 Otkrivene varijante potvrđene putem TruSight Whole Genome

Vrsta varijante	Potvrđeno otkrivanje varijante
Male varijante	Varijante jednog nukleotida (SNV-ovi), kratka umetanja/brisanja (1 – 31 bp)
Varijante brojeva kopija (CNV)	dobici i gubici \geq 10 kb
Obrade homozigotnosti (ROH)	\geq 500 kb
Mitohondrijski SNV-ovi	% heteroplazmije ako \geq 4,75 %
Ekspanzije kratkog tandemskog ponavljanja (STR).	Ciljana mjesta (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, and TBP)
Varijanta SMN1	NM_000344.3:c.840C/T

Načela postupka

TruSight Whole Genome je namijenjen za pripremu biblioteka bez PCR-a za proizvodnju podataka o sekvenciranju ljudskog cjelovitog genoma. Test počinje pripremom biblioteka iz kvantificirane genomske DNK ekstrahirane iz periferne ljudske pune krvi, uključuje sekvenciranje i analizu na NovaSeq 6000Dx Instrument pomoću TruSight Whole Genome Analysis Application, a završava očitavanjem varijanti i označavanjem.

Postupak TruSight Whole Genome testa sastoji se od sljedećih koraka:

- **Batch Planning and Run Creation** (Planiranje serije i stvaranje obrade) – Preporučuje se planirati seriju i obrade prije početka pripreme biblioteke. U seriji za pripremu biblioteke može se pripremiti do 24 biblioteke uzoraka. Na temelju broja uzoraka mogu se koristiti različite konfiguracije protočnih stanica (6-pleksna na S2 i 16-pleksna na S4). Library Tube ID (identifikacija epruvete biblioteke), nazivi uzoraka i odgovarajuće indeksiranje bilježe se tijekom planiranja obrade i stvaranja obrade. Za više informacija o stvaranju obrade pogledajte TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (broj dokumenta 200049931). Slijedite planiranu seriju tijekom izvođenja radnog tijeka pripreme biblioteke.
- **Preparation for Protocol** (Priprema za protokol) – neki reagensi su zamrznuti i moraju se zagrijati na sobnu temperaturu. Zbog kratkog tijeka rada, moguće je završiti pripremu i započeti sekvenciranje isti dan. Stoga se potrošni materijal za sekvenciranje za planirane obrade može otopiti i tijekom ovog koraka. Kvantificirani uzorci genomske DNK odmrzavaju se i razrjeđuju za optimizirani unos DNK.
- **Library Preparation (Priprema biblioteke)**
 - **Tagment Genomic DNA** (Tagmentacija genomske DNK) – Koristi Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) za označavanje ulazne DNK. Tijekom tagmentacije, gDNK je fragmentirana, označena adapterima i imobilizirana na površini magnetskih BLT-PF zrnaca.
 - **Post Tagmentation Cleanup** (Čišćenje nakon tagmentacije) – Čisti DNK s oznakom adaptera na BLT-PF i uklanja međuspremnik za zaustavljanje radi pripreme za Ligate Indexes (Indekse vezanja).
 - **Ligate Indexes** (Vezani indeksi) – Dodaje jedinstvene dvostruke indekse bibliotekama kako bi se omogućilo multipleksiranje. Provodi proširenje praznine i eluira jednolančane biblioteke DNK sa zrnaca.
 - **Size-Selection and Clean Up Libraries** (Odabir veličine i čišćenje biblioteke) – Postupak pročišćavanja zrnaca s dvostranim odabirom veličine uklanja fragmente koji su premali i preveliki za ciljanje srednje duljine fragmenta od približno 450 bp, raspon ~360 do 550 bp.
 - **Pool and Denature Libraries** (Objedinjavanje i denaturiranje biblioteka) – Značajka samonormalizacije BLT-PF omogućuje objedinjavanje volumena bez qPCR-a ili druge normalizacije. Navedeni volumen svake biblioteke objedinjava se prema planu za svaku obradu i denaturira s 0,2N NaOH (razrijeđen HP3). Denaturirani skup zatim se prenosi u Library Tube NovaSeq 6000Dx (Eupruvetu biblioteke) s identifikacijom koja odgovara planiranoj obradi.
- **Sequencing and Analysis** (Sekvenciranje i analiza) – Potrošni materijali u konfiguraciji S2 i/ili S4 učitavaju se u sustav NovaSeq 6000Dx Instrument, uključujući povezanu epruvetu(e) NovaSeq 6000Dx biblioteke sa objedinjenim bibliotekama. Nakon učitavanja, Library Tube ID (identifikacija epruvete biblioteke) skenira se i, ako se unese tijekom planiranja obrade, koristi se za odabir odgovarajuće planirane obrade. U suprotnom, potrebno je ručno odabrati povezanu planiranu obradu.

Objedinjene biblioteke grupiraju se u protočnu stanicu, a zatim se sekvenciraju pomoću kemije sekvenciranja sintezom (SBS) na NovaSeq 6000Dx. Kemijski postupak SBS upotrebljava metodu reverzibilnog terminatora za otkrivanje fluorescentno označenih baza s jednim nukleotidom dok se oni umeću u rastuće DNK lance.

Softver Real-Time Analysis (RTA) izvodi primarnu analizu koja uključuje osnovno očitavanja i dodjeljivanje ocjene kvalitete svakom osnovnom očitavanju. Podaci primarne analize automatski se prenose na Illumina DRAGEN poslužitelj.

Demultiplexiranje i DRAGEN analiza automatski se provode pomoću TruSight Whole Genome Analysis Application. Kao dio te analize, svaka obrada i biblioteka uzoraka pregledavaju se radi valjanosti pomoću analitičkih metrika opisanih u [Kontrola kvalitete na stranici 32](#), a rezultati se daju u konsolidiranim i pojedinačnim izvješćima o uzorcima. Za valjane biblioteke uzoraka generiraju se datoteke Variant Call Format (VCF) (Format očitavanja varijanti) s označenim genomom. Dodatne informacije o tijeku analize potražite u TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (broj dokumenta 200049931).

Ograničenja postupka

- Za *in vitro* dijagnostiku.
- TruSight Whole Genome je kompatibilan s genomskom DNK-u dobivenom iz ljudske periferne pune krvi.
- Test ne uključuje reagense za ekstrakciju ili kvantifikaciju DNK-a. Rezultati analitičkog testiranja, uključujući [Ometajuće tvori na stranici 37](#), dobiveni su s punom krvlju korištenjem reprezentativnih kompleta za ekstrakciju DNK-a i kompleta za kvantifikaciju DNK-a. Svi dijagnostički testovi razvijeni za korištenje s TruSight Whole Genome zahtijevaju potpunu provjeru svih aspekata izvedbe s kompletima za ekstrakciju DNK-a i kvantifikaciju DNK-a po izboru.
- Test je konfiguriran i ispitan za pleksitet uzoraka i skupove indeksa navedene u sljedećoj tablici.

Veličina serije za pripremu biblioteke	Pleksnost	Konfiguracija obrade	Indeksiranje
6, 12, 18 ili 24 uzorka	6-pleksni	1-4 obrade S2	1 do 4 kompleta S2
16 uzoraka	16-pleksni	1 obrada S4	1 ili 2 kompleta S4
22 uzorka	16-pleksni + 6-pleksni	1 obrada S4 + 1 obrada S2	1 ili 2 kompleta S4, 1 do 4 kompleta S2 (ne koristi se za S4)

- Test ne provodi praćenje pozitivnih uzoraka. Dok se sažeti rezultat kontrole kvalitete ploidnosti koji prijavljuje softver može opcionalno koristiti za identifikaciju zamjene uzoraka, on neće identificirati muškarce zamijenjene za muškarce ili žene zamijenjene za žene.
- Test omogućuje potvrdu samo do izlaza VCF datoteke genoma. Svi dijagnostički testovi razvijeni za korištenje sa TruSight Whole Genome zahtijevaju potpunu validaciju za sve aspekte performansi sa nizvodnim aplikacijama po izboru.
- Test ne izvješćuje o varijantama očitavanja za uzorke koji ne prolaze kontrolu kvalitete.
- Test definira razine visoke pouzdanosti samo za SNV i umetanje/brisanje 1–5 bp zbog strogih kriterija koji se koriste za definiranje genomskog konteksta kao visoke pouzdanosti za određenu vrstu varijante u [Određivanje razine pouzdanosti malih varijanti na stranici 38](#).
- Test je osmišljen za procjenu CNV-ova u cijelom genomu koji se može prijaviti, bez obzira na genomski kontekst, i isključuje regije sa značajkama koje odražavaju ograničenja referentnog genoma, kao što su centromeri, telomeri i uobičajeni CNV-ovi koji se izdvajaju u populacijama.

- Učinkovitost testa nije ocijenjena za varijante broja kopija ispod 10 kb.
- Test ne pokazuje translokacije, inverzije ili uravnotežene preraspodjele.
- Učinkovitost testa nije procijenjena za insercije ili brisanja mitohondrijske DNK (mtDNK).
- Test prikazuje samo rezultate za STR lokuse navedene u [Tablica 2](#). Kada stvarne duljine ekspanzije STR prijeđu približno 135 bp, promatrana duljina često će biti podcijenjena od stvarne duljine zbog tehničkih ograničenja kratkih očitavanja, pri čemu je ovaj učinak još izraženiji za FMR1. Jednom kad prava duljina STR-a premaši srednju duljinu fragmenta (~330 bp), procjena duljine STR-a se nalazi na platou.
- Test ne prikazuje broj kopija SMN1 ili SMN2.
- Test ne daje tvrdnje o patogenosti otkrivenih varijanti.

Komponente proizvoda

TruSight Whole Genome sastoji se od sljedećeg:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (kataloški br. 20093209)
- TruSight Whole Genome Analysis Application (kataloški broj 20106190, instalirano od strane obučenog Illumina osoblja)

Reagensi

Priloženi reagensi

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, PN 20072256

Naziv reagensa	Količina	Volumen ispunje	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF)	1	460 µl	Streptavidin Magnetic Beads (Magnetska zrnca streptavidina) povezane s transposomima u puferiranoj vodenoj otopini.	od -25 °C do -15 °C
Extension Ligation Mix (ELM)	1	1,6 ml	Ligaza, DNK polimeraza i dNTP u puferskoj vodenoj otopini.	od -25 °C do -15 °C
2N NaOH (HP3)	1	400 µl	2N otopina natrijevog hidroksida (NaOH).	od -25 °C do -15 °C

Naziv reagensa	Količina	Volumen ispune	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	290 µl	Puferirana vodena otopina koja sadrži magnezijevu sol i dimetilformamid.	od -25 °C do -15 °C

TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, PN 20072257

Naziv reagensa	Količina	Volumen ispune	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	41 ml	Puferirana vodena otopina koja sadrži deterdžent i soli.	od 15 °C do 30 °C
Resuspension Buffer (RSB)	1	20 ml	Puferirana vodena otopina.	od 15 °C do 30 °C
Cleanup Beads (CB)	1	10 ml	Paramagnetska zrnca u krutoj fazi u puferiranoj vodenoj otopini.	od 15 °C do 30 °C
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	1,4 ml	Otopina deterdženta u vodi.	od 15 °C do 30 °C
Neutralization Buffer (NB)	1	450 µl	Tris-HCl otopina.	od 15 °C do 30 °C

TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, PN 20072258

Naziv reagensa	Količina	Volumen ispune	Aktivni sastojci	Temperatura skladištenja
UDI PCR-Free (32 Indexes)	1	37 µl	Jedinstveni dvostruki (UD) indeksni adapteri raspoređeni u ploči.	od -25 °C do -15 °C

Potrošni materijal koji je obavezan, a ne dolazi s proizvodom

- Ethanol 100% (razine 200), kvalitete za uporabu u molekularnoj biologiji
- Certificirana voda bez RNaze/DNaze
- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 ciklusa) (kataloški broj 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 ciklusa) (kataloški broj 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (kataloški broj 20062292)
- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (kataloški broj 20062293)

- NovaSeq 6000Dx Library Tube (kataloški broj 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 Pack (kataloški broj 20062291)

Skladištenje i rukovanje

- Sobna je temperatura definirana kao temperatura od 15 °C do 30 °C.
- Ako je bilo koje pakiranje ili sadržaj komponenti TruSight Whole Genome Dx Library Prep oštećeno ili načeto, obratite se Illumina službi za korisnike.
- Reagensi su stabilni kad se skladište kako je navedeno do datuma isteka roka trajanja navedenog na naljepnicama na kompletima. Uvjete skladištenja potražite u [Priloženi reagensi na stranici 5](#). Skladištite komponente testa na njihovoj specificiranoj temperaturi i nemojte koristiti reagense kojima je istekao rok trajanja. Ne mijenjajte komponente iz različitih serija kompleta. Serije kompleta označene su na naljepnicama kutija.
- Promjene u fizičkom izgledu reagensa mogu upućivati na oštećenje materijala. Ako dođe do promjena u fizičkom izgledu (npr. očite promjene boje ili zamućenja reagensa), nemojte koristiti reagense. Ako primijetite talog u ST2, zagrijavajte na 37 °C 10 minuta, a zatim miješajte vrtložnom miješalicom dok se talog ne otopi.
- Stabilnost TruSight Whole Genome Dx Library Prep je procijenjena i učinak je dokazan za do četiri upotrebe zamrznutih epruveta kada su zamrznute između dva korištenja.

Oprema i materijali

Oprema koja je obavezna, a ne dolazi s proizvodom

Provjerite status kalibracije opreme prije početka testa.

Oprema	Dobavljač
Vrtložna miješalica s 3000 o/min, s ravnim dnom ili dnom u obliku šalice	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Inkubator za mikrouzorke kalibriran kako bi se osigurala točnost temperature od $\pm 2^{\circ}\text{C}$	SciGene, kataloški broj 1057-30-O (ili ekvivalent)
Umetak inkubatora za mikrouzorke za MIDI ploče s 96 jažica	Illumina, kataloški broj BD-60-601
Mikrocentrifuga	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Centrifuga za mikroploču s 96 jažica	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Oprema	Dobavljač
Shaker za ploče sa sljedećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> Može tresti na 1800 okretaja u minuti Konstanta orbite miješanja 2 mm Točnost miješanja ± 25 o/min 	VWR, kataloški broj 1808-0506 (ili ekvivalent)
Brtnveni klin ili valjak	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Magnetni stalak sa sljedećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> Dizajniran za taloženje/separaciju paramagnetnih zrnaca Magneti na bočnoj strani stalka, a ne na dnu Za MIDI ploče s 96 jažica 	Thermo Fisher Scientific, kataloški broj AM10027 (ili ekvivalent)
NovaSeq 6000Dx Instrument	Illumina, kataloški broj 20068232
Precizne pipete (jednokanalne): <ul style="list-style-type: none"> 10 μl 20 μl 200 μl 1000 μl 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Precizne pipete (8-kanalne): <ul style="list-style-type: none"> 20 μl 200 μl 	
Provjerite jesu li pipete redovito kalibrirane i točne unutar 5% od navedenog volumena	
Držać za pipete	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Obavezan materijal koji nije priložen

Prije početka protokola, provjerite imate li potrebnu opremu.

Protokol je optimiziran i potvrđen pomoću navedenih stavki. Usporedive učinkovitosti nisu zajamčene pri upotrebi alternativnih materijala.

Materijali	Dobavljač
Serološke pipete od 5 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Serološke pipete od 10 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora

Materijali	Dobavljač
Pločica s 96 jažica i sljedećim specifikacijama: <ul style="list-style-type: none"> • Optičko prozirni poliester koji se može odlijepiti • Jako ljepilo koje podnosi višestruke promjene temperature od -40 °C do 110 °C • Bez DNaze/RNaze 	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Epruvete za mikrocentrifuge, bez nukleaze (1,5, 1,7 ili 2,0 ml, osim ako nije navedeno kao 0,5 ml)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Spremnici reagensa bez nukleaze, 50 ml ili ekvivalent (PVC, posuda za jednokratnu upotrebu)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Stožaste epruvete od 15 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Konusne epruvete od 50 ml	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi pipeta otpornih na aerosol od 20 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi pipeta otpornih na aerosol od 200 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Vrhovi pipeta otpornih na aerosol od 1000 µl	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Ploče za pohranu s 96 jažica, 0,8 ml (MIDI ploča)	Thermo Fisher Scientific, dio # AB-0859 (ili ekvivalent)
PCR ploče s 96 jažica, 0,2 ml (polipropilen bez RNaze/DNaze, slabo vezanje)	Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora
Kanta s ledom i led	Nije primjenjivo
Kvantificirani uzorci genomskog DNK-a	Nije primjenjivo

Prikupljanje, transport i pohrana uzoraka



OPREZ

Svim uzorcima rukujte kao da su potencijalno zarazne tvari.

- Pridržavajte se sigurnosnih postupaka, uključujući korištenje zaštitne opreme, prilikom prikupljanja, transporta, pohranjivanja i obrade uzoraka ljudske krvi.
- Transport pune krvi mora biti u skladu s državnim, saveznim i lokalnim propisima koji se odnose na transport etioloških tvari.
- Prikupite 2–5 ml periferne pune krvi u EDTA epruvete i pohranite na 2 °C do 8 °C do pet tjedana prije ekstrakcije.
- Nije primijećen nikakav negativan učinak na izvedbu testa s uzorcima cijele krvi s povišenim bilirubinom, hemoglobinom, trigliceridima, biotinom ili prisutnim EDTA. Pogledajte Ometajuće tvari.

- TruSight Whole Genome je kompatibilan s komercijalno dostupnim kompletima i protokolima za ekstrakciju koji su prikladni za uporabu u sekvenciranju sljedeće generacije (NGS). Pogledajte [Procjena metode ekstrakcije DNK na stranici 36](#).
- TruSight Whole Genome kompatibilan je s DNK eluiranim u Tris puferiranoj otopini koja sadrži ≤ 10 mM EDTA, kao što su 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 (TE).
- Preporučuje se eluiranje i pohranjivanje DNK u TE. Radi stabilnosti izbjegavajte skladištenje u vodi.

Preporuke za unos DNK

- Prije početka TruSight Whole Genome testa, kvantificirajte genomsku DNK ekstrahiranu iz pune krvi pomoću bilo koje fluorometrijske metode kvantifikacije koja koristi boje za vezanje nukleinske kiseline. Preporuča se da se gDNK za uzorke namijenjene određenoj seriji pripreme biblioteke i obrada sekvenciranjem kvantificiraju zajedno kako bi se eliminirala varijabilnost batch-to-batch (od serije do serije) kada je to moguće, ili se koriste kontrole procesa kako bi se osigurala ≤ 25 % varijabilnost kvantifikacije DNK batch-to-batch (od serije do serije).
- Izbjegavajte pipetiranje malih volumena uzorka (< 2 μ l) kako biste osigurali točnu kvantifikaciju DNK i ulaz.
- TruSight Whole Genome Dx Library Prep zahtijeva dovoljno DNK za zasićenje zrnaca BLT-PF za učinkovitu samonormalizaciju prinosa biblioteke i optimalnu izvedbu. Zbog varijacija rezultata različitih kvantifikacijskih metoda, sljedeća tablica daje preporučeni unos DNK za tri kvantitativne metode kako bi se osigurala optimalna izvedba analize. Upotreba drugih metoda kvantifikacije može zahtijevati optimizaciju. Pogledajte [Ulazna osjetljivost DNK na stranici 36](#).

Metoda kvantifikacije	Ciljani ulaz DNK (ng)	Minimalna koncentracija bujona DNK
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	280	11,2 ng/ μ l
Qubit dsDNA Broad-Range (BR) Assay Kit	280	11,2 ng/ μ l
AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit	350	14 ng/ μ l

Preporuke o stručnosti

Stručnost operatera i uspješna provedba analize mogu se procijeniti provođenjem cijelog tijeka rada jednom u skladu s uputama za uporabu. Ovaj tijek rada može se izvesti jednom pripremom biblioteke od 6 uzoraka i obradom sekvenciranjem pomoću protočne stanice S2 ili jednom pripremom biblioteke od 16 uzoraka i obradom sekvenciranjem pomoću protočne stanice S4. Uspjeh je naznačen prolaznošću obrade i metrikom kontrole

kvalitete biblioteke koje je softver TruSight Whole Genome Analysis Application zabilježio u izlazu konsolidiranog izvješća. Pogledajte TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (broj dokumenta 200049931).

Illumina preporučuje uključivanje uzoraka genomske DNK ekstrahirane iz periferne pune krvi koji zadovoljavaju kvalifikacijske kriterije koncentracije i volumena bujona DNK kako bi se pokazala uspješna integracija testa s prethodnim laboratorijskim procesima kao što su prikupljanje i pohranjivanje uzoraka te ekstrakcija DNK i postupci kvantifikacije. MKomercijalno dostupni referentni uzorci genomske DNK dobiveni od jednog ljudskog donora, kao što je NA24385/HG002 (Nacionalni institut za standarde i tehnologiju Konzorcij genoma u boci) također se mogu koristiti.

Ako se pojave problemi, potražite preporučene radnje u odjeljku [Otklanjanje poteškoća na stranici 74](#) i obratite se tehničkoj podršci Illumina.

Upozorenja i mjere opreza

- **Neke komponente ove analize sadrže potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu s odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima.** Za sigurnosno-tehnički list (SDS), posjetite support.illumina.com/sds.html.
- Sve ozbiljne incidente povezane s ovim proizvodom odmah prijavite tvrtki Illumina i nadležnim tijelima država članica u kojima borave korisnik i bolesnik.
- Sa svim uzorcima postupajte kao da su zarazni.
- Pridržavajte se laboratorijskih mjera opreza. Nemojte pipetirati ustima. Nemojte jesti, piti ni pušiti u označenim prostorima za rad. Koristite rukavice za jednokratnu upotrebu i laboratorijske kute kada rukujete uzorcima i reagensima za analizu. Ruke temeljito operite nakon rukovanja uzorcima i reagensima za analizu.
- Ovaj test sadrži polietilen glikol. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda.
- Ovaj test sadrži natrijev hidroksid. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda.
- Postupci pripreme biblioteke zahtijevaju okruženje bez-RNaze/DNaze. Temeljito dekontaminirajte radna područja sredstvom za čišćenje koje inhibira-RNazu/DNazu.
- Koristite epruvete za mikrocentrifugu, pločice, vrhove pipeta i spremnike bez nukleaze.
- Tijekom analize koristite kalibriranu opremu. Obavezno kalibrirajte opremu prema brzinama, temperaturama i volumenima navedenim u ovom protokolu.
- Koristite precizne pipete kako biste osigurali točnu isporuku reagensa i uzorka. Redovito kalibrirajte u skladu sa specifikacijama proizvođača.
- Obavezno koristite opremu navedenu za analizu i da ste postavili programe prema uputama.

- Navedene temperature za inkubator mikrouzoraka označavaju postavljenu reakcijsku temperaturu, a ne nužno temperaturu opreme.
- Ne mijenjajte komponente kompleta iz različitih TruSight Whole Genome Dx Library Prep serija. Serije su označene na naljepnici kutije.
- Primijenite odgovarajuće laboratorijske prakse kako biste spriječili kontaminaciju reagensa, instrumenata, uzoraka i biblioteka nukleazama i PCR proizvodima. Kontaminacija nukleaza i PCR proizvoda može uzrokovati netočne i nepouzdanе rezultate.
- Za optimalan učinak analize i pohranu potrebna je odgovarajuća vrsta pločice. Obavezno slijedite upute za prijenos ploče u [Upute za upotrebu na stranici 15](#).
- Može doći do križne kontaminacije ili gubitka uzorka ako se brtve pločice pažljivo ne nanose ili uklone (pogledajte [Rukovanje pločama za pripremu biblioteke na stranici 13](#)).
- Nepridržavanje navedenih postupaka kako je navedeno može rezultirati netočnim rezultatima ili značajnom smanjenjem kvalitete biblioteke.
- Čuvajte testne reagense ili komponente na navedenoj temperaturi.
- Nemojte skladištiti reagense u jedinici za pohranjivanje zaštićenoj od smrzavanja.
- Nemojte koristiti reagense koji su nepravilno pohranjeni.
- Nemojte koristiti nijednu komponentu nakon isteka roka valjanosti.
- Pripremite 0,2N NaOH (razrijeđen HP3) svježe na dan upotrebe i bacite preostali volumen nakon upotrebe.
- Na dan upotrebe pripremite svježi 80 % etanol s vodom bez RNaze/DNaze. Etanol može apsorbirati vodu iz zraka, što može utjecati na rezultate. Odložite 80-postotni etanol nakon uporabe u skladu s lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima. Koristite etanol čistoće za molekularnu biologiju.

Napomene povezane s postupkom

Savjeti i tehnike

Izbjegavanje križne kontaminacije

- Prilikom dodavanja ili prijenosa uzoraka promijenite vrhove između *svakog uzorka*.
- Prilikom dodavanja adaptera ili primera s višekanalnom pipetom, mijenjajte vrhove između *svake jažice*.
- Pažljivo zabrtvite i odbrtvite ploče na radnoj površini kako biste spriječili križnu kontaminaciju uzorka.
- Kako bi se izbjegla kontaminacija, svaka indeksna jažica je jednokratna.
- Upotrijebite naznačene količine u posudi i nemojte izljevati preostali volumen iz posude natrag u epruvete s bujonom jer to može uzrokovati kontaminaciju. Ima dovoljno volumena za podršku tijekom rada.
- Nemojte objedinjavati biblioteke iz različitih priprema.

Točnost pipetiranja

Prilikom uporabe višekanalnih pipeta koristite sljedeće smjernice:

- Pobrinite se da vrhovi barijere dobro prijanjaju i da odgovaraju marki i modelu višekanalnih pipeta.
- Pričvrstite vrhove pokretom zavrtnja kako biste bili sigurni da su svi vrhovi jednako dobro pričvršćeni.
- Aspirirajte s jednakim količinama tekućine kroz sve vrhove.
- Polako pipetirajte viskozne otopine (BLT-PF, CB, ELM, TWB2).
- Nakon doziranja provjerite je li tekućina ispuštena iz svakog vrha.

Izbjegavanje stvaranja pjene

- Pipetirajte polako i preokrenite kako biste se pomiješali. Nemojte miješati u vrtložnoj miješalici ELM i TWB2.

Rukovanje indeksnim pločama

- Probušite foliju samo za indekse koji će se koristiti.
- Držite ploču za rubove i izbjegavajte dodirivanje folije ničim osim čistim vrhovima pipete.
- Nemojte ponovno upotrebljavati jažice koje su probušene.
- Odložite neiskorišteni volumen (~30 µl) nakon uporabe iz probušenih jažica indeksne pločice i postavite brtvu preko probušenih jažica kako biste izbjegli križnu kontaminaciju.
- Nemojte stavljati brtvu preko neiskorištenih jažica jer to ometa bušenje.

Rukovanje pločama za pripremu biblioteke

- Uvijek zabrtvite pločicu prije skladištenja, trešnje, inkubacije ili centrifugiranja.
- Za brtvljenje ploče, nanosite ljepljivi pokrov na ploču pomoću brtvenog klina ili valjka.
- Uvjerite se da su rubovi i jažice potpuno zabrtvljeni kako biste smanjili rizik od križne kontaminacije i isparavanja.
- Uvijek zabrtvite ploče novom ljepljivom brtvom za ploče. Nemojte ponovno upotrebljavati brtve.
- Stavite ploču na ravnu površinu prije nego što pažljivo uklonite brtvu.
- Ako nije drugačije navedeno, koraci se mogu izvesti s pločom na magnetu ili izvan njega.

Prijenosi ploča

- Prilikom prijenosa volumena između ploča, prenesite navedeni volumen iz svake jažice izvorne ploče u odgovarajuću jažicu odredišne ploče.

Posude

- Posude reagensa mogu se koristiti tamo gdje je to naznačeno. Koristite sljedeće smjernice:
 - Pripremite posude CB nakon miješanja. Nije potrebno vraćati CB u epruvetu i vrtložno miješati prije drugog koraka dodavanja zrnaca.
 - Označite posude TWB2 i RSB kako biste izbjegli zabunu.
 - Odložite reagense kada je to naznačeno ili na kraju radnog procesa.
- Koristite preporučeni volumen. Preporučeni volumeni uključuju 1 ml viška za mrtvi volumen posude.

- RSB i TWB2 pakirani su u slične epruvete. Pažljivo pročitajte svaku naljepnicu prije uporabe.

Centrifugiranje

- Centrifugirajte samo u navedenim koracima u postupku za konsolidaciju tekućine ili zrnaca na dnu jažice kako biste spriječili gubitak uzorka.

Rukovanje zrcima

- Nemojte zamrzavati Cleanup Beads (CB).
- Prilikom pranja zrnaca:
 - Koristite Magnetic Stand-96 (magnetni stalak-96) za sve MIDI ploče.
 - Raspršite tekućinu tako da nijedno zrnce ne ostane zalijepljena uz rub jažice.
 - Držite ploču na magnetskom stalku.
- Uvijek dodajte reagense na sredinu ili dno jažice bez ometanja kuglice zrnca. Nemojte dodavati reagense na vrh jažice.
- Polako pipetirajte suspenziju zrnaca.
- Miješajte zrnca u vrtložnoj miješalici dok se dobro ne rasprše. Boja tekućine mora biti homogena. Miješajte u vrtložnoj miješalici kada je navedeno u protokolu kako biste osigurali resuspendiranje zrnaca u trenutku uporabe.
- Ako se zrnca ne resuspendiraju, ponovno protresite.
- Ako se zrnca aspiriraju u vrhove pipeta kada to nije predviđeno, dozirajte reakcije natrag na ploču na magnetskom stalku i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (2 minute).
- Pohranite uspravno kako biste bili sigurni da su zrnca uronjene u pufer prilikom vraćanja u pohranu nakon upotrebe.

Kontrole

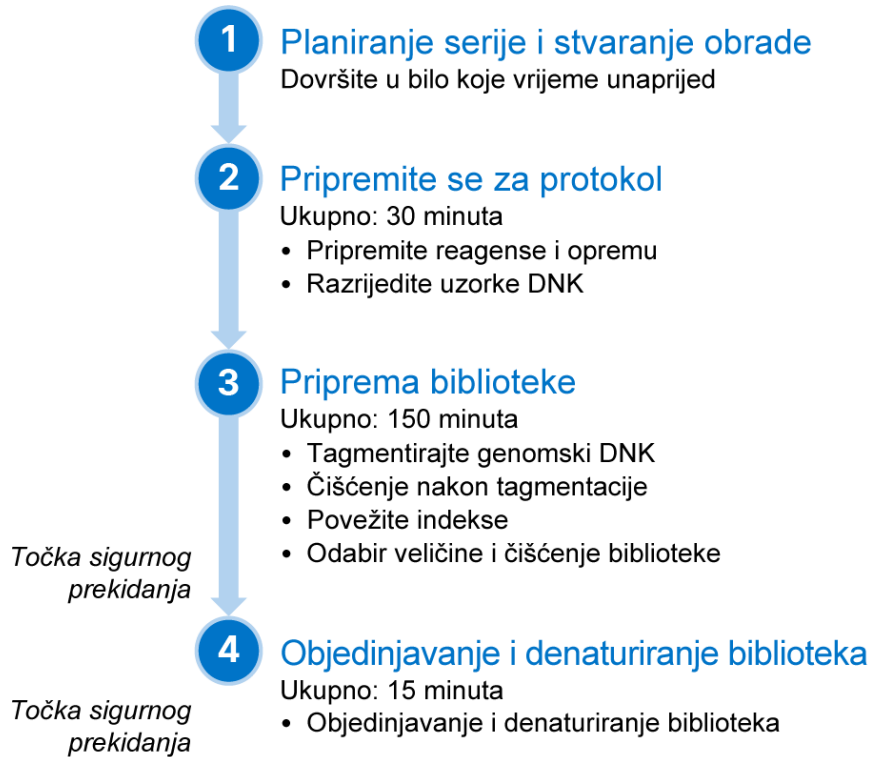
TruSight Whole Genome koristi analitičke kontrole ugrađene u softver TruSight Whole Genome Analysis Application za kvalifikaciju podataka i ne zahtijeva upotrebu vanjskih kontrola serije. Za više informacija o metričkim specifikacijama pogledajte [Kontrole kvalitete na stranici 32](#).

Upute za upotrebu

Tijek rada TruSight Whole Genome Dx Library Prep

Sljedeći dijagram ilustrira tijek rada TruSight Whole Genome Dx Library Prep. Točke sigurnog prekidanja označene su između koraka.

U slučaju prekida, vratite preostale reagense u izvorne epruvete na temperaturu skladištenja navedenu u [Priloženi reagensi na stranici 5](#). U slučaju nastavka, prijedite na sljedeći odjeljak u protokolu s pripremljenim reagensima.



Planiranje serije i stvaranje obrade

Planirajte broj biblioteka uzoraka za seriju, te indeksiranje i objedinjavanje za obrade sekvenciranja.

TruSight Whole Genome je procijenjen i prikazana je izvedba za četiri skupa indeksa za protočnu stanicu S2 ([Slika 1](#), [Tablica 4](#)) i dva kompleta indeksa za protočnu stanicu S4 ([Slika 2](#), [Tablica 5](#)). Softver nameće korištenje navedenih skupova indeksa. Nemojte miješati navedene skupove indeksa.

Složenost sekvenciranja izvan ovih preporuka nije podržana.

S2 indeks i S4 skupovi indeksa zajedno podržavaju veličine serija za pripremu biblioteke od 6, 12, 16, 18, 22 i 24 uzorka. Koristite kompatibilne skupove indeksa navedene u [Tablica 3](#) za svaku veličinu serije pripreme biblioteke.

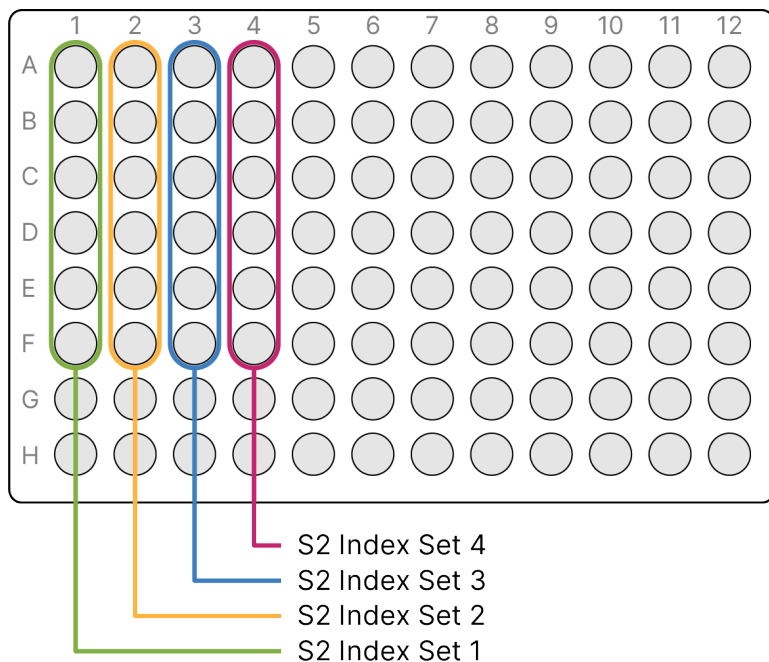
**OPREZ**

Rasporedite uzorke u ploči koristeći orijentaciju koja odgovara planiranom indeksiranju, tj. redove od A do H za 16-pleks ili redove od A do F za 6-pleks. Dodajte indekse pomoću višekanalne pipete kako biste izbjegli preskakanje jažice ili dodavanje dva skupa indeksa u jedan uzorak, što može uzrokovati izostanak rezultata ili lažne rezultate.

Tablica 3 Opcije skupa indeksa za pripremnu seriju biblioteke

Veličina serije za pripremu biblioteke	Skup indeksa	Konfiguracije protočne stanice
6 uzoraka	Komplet indeksa S2 1, 2, 3 ili 4 (odaberite bilo koji 1 komplet)	S2 x 1
12 uzoraka	Komplet indeksa S2 1, 2, 3 ili 4 (odaberite bilo koja 2 kompleta)	S2 x 2
18 uzoraka	Komplet indeksa S2 1, 2, 3 ili 4 (odaberite bilo koja 3 kompleta)	S2 x 3
24 uzorka	Komplet indeksa S2 1, 2, 3 i 4	S2 x 4
16 uzoraka	Komplet indeksa S4 1 ili 2	S4 x 1
22 uzorka	Komplet indeksa S4 1 + Komplet indeksa S2 3 ili 4	S4 x 1 i S2 x 1
	Komplet indeksa S4 2 + Komplet indeksa S2 1 ili 2	

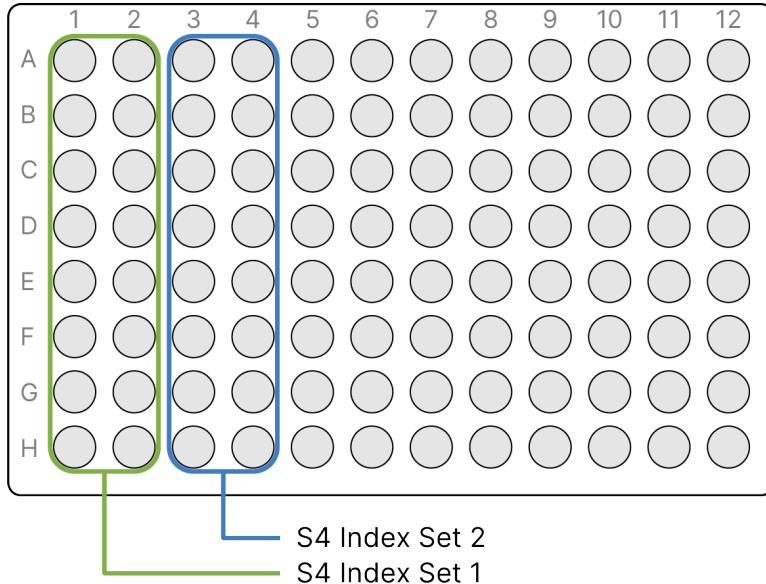
Slika 1 Izgled indeksne ploče koja prikazuje četiri kompleta indeksa za sekvenciranje protočne stanice S2



Tablica 4 Komplet indeksa S2 za protočnu stanicu S2

	Komplet indeksa S2 1 (zeleni)	Komplet indeksa S2 (žuti)	Komplet indeksa S2 3 (plavi)	Komplet indeksa S2 4 (magenta)
	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

Slika 2 Izgled indeksne ploče koji prikazuje dva kompleta indeksa za sekvenciranje protočne stanice S4



Tablica 5 Komplet indeksa S4 za protočnu stanicu S4

	Komplet indeksa S4 1 (zeleni)		Komplet indeksa S4 2 (plavi)	
	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

Zabilježite jedinstveni naziv serije i podatke o uzorku, uključujući ID uzorka, ID pridružene jažice indeksne ploče (pogledajte [Dodatak A na stranici 89](#)), ploču biblioteke, ID jažice ploče biblioteke i ID epruvete biblioteke (ako je poznat). Ti se podaci unose tijekom stvaranja obrade.

Za upute o tome kako koristiti aplikaciju za stvaranje obrade, pogledajte TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (broj dokumenta 200049931). Zabilježite naziv obrade koji ćete koristiti tijekom umetanja potrošnog materijala.

**OPREZ**

Provjerite odgovaraju li indeksi i pridruženi uzorci korišteni tijekom pripreme biblioteke onima koji su snimljeni i korišteni za stvaranje obrade. Nepodudarnosti mogu uzrokovati prijavu netočnih rezultata ili nepostojanje rezultata.

Pripremite se za protokol

Pripremite reagense i opremu

Ako planirate sekvenciranje isti dan, prethodno odmrznite potrošni materijal za sekvenciranje. Pogledajte Dokumentacija proizvoda NovaSeq 6000Dx Instrument (broj dokumenta: 200010105) za detaljne upute.

1. Prethodno zagrijte inkubator za mikrouzorke s umetkom MIDI ploče na 47 °C.
2. Uklonite sljedeće reagense iz kutije i odmrznite kako slijedi.

Tablica 6 -25 °C do -15 °C Skladištenje

Reagens	Naziv kutije	Upute za odmrzavanje
BLT-PF	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 minuta.
ELM	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 minuta. Zatim držite na ledu dok ne zatreba.
HP3	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 minuta.
TB1	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 minuta.
UD indeksi	TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes	Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 minuta.

Tablica 7 15 °C do 30 °C Skladištenje

Reagens	Naziv kutije	Upute za odmrzavanje
CB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Upotrijebite na sobnoj temperaturi.
RSB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Upotrijebite na sobnoj temperaturi.
ST2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Upotrijebite na sobnoj temperaturi.
TWB2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Upotrijebite na sobnoj temperaturi.
NB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Upotrijebite na sobnoj temperaturi.

**OPREZ**

Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu s odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti potražite na sigurnosno-tehničkom listu (SDS) na adresi support.illumina.com/sds.html.

Pripremite uzorke DNK

Pripremite sljedeći potrošni materijal.

- Kvantificirani uzorci gDNK:
 - a. Zagrijte na sobnu temperaturu.
 - b. Kratko centrifugirajte da prikupite kapljice.
 - c. Pulsirajte vorteks ili pipetu za miješanje, a zatim kratko centrifugirajte.
- RSB—Promiješajte ili preokrenite kako biste pomiješali. Pohranite na sobnoj temperaturi.
 - RSB i TWB2 pakirani su u slične epruvete. Pažljivo pročitajte svaku naljepnicu prije uporabe.

Postupak

Ovisno o unosu DNK, koji varira ovisno o korištenoj metodi kvantifikacije DNK, izračunajte volumene potrebne za pripremu razrijeđenih uzoraka DNK. Formule su navedene u nastavku za tri testirane metode kvantifikacije DNK. Više informacija potražite u [Preporuke za unos DNK na stranici 10](#) i [Dodatak B na stranici 92](#).

Izračuni pretpostavljaju minimalni volumen pipetiranja od 2,0 µl i uključuju 10 % viška. Zaokruživanje treba izvesti u posljednjim koracima, nakon što su izračuni dovršeni, koristeći potreban broj decimala kako bi se osiguralo točno pipetiranje.

Opcija 1: unos 280 ng DNK za kvantitativne metode širokog raspona Quant i Qubit

Minimalna koncentracija bujona DNK u uzorku je 11,2 ng/µl. Veća je vjerojatnost da uzorci < 11,2 ng/µl neće uspješno proći kontrolu kvalitete biblioteke nakon sekvenciranja. Ovisno o koncentraciji bujona DNK, koristite jednu od donjih jednadžbi za izvođenje izračuna.

1. Za koncentraciju bujona DNK od 11,2 do 154,0 ng/µl, izračunajte volumen bujona DNK i potreban RSB uporabom ukupnog volumena razrijeđene DNK od 27,5 µl (25 µl plus 10 % viška) kao konstante:
 - a. Izračunajte volumen bujona DNK:

$$\begin{aligned} \text{Volumen bujona DNK } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{ciljni unos DNK (ng)} + 10\% \text{ viška})}{\text{koncentracija bujona DNK (ng}/\mu\text{l})} \\ &= 280 \text{ ng} \times 1,1 / \text{koncentracija bujona DNK (ng}/\mu\text{l}) \\ &= 308 \text{ ng} / \text{koncentracija bujona DNK (ng}/\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- b. Izračunajte volumen bujona RSB:

$$\begin{aligned} \text{Volumen RSB} - a (\mu\text{l}) &= \text{Ukupni volumen razrijeđene DNK } (\mu\text{l}) - \text{izračunati volumen bujona DNK } (\mu\text{l}) \\ &= 27,5 (\mu\text{l}) - \text{izračunati volumen bujona DNK } (\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- c. Provjerite izračune: Potvrdite izračunati volumen bujona DNK (μl) + izračunati volumen RSB (μl) = 27,5 μl , ukupni volumen razrijeđenog DNK (konstanta, 25 μl plus 10 % viška).

2. Alternativno, za koncentracije bujona DNK od > 154,0 ng/ μl , izračunajte ukupni volumen potrebne razrijeđene DNK i RSB korištenjem volumena bujona DNK od 2,0 μl i ciljne koncentracije razrijeđeneog bujona DNK od 11,2 ng/ μl kao konstante.

- a. Izračunajte ukupni volumen razrijeđene DNK:

$$\begin{aligned} \text{Ukupni volumen razrijeđene DNK } (\mu\text{l}) &= \frac{\text{koncentracija bujona DNK (ng}/\mu\text{l}) \times \text{volumen bujona DNK } (\mu\text{l})}{\text{ciljna koncentracija razrijeđenog bujona DNK}} \\ &= \text{koncentracija bujona DNK (ng}/\mu\text{l}) \times 2,0 \mu\text{l} / 11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} \end{aligned}$$

- b. Izračunajte volumen RSB-a:

$$\begin{aligned} \text{Volumen RSB} - a (\mu\text{l}) &= \text{Ukupni volumen razrijeđene DNK } (\mu\text{l}) - \text{volumen bujona DNK } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Ukupni volumen } (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Provjerite izračune: Potvrdite izračunati ukupni volumen razrijeđene DNK (μl) - izračunati volumen RSB (μl) = 2,0 μl , volumen bujona DNK (konstanta).

Prijeđite na korak 3 u nastavku.

Opcija 2: ulaz DNK od 350 ng za Accuclear Ultra High Sensitivity Quantitation Method

Minimalna koncentracija bujona DNK u uzorku je 14,0 ng/ μl . Veća je vjerojatnost da uzorci < 14,0 ng/ μl neće uspješno kontrolu kvalitete biblioteke nakon sekvenciranja. Ovisno o koncentraciji bujona DNK, koristite jednu od donjih jednadžbi za izvođenje izračuna.

1. Za koncentraciju bujona DNK od 14,0 do 192,5 ng/ μl , izračunajte potreban volumen bujona DNK i RSB pomoću ukupnog volumena razrijeđene DNK od 27,5 μl (25 μl plus 10 % prekoračenja) kao konstante:

- a. Izračunajte volumen bujona DNK:

$$\begin{aligned} \text{Volumen bujona DNK } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{ciljni unos DNK (ng)} + 10\% \text{ viška})}{\text{koncentracija bujona DNK (ng}/\mu\text{l})} \\ &= 350 \text{ ng} \times 1,1 / \text{koncentracija bujona DNK (ng}/\mu\text{l}) \\ &= 385 \text{ ng} / \text{koncentracija bujona DNK (ng}/\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- b. Izračunajte volumen bujona RSB:

$$\begin{aligned} \text{Volumen RSB} - a (\mu\text{l}) &= \text{Ukupni volumen razrijeđene DNK} (\mu\text{l}) - \text{izračunati volumen bujona DNK} (\mu\text{l}) \\ &= 27,5 (\mu\text{l}) - \text{izračunati volumen bujona DNK} (\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- c. Provjerite izračune: Potvrdite izračunati volumen bujona DNK (μl) + izračunati volumen RSB (μl) = 27,5 μl , ukupni volumen razrijeđenog DNK (konstanta, 25 μl plus 10 % viška).
2. Alternativno, za koncentracije bujona DNK > 192,5 ng/ μl , izračunajte ukupni poreban volumen razrijeđene DNK i RSB pomoću volumena bujona DNK 2,0 μl kao konstante.
 - a. Izračunajte ukupni volumen razrijeđene DNK:

$$\text{Ukupni volumen razrijeđene DNK} (\mu\text{l}) = \frac{\text{koncentracija bujona DNK (ng/\mu l)} \times 2,0 \mu\text{l}}{14,0 \text{ ng/\mu l}}$$
 - b. Izračunajte volumen RSB-a:

$$\begin{aligned} \text{Volumen RSB} - a (\mu\text{l}) &= \text{Ukupni volumen razrijeđene DNK} (\mu\text{l}) - \text{volumen bujona DNK} (\mu\text{l}) \\ &= \text{Ukupni volumen} (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l} \end{aligned}$$
 - c. Provjerite izračune: Potvrdite izračunati ukupni volumen razrijeđene DNK (μl) - izračunati volumen RSB (μl) = 2,0 μl , volumen bujona DNK (konstanta).
3. Označite novu epruvetu od 0,5 ml za mikrocentrifugu za svaki razrijeđeni uzorak.
4. Dodajte volumen RSB izračunat iznad odgovarajuće epruvete za svaki razrijeđeni uzorak.
5. Dodajte volumen bujona DNK izračunat iznad odgovarajuće epruvete za svaki razrijeđeni uzorak.
6. Promiješajte u pulsirajućoj vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.

Priprema biblioteke

Za pripremu reagensa unaprijed koristite korake pripreme u ovom odjeljku.

Osim ako nije navedena sigurna točka zaustavljanja, odmah prijedite na sljedeći korak.

Priprema

Pripremite sljedeći potrošni materijal:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free)—Promiješajte u vrtložnoj miješalici. Ako koristite više epruveta, promiješajte u vrtložnoj miješalici kako biste ih promiješali, a zatim kombinirajte.
- TB1 (Tagmentation Buffer 1):
 - a. Promiješajte u vrtložnoj miješalici.
 - b. Kratko centrifugirajte.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
 - a. Provjerite ima li taloga. Ako primijetite talog, zagrijavajte na 37 °C 10 minuta, a zatim promiješajte u vrtložnoj miješalici dok se talog ne otopi.
 - b. Dobro promiješajte na vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.

- ELM (Extension Ligation Mix):
 - a. Okrenite da biste promiješali. Nemojte miješati vrtložnom mješalicom.
 - b. Čuvajte na ledu do uporabe.
- HP3 (2N NaOH):
 - a. Promiješajte u vrtložnoj mješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
 - b. Pohranite na sobnoj temperaturi.
- NB (Neutralization Buffer):
 - a. Promiješajte u vrtložnoj mješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
 - b. Pohranite na sobnoj temperaturi.
- CB (Cleanup Beads):
 - a. Miješajte u vrtložnoj mješalici 1 minutu.
 - b. Okrenite 2 – 5 puta, a zatim temeljito promiješajte u vrtložnoj mješalici kako biste ponovno suspendirali.
- Adapteri indeksa (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
 - a. Promiješajte u vrtložnoj mješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
 - b. Pohranite na sobnoj temperaturi.
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
 - a. Označite čep epruvete TWB2.
 - b. Temeljito preokrenite da biste promiješali.
- U epruveti za mikrocentrifugu označenoj s 0,2N NaOH, kombinirajte sljedeće volumene kako biste ih pripremili u 0,2N NaOH skladu s planiranom veličinom serije. Promiješajte u vrtložnoj mješalici.

NAPOMENA Ako planirate objediniti i denaturirati biblioteke istog dana, pripremite dodatne 0,2N NaOH. Pogledajte [Priprema na stranici 29](#).

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

- U konusnoj epruveti od 15 ml pomiješajte sljedeće volumene kako biste pripremili 80 % EtOH prema planiranoj veličini serije. Višak za korištenje posude je uključen. Promiješajte u vrtložnoj mješalici.

Reagens	6 uzoraka (ml)	12 uzoraka (ml)	16 uzoraka (ml)	18 uzoraka (ml)	22 uzorka (ml)	24 uzorka (ml)
100 % etanol, čist (200 provjera)	4	8	8	12	12	12
Voda bez nukleaze	1	2	2	3	3	3

**OPREZ**

Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu s odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti potražite na sigurnosno-tehničkom listu (SDS) na adresi support.illumina.com/sds.html.

Tagmentirajte genomski DNK

Ovaj korak koristi Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) za tagmentaciju DNK, što je proces koji fragmentira i označava DNK sekvencama prilagodnika.

Potrošni materijal

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

Postupak

1. Potvrdite da je inkubator za mikrouzorke s umetkom MIDI ploče prethodno zagrijan na 47 °C.
2. Označite novu MIDI ploču s 96 jažica LP1 (Library Plate 1).
3. Odredite i zabilježite ID-ove jažica za označavanje razrijeđenih DNK uzoraka i reagensa.
4. Prenesite 25 µl razrijeđenog uzorka DNK u svaku jažicu.
5. Dodajte 10 µl TB1 u svaku jažicu.
6. BLT-PF Snažno promiješajte u vrtložnoj miješalici 1 minutu za resuspendiranje. Nemojte centrifugirati. Ponovite prema potrebi.
7. Dodajte 15 µl BLT-PF u svaku jažicu.
8. Zabrtvite i protresite LP1 1 minutu na 1800 o/min.

9. Inkubirajte LP1 u prethodno zagrijanom inkubatoru za mikrouzorke na 47 °C 8 minuta.

NAPOMENA Očekuje se lagana kondenzacija na brtvi ploče. Nemojte centrifugirati.

10. Uklonite brtvu i dodajte 10 µl ST2 u svaku jažicu.

11. Zabrtvite i protresite LP1 1 minutu na 1800 o/min, a zatim prijedite na sljedeći korak.

Čišćenje nakon tagmentacije

Sljedeći koraci ispiru nevezanu DNK i izvode zamjenu pufera za pripremu za sljedeći korak.

Potrošni materijal

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Posuda

O reagensima

- Pipetirajte TWB2 polako kako biste smanjili stvaranje pjene.
- RSB i TWB2 pakirani su u slične epruvete. Pažljivo pročitajte svaku naljepnicu prije uporabe.

Postupak

1. Uklonite brtvu i postavite LP1 na magnetski stalak i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (2 minute).
2. Pripremite TWB2 posudu s volumenima prema sljedećoj tablici i jasno označite posudu TWB2. Volumeni uključuju 1 ml viška za mrtvi volumen posude. Zadržite posudu za kasnije korake.

Reagens	6 uzoraka (µl)	12 uzoraka (µl)	16 uzoraka (µl)	18 uzoraka (µl)	22 uzorka (µl)	24 uzorka (µl)
TWB2	3700	6400	8200	9100	10900	11800

3. S LP1 na magnetskom stalku, upotrijebite višekanalnu pipetu postavljenu na 60 µl za uklanjanje i odbacivanje supernatanta iz svake jažice bez ometanja kuglice zrnca.
4. Pomoću višekanalne pipete dodajte 150 µl TWB2 u svaku jažicu.
5. Zabrtvite i protresite LP1 1 minutu na 1800 o/min.
6. Uklonite brtvu i postavite LP1 na magnetski stalak i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (2 minute).
7. Vratite BLT-PF u zamrzivač tijekom inkubacije i prijedite na sljedeći korak.

Povežite indekse

U ovom odjeljku korisnici ligiraju jedinstvene adaptore dvostrukog indeksa za svaki uzorak prema indeksiranju planiranom tijekom [Planiranje serije i stvaranje obrade na stranici 15](#).

Potrošni materijal

- ELM (Extension Ligation Mix)
- Adapteri indeksa (UDI PCR-Free (32 Indexes))
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2) posuda
- 0,2N NaOH (Razrijeđen HP3)

O reagensima

- Jažice indeksne ploče ne mogu se ponovno koristiti.
- Aspirirajte i dozirajte ELM polako zbog viskoznosti otopine.
- RSB i TWB2 pakirani su u slične epruvete. Pažljivo pročitajte svaku naljepnicu prije uporabe.

Postupak

1. Držite LP1 na magnetskom stalku i izvršite sljedeće korake:
 - a. Pomoću pipete postavljene na 150 µl uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice.
 - b. Bez ometanja kuglice zrnca, upotrijebite pipetu od 20 µl za uklanjanje i odbacivanje ostataka TWB2 iz svake jažice.
 - c. Dodajte 45 µl ELM u svaku jažicu.
 - d. Probušite foliju na ploči adaptera indeksa za svaku od planiranih indeksnih jažica pomoću višekanalne pipete P200 i novih vrhova pipeta. Kako biste izbjegli kontaminaciju, koristite novi vrh pipete za svaku jažicu.
 - e. Dodajte 5 µl adaptera indeksa u odgovarajuće jažice uzorka LP1 prema indeksima odabranim tijekom planiranja serije pomoću višekanalne pipete P-10 ili P-20.
2. Zabrtvite i protresite LP1 1 minutu na 1800 o/min.
3. Inkubirajte LP1 u prethodno zagrijanom inkubatoru za mikrouzorke na 47 °C 8 minuta.

NAPOMENA Očekuje se lagana kondenzacija na brtvi ploče. Nemojte centrifugirati.

4. Vratite ELM u zamrznuto skladište tijekom inkubacije.
5. Uklonite brtvu i postavite LP1 na magnetski stalak i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (2 minute).
6. S LP1 na magnetskom stalku, upotrijebite višekanalnu pipetu postavljenu na 50 µl za uklanjanje i odbacivanje supernatanta iz svake jažice bez ometanja kuglice zrnca.
7. Operite zrnca na sljedeći način.
 - a. Dodajte 150 µl TWB2 na zrnca u svakoj jažici pomoću višekanalne pipete.
 - b. Zabrtvite i protresite LP1 1 minutu na 1800 o/min.
 - c. Uklonite brtvu i postavite LP1 na magnetski stalak i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (2 minute).
 - d. S LP1 na magnetskom stalku, upotrijebite višekanalnu pipetu postavljenu na 150 µl za uklanjanje i odbacivanje supernatanta iz svake jažice bez ometanja kuglice zrnca.

8. Operite zrnca **drugi** put.
9. S LP1 na magnetskom stalku, upotrijebite višekanalnu pipetu postavljenu na 20 µl za uklanjanje i odbacivanje ostataka TWB2 iz svake jažice bez ometanja kuglice zrnca.
10. Dodajte 45 µl prethodno pripremljenog 0,2N NaOH u svaku jažicu.
11. Zabrtvite i protresite LP1 1 minutu na 1800 o/min, a zatim prijedite na sljedeći odjeljak.

Odabir veličine i čišćenje biblioteke

Ovaj korak koristi dvostrani odabir veličine biblioteka. U prvom koraku Cleanup Beads se dodaju eluiranim bibliotekama i zrcima BLT-PF. Zatim se supernatant koji sadrži eluiranu jednolančanu biblioteku prenosi na novu ploču dok fragmenti koji su preveliki ostaju iza. U drugom koraku, Cleanup Beads se dodaju prenesenim bibliotekama i fragmentima koji su premali da bi se uklonili. Zatim se biblioteke eluiraju i prenose na konačnu ploču biblioteke (FLP).

Potrošni materijal

- MIDI pločica s 96 jažica
- Posude (3)
- PCR ploča
- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Svježe pripremljen 80-postotni etanol (80 % EtOH)

Priprema

1. Promiješajte vrtložnom miješalcom CB, a zatim okrenite dok se potpuno ne resuspendira.
2. Pripremite CB posudu s volumenima prema sljedećoj tablici i označite posudu CB. Volumeni su dovoljni za oba koraka dodavanja i uključuju 1 ml viška u posudi za mrtvi volumen posude. Nema potrebe za miješanjem između CB koraka dodavanja. Zrnca će ostati raspršena tijekom cijelog postupka.

Reagens	6 uzoraka (µl)	12 uzoraka (µl)	16 uzoraka (µl)	18 uzoraka (µl)	22 uzorka (µl)	24 uzorka (µl)
CB	1480	1960	2280	2440	2760	2920

Postupak

1. Uklonite brtvu i dodajte 40 µl CB u jažice LP1 MIDI ploče koje sadrže BLT-PF i 0,2N NaOH.
2. Zabrtvite i protresite LP1 1 minutu na 1800 o/min
3. Inkubirajte LP1 izvan magnetskog postolja na sobnoj temperaturi 2 minute.
4. Uklonite brtvu i stavite LP1 na magnetski stalak i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (5 minuta).

5. Dok se ploča inkubira, označite novu MIDI ploču s 96 jažica LP2.
6. *Prenezite* 80 µl supernatanta iz LP1 dok ste na magnetskom stalku u odgovarajuće jažice LP2 pomoću višekanalne pipete.
7. Dodajte 40 µl CB u svaku jažicu u LP2 MIDI ploči.
8. Zabrtvite i protresite LP2 1 minutu na 1800 o/min.
9. Bacite LP1 MIDI ploču.
10. Inkubirajte LP2 izvan magnetskog postolja na sobnoj temperaturi 2 minute.
11. Uklonite brtvu i stavite LP2 na magnetski stalak i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (5 minuta).
12. S LP2 na magnetskom stalku, upotrijebite višekanalnu pipetu postavljenu na 120 µl za uklanjanje i odbacivanje supernatanta iz svake jažice bez ometanja kuglice zrnca.
13. Ulijte prethodno pripremljen 80-postotni EtOH u označenu posudu i perite zrnca s LP2 na magnetu kako slijedi.
 - a. Dodajte 180 µl 80-postotnog EtOH pomoću višekanalne pipete.
 - b. Pričekajte 30 sekundi.
 - c. Pomoću višekanalne pipete postavljene na 180 µl, uklonite i bacite sav supernatant iz svake jažice bez ometanja kuglice zrnca.
14. Operite zrnca **drugi** put.
15. S LP2 na magnetskom stalku, upotrijebite višekanalnu pipetu postavljenu na 20 µl za uklanjanje i odlaganje preostalog EtOH-a iz svake jažice bez ometanja kuglice zrnca.
16. Ostavite LP2 na magnetskom postolju 4 minute da se osuši na zraku.
17. Bacite neiskorišteni 80-postotni EtOH i posudu.
18. Pripremite RSB posudu s volumenima prema sljedećoj tablici i označite posudu RSB. Volumeni uključuju 1 ml viška za mrtvi volumen posude.

Reagens	6 uzoraka (µl)	12 uzoraka (µl)	16 uzoraka (µl)	18 uzoraka (µl)	22 uzorka (µl)	24 uzorka (µl)
RSB	1390	1780	2040	2170	2430	2560

19. Dodajte 65 µl RSB na zrnca u svakoj jažici.
20. Zabrtvite i protresite LP2 1 minutu na 1800 o/min.
21. Inkubirajte LP2 na sobnoj temperaturi 2 minute.
22. Uklonite brtvu i stavite LP2 na magnetski stalak i pričekajte dok tekućina ne postane bistra (2 minute).
23. Označite novu PCR pločicu FLP (Final Library Plate) i navedite naziv serije korišten pri stvaranju obrade.
24. *Prenezite* 60 µl supernatanta iz LP2 dok ste na magnetskom stalku u odgovarajuće jažice FLP-a pomoću višekanalne pipete.

**OPREZ**

Supernatant sadrži konačnu biblioteku i koristit će se tijekom koraka objedinjavanja i denaturacije. Nemojte odbaciti.

25. Odbacite sve posude zajedno s neiskorištenim reagensima u posudama.
26. Odbacite LP2 MIDI ploču.

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

Ako zaustavljate, zabrtvite završnu ploču biblioteke (FLP) s Microseal B (Mikrobrtvom B) i pohranite je na temperaturi od -25 °C do -15 °C do 14 dana.

Objedinjavanje i denaturiranje biblioteka

U ovom odjeljku korisnici stvaraju skupove planirane u [Planiranje serije i stvaranje obrade na stranici 15](#) te razrjeđuju i denaturiraju.

Potrošni materijal

- HP3 (2N NaOH), ili 0,2N NaOH ako se pripremi istog dana – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim kratko centrifugirajte.
- NB (Neutralization Buffer) – Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.
- RSB (Resuspension Buffer) – Promiješajte u vrtložnoj miješalici ili preokrenite kako biste pomiješali.
- Epruvete za mikrocentrifugu (1 za pripremu reagensa i 1 za svaki planirani skup biblioteke)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (PN 20062290 ili PN 20062291) (1 epruveta za svaki planirani skup biblioteke)

Priprema

1. Pomiješajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugu kako biste pripremili 0,2N NaOH. Označite epruvetu 0,2N NaOH. Ako je dodatni 0,2N NaOH pripremljen tijekom Library Prep (Pripreme biblioteke), a protokol se provodi istog dana, preskočite ovaj korak.

Da bi se spriječile male pogreške pipetiranja, priprema se dodatni volumen.

Reagens	Volumen za svaku S2 protočnu stanicu (µl)	Volumen za svaku S4 protočnu stanicu (µl)
HP3	5	10
RSB	45	90

2. Promiješajte u vrtložnoj miješalici, a zatim nakratko centrifugirajte.

Postupak

1. Ako je FLP ploča bila pohranjena smrznuta, pripremite je na sljedeći način. U suprotnom, prijedite na korak [2](#).

FLP ploča:

- a. Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 minuta.
 - b. Centrifugirajte na 1000 × g 1 minutu.
 - c. Skinite brtvu s FLP-a.
 - d. Pipetirajte 5 do 10 puta pomoću višekanalne pipete postavljene na 30 µl kako biste promiješali.
 - e. Zabrtvite i centrifugirajte na 1000 x g 1 minutu.
2. Odaberite jednu od sljedećih opcija za objedinjavanje, denaturaciju i razrjeđivanje biblioteka za svaki skup od 6 ili 16 uzoraka planiranih za sekvenciranje.

Opcija 1 Sekvencirajte 6 biblioteka na protočnoj stanici S2.

- a. Za svaki skup biblioteka označite novu epruvetu mikrocentrifuge imenom skupa, na primjer objedinjene biblioteka (PL) 1, 2, 3 itd.
- b. Uklonite brtvu i prenesite 25 µl svake biblioteka DNK barkodirane iz određenog skupa indeksa S2 s FLP ploče u PL epruvetu za svaku odgovarajuću planiranu obradu prema skupovima sekvenciranja planiranim tijekom [Planiranje serije i stvaranje obrade na stranici 15](#). Na primjer, kombinirajte biblioteka pripremljene pomoću kompleta indeksa S2 1 u PL epruveti.
- c. Nanesite brtvu ljepljive ploče na FLP ploču i vratite u skladište.
- d. Dodajte 37 µl 0,2N NaOH u svaku PL epruvetu.
- e. Promiješajte svaku PL epruvetu u vrtložnoj miješalici. Kratko centrifugirajte.
- f. Inkubirajte svaku PL epruvetu na sobnoj temperaturi 8 minuta.
- g. Dodajte 38 µl NB u svaku PL epruvetu.
- h. Promiješajte svaku PL epruvetu u vrtložnoj miješalici. Kratko centrifugirajte.
- i. Prenesite 225 µl denaturirane, razrijeđene biblioteka u čistu NovaSeq 6000Dx epruvetu biblioteka.



OPREZ

Ako je prethodno navedeno, NovaSeq 6000Dx Library Tube ID (Identifikacija epruvete biblioteka) koristit će se za identifikaciju i povezivanje planirane obrade. Provjerite je li Library Tube ID (Identifikacija epruvete biblioteka) u koji se prenosi skup ista Library Tube ID navedena u Create Run (Stvori obradu) ili može doći do netočnog povezivanja rezultata uzorka. Ako je Library Tube ID (Identifikacija epruvete biblioteka) navedena u planiranoj obradi, potvrdite da je upotrijebljena ispravna epruveta. Ako prethodno nije navedeno, zabilježite korištenu Library Tube ID (Identifikacija epruvete biblioteka) i revidirajte planiranu obradu, u suprotnom će pridružena(e) planirana(e) obrada(e) morati biti ručno odabrane prilikom učitavanja instrumenta pomoću naziva obrade.

Opcija 2 Sekvencirajte 16 biblioteka na protočnoj stanici S4.

- a. Označite novu mikrocentrifugiranu epruvetu nazivom skupa, na primjer objedinjene biblioteka (PL) 1, 2, 3 itd.
- b. Uklonite brtvu i prenesite 18 µl svake biblioteka DNK s FLP ploče u PL epruvetu u skladu s skupom za sekvenciranje planiranim tijekom [Planiranje serije i stvaranje obrade na stranici 15](#). Na primjer, kombinirajte biblioteka koristeći komplet indeksa S4 1 u PL epruveti.

- c. Nanesite brtvu ljepljive ploče na FLP ploču i vratite u skladište.
- d. Dodajte 22 µl RSB u PL epruvetu.
- e. Dodajte 77 µl 0,2N NaOH u PL epruvetu.
- f. Promiješajte PL epruvetu u vrtložnoj miješalici. Kratko centrifugirajte.
- g. Inkubirajte PL epruvetu na sobnoj temperaturi 8 minuta.
- h. Dodajte 78 µl NB pufera u epruvetu PL.
- i. Promiješajte PL epruvetu u vrtložnoj miješalici. Kratko centrifugirajte.
- j. Prenesite 465 µl denaturirane, razrijeđene biblioteke u čistu NovaSeq 6000Dx epruvetu biblioteke.



OPREZ

Ako je prethodno navedeno, NovaSeq 6000Dx Library Tube ID (Identifikacija epruvete biblioteke) koristit će se za identifikaciju i povezivanje planirane obrade. Provjerite je li Library Tube ID (Identifikacija epruvete biblioteke) u koji se prenosi skup ista Library Tube ID navedena u Create Run (Stvori obradu) ili može doći do netočnog povezivanja rezultata uzorka. Ako je Library Tube ID (Identifikacija epruvete biblioteke) navedena u planiranoj obradi, potvrdite da je upotrijebljena ispravna epruveta. Ako prethodno nije navedeno, zabilježite korištenu Library Tube ID (Identifikacija epruvete biblioteke) i revidirajte planiranu obradu, u suprotnom će pridružena(e) planirana(e) obrada(e) morati biti ručno odabrane prilikom učitavanja instrumenta pomoću naziva obrade.

3. Prijedite izravno na sekvenciranje ako planirate započeti obradu isti dan.

TOČKA SIGURNOG PREKIDANJA

U slučaju prekidanja stavite čep na NovaSeq 6000Dx epruvetu biblioteke i pohranite na -25 °C do -15 °C do 30 dana.

Priprema za sekvenciranje

1. Slijedite upute za pripremu u Dokumentacija proizvoda NovaSeq 6000Dx Instrument (broj dokumenta: 200010105) za potrošne materijale u kompletu planiranom za sekvenciranje.
2. Ako je NovaSeq 6000Dx Library Tube koja sadrži objedinjenu biblioteku pohranjena zamrznuta, pripremite na sljedeći način. Ako prelazite izravno iz prethodnog odjeljka, prijedite na [3](#).
 - a. Odmrzavajte na sobnoj temperaturi 30 minuta.
 - b. Skinite čep i nježno pipetirajte pet puta pomoću P1000 kompleta pipete na 300 µl za skup biblioteke protočne stanice S4 ili pomoću P200 pipete postavljene na 145 µl za skup biblioteke protočne stanice S2.
 - c. Zatvorite NovaSeq 6000Dx Library Tube i rukom protresite sve kapljice na dno. Nemojte miješati u vrtložnoj miješalici ni centrifugirati.
3. Umetnite potrošni materijal. Pogledajte Dokumentacija proizvoda NovaSeq 6000Dx Instrument (broj dokumenta: 200010105) za pojedinosti.

Tumačenje rezultata

TruSight Whole Genome dizajniran je za sekvenciranje cijelog ljudskog genoma. Varijante su prijavljene za uzorke koji prolaze analitičku kontrolu kvalitete (QC) za upotrebu s daljnjim aplikacijama tercijarne analize klica.

- Rezultat sekvenciranja, FASTQ ili kvalitete uzorka smatra se valjanim samo ako metrika kvalitete zadovoljava ili premašuje definiranu specifikaciju. Ako je metrika kvalitete ispod definirane specifikacije, izvedba će biti prijavljena kao (Neuspješna) i uzorak se mora ponoviti. Za informacije o metričkim specifikacijama kvalitete koje se koriste za određivanje valjanosti uzorka, pogledajte [Kontrole kvalitete na stranici 32](#).
- Očekuje se da će uzorci koji prolaze sve pragove kvalitete pružiti varijantu performansi očitavanja opisanih u studiji točnosti (pogledajte [Točnost na stranici 42](#)).
- Male varijante označene su visokom, srednjom ili niskom pouzdanošću na temelju očekivane izvedbe svake vrste varijante (pogledajte [Određivanje razine pouzdanosti malih varijanti na stranici 38](#)).
- Interpretaciju svih informacija o varijantama mora potvrditi laboratorij pomoću dostavljenih izlaznih datoteka analize. Pogledajte TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (broj dokumenta 200049931) za opis informacija navedenih u izlaznim datotekama.

Kontrole kvalitete

Obrada sekvenciranjem i valjanost uzorka određuju se automatski pomoću analitičkih kontrola i prijavljuje ih TruSight Whole Genome Analysis Application (pogledajte [Tablica 8](#) za dodatne pojedinosti o specifikacijama metrike kontrole kvalitete). TruSight Whole Genome ne zahtijeva upotrebu vanjskih pozitivnih kontrola.

- Rezultati kontrole kvalitete prijavljuju se u konsolidiranom izvješću, za sve uzorke u obradi i u pojedinačnim izvješćima kontrole kvalitete uzoraka. Softver šalje izvješća u mapu analize. Pogledajte TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (broj dokumenta 200049931) za lokaciju mape analize i mape obrade.
- Neuspjeh specifikacije kontrole kvalitete obrade sekvenciranjem poništava sekvenciranje i zaustavlja dodatnu analizu.
- Neuspjeh bilo kojeg uzorka FASTQ ili specifikacije biblioteke poništava biblioteku uzorka i sprječava izlaz pridruženih CRAM ili VCF datoteka.
- Dodatne mjere kontrole kvalitete mogu se primijeniti u skladu s lokalnim, državnim i/ili saveznim propisima ili zahtjevima akreditacije.

Za više informacija o ponavljanju sekvenciranja ili pripremi biblioteke, pogledajte [Otklanjanje poteškoća na stranici 74](#).

Tablica 8 TruSight Whole Genome Opisi specifikacija metrike kontrole kvalitete

	Metrika	Specifikacija	Opis
Kontrola kvalitete obrade sekvenciranjem	Ukupni % \geq Q30	\geq 85	Mjerenje kvalitete baze na razini pokretanja. Postavljena je minimalna specifikacija jer preniski %Q30 obrade neće proći Q30 baze u kontroli kvalitete biblioteke uzoraka.
FASTQ QC	Podatci po uzorku (bps)	\geq 90.000.000.000	Minimum je postavljen da bude ekvivalentan ~26x prosječnoj autosomnoj pokrivenosti za trijažne uzorke koji neće uspješno proći kvalitetu kontrole biblioteke kako bi se smanjilo vrijeme analize.

	Metrika	Specifikacija	Opis
Kontrola kvalitete biblioteke uzoraka	Prosječna autosomna pokrivenost	≥ 35	Prosječna pokrivenost autosoma. Minimalna specifikacija postavljena je kako bi se osigurala analitička učinkovitost.
	Postotak autosoma s pokrivenošću većom od 20X	$\geq 93,94$	Mjera ujednačenosti pokrivenosti koja otkriva probleme koji nisu nužno povezani s pristranošću GC-a. Minimalna specifikacija postavljena je kako bi se osigurala analitička učinkovitost.
	Normalizirana pokrivenost od 60 % do 79 % GC spremnika	$0,82 \leq x \leq 1,13$	Mjera ujednačenosti pokrivenosti koja detektira GC pristranost, posebno gubitak pokrivenosti u područjima genoma s višim %GC i nižim %AT osnovnog sastava. Minimalne i maksimalne specifikacije postavljene su kako bi se osigurala analitička učinkovitost.
	Normalizirana pokrivenost od 20 % do 39 % GC spremnika	$0,97 \leq x \leq 1,06$	Mjera ujednačenosti pokrivenosti koja detektira GC pristranost, posebno gubitak pokrivenosti u područjima genoma s nižim %GC i višim %AT osnovnog sastava. Minimalne i maksimalne specifikacije postavljene su kako bi se osigurala analitička učinkovitost.
	Prosječna mitohondrijska pokrivenost	≥ 500	Pokrivenost mitohondrijskog kromosoma. Minimalna specifikacija postavljena je kako bi se osigurala granica otkrivanja mitohondrijskih SNV-ova.
	Postotak baza Q30	≥ 85	Mjerenje kvalitete baze. Minimalna specifikacija postavljena je kako bi se osigurala analitička učinkovitost.
	Procijenjena kontaminacija uzorka	$\leq 0,005$	Otkriva kontaminirajuća očitavanja iz drugih uzoraka. Maksimalna specifikacija postavljena je kako bi se osigurala granica detekcije mitohondrijskog SNV-a (vrsta varijante s najvećom osjetljivošću na kontaminaciju).

Karakteristike radnih svojstava

Sljedeće validacijske studije provedene su korištenjem tijeka rada TruSight Whole Genome opisanog u [Upute za upotrebu na stranici 15](#), a osmišljene su kako bi se osigurala otpornost testa na uobičajene izvore varijacija i dale preporuke za dosljednu izvedbu. Ove studije koristile su metričke specifikacije analitičke kontrole kvalitete navedene u [Tablica 8](#) kao mjerilo za uspješnu izvedbu testa i kao preduvjet za uspostavljanje izvedbe očitavanja analitičke varijante.

Križna kontaminacija

Studija križne kontaminacije procijenila je netočnu detekciju očitavanja indeksa zbog kontaminacije well-to-well (od jažice do jažice) tijekom pripreme biblioteke uzoraka i kontaminacije run-to-run (od obrade do obrade) između uzastopnih obrada sekvenciranjem. Za procjenu križne kontaminacije upotrijebljena su 24 uzorka krvi. Dva operatera pripremila su ukupno 24 biblioteke koristeći S2 konfiguracijske skupove indeksa 1–4, a objedinjene biblioteke poredane su redoslijedom skupa indeksa na jednom NovaSeq 6000Dx Instrument. Dva operatera pripremila su 16 biblioteka koristeći skupove S4 konfiguracijskog indeksa 1 i 2 u dva ponavljanja, a skupovi biblioteka s izmjeničnim skupovima indeksa sekvencirani su na istom NovaSeq 6000Dx.

Za procjenu unakrsne kontaminacije, točna očitavanja indeksa uspoređena su s očitavanjima indeksa iz susjednih jažica za kontaminaciju well-to-well (od do do jažice) i prethodnom obradom sekvenciranjem za kontaminaciju run-to-run (od obrade do obrade). Količina kontaminacije run-to-run (od obrade do obrade) bila je $\leq 0,003178\%$ za S2 i $\leq 0,002487\%$ za S4 obrade. Za procjenu kontaminacije sample-to-sample (od uzorka do uzorka), upotrijebljena je metrika kontrole kvalitete biblioteke uzoraka za procijenjenu kontaminaciju uzorka. Količina kontaminacije sample-to-sample (od uzorka do uzorka) bila je 0,001, što je najniža vrijednost koju je prijavio softver za analizu. Ti rezultati ukazuju na nizak rizik od kontaminacije unutar pripreme biblioteke i tijekom rada sekvenciranja.

Stabilnost tijekom uporabe i srednja stabilnost

Reagensi za pripremu biblioteke procijenjeni su na stabilnost tijekom uporabe kompleta, uključujući višestruke događaje smrzavanja i odmrzavanja i stabilnost otvorene epruvete.

Za testiranje ciklusa smrzavanja i odmrzavanja, smrznute komponente bile su podvrgnute pet događaja smrzavanja i odmrzavanja kako bi se podržao jedan događaj za raspakiranje i četiri događaja za korištenje kompleta. Za stabilnost tijekom uporabe, volumen potreban za pripremu šest biblioteka uzoraka uklonjen je u svakom od tri ciklusa smrzavanja i odmrzavanja kako bi se simuliralo smanjenje volumena tijekom uporabe, a komponente su pohranjene dodatnih 31 dan prije testiranja. Nakon testiranja s gDNK ekstrahiranom od šest davatelja krvi, svi su podaci uspješno prošli metriku analitičke kontrole. Ovi rezultati pokazuju da se smrznuti reagensi za pripremu biblioteke mogu koristiti s do četiri ciklusa smrzavanja i odmrzavanja i 30 dana stabilnosti u upotrebi.

Srednja stabilnost procijenjena je za pojedinačne biblioteke i objedinjene i denaturirane biblioteke. Svi podaci su uspješno prošli analizu metrike analitičke kontrole koja pokazuje do 14-dnevnu stabilnost za pojedinačne biblioteke i do 30-dnevnu stabilnost za objedinjene i denaturirane biblioteke kada se skladište smrznute (-25 °C do -15 °C) kako je opisano u točkama sigurnog zaustavljanja.

Prikupljanje i čuvanje uzoraka krvi

Kompatibilnost epruveta za prikupljanje krvi i pohrana uzoraka ispitana je pomoću četiri donora i krvi izvađene u EDTA epruvete za prikupljanje iz tri različita dobavljača. Genomski DNK (gDNK) izvađen je iz svakog po dolasku na vremensko razdoblje nula, a zatim ponovno nakon što je krv čuvana 16, 33 i 43 dana skladištenja na temperaturi od 2 °C do 8 °C. Ekstrahirani gDNK pohranjen je zamrznut (-25 °C do -15 °C) u puferu za eluiranje (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0), a zatim kvantificiran i korišten za pripremu i sekvenciranje biblioteke. Svi su podaci prošli metrikom analitičke kontrole testa koja ukazuje na kompatibilnost testa s tri različite epruvete za prikupljanje EDTA krvi i krvi pohranjene do pet tjedana na temperaturi od 2 °C do 8 °C.

Procjena metode ekstrakcije DNK

Tri komercijalno dostupna kompleta za ekstrakciju procijenjena su za učinkovitost testa. Dva kompleta koristila su magnetska zrnca, jedan sa i jedan bez čvrste faze i vezanja na bazi celuloze, a jedan komplet je koristio metodu pročišćavanja nukleinske kiseline temeljenu na membrani od silicijevog dioksida pomoću centrifugalnih kolona ([Tablica 9](#)).

Procjenu su izvršila dva operatera s jednom serijom ekstrakcijskih reagensa po metodi i punom krvlju prikupljenom u EDTA epruvetama od četiri navodno zdrava darivatelja. Svaki uzorak krvi ekstrahiran je četiri odvojena puta prema uputama proizvođača tijekom neuzastopnih dana za ukupno 16 promatranja po kompletu. Ekstrahirana gDNK korištena je za pripremu biblioteka za sekvenciranje i analizu.

Sva zapažanja (16/16) za svaku metodu ekstrakcije uspješno su prošla metrikom testa analitičke kontrole. Odabir metode ekstrakcije gDNK uzorka nije utjecao na učinkovitost analize. U studijama analitičke točnosti i reproducibilnosti korištena je gDNK ekstrahirana s Kompletom 3 (izolacija kolone filtera od silicijevog dioksida sa spin kolonama).

Tablica 9 Metode ekstrakcije testirani na TruSight Whole Genome učinkovitost

Komplet	Metoda ekstrakcije
1	Magnetska ekstrakcija zrnaca s reverzibilnom imobilizacijom čvrste faze (SPRI)
2	Ekstrakcija magnetskih zrnaca s mobilnom krutom fazom i vezanjem na bazi celuloze
3	Izolacija kolone filtera od silicijevog dioksida sa spin kolonama

Ulazna osjetljivost DNK

Količina unosa gDNK preporučena za testiranje po uzorku iznosi 280 ng ili 350 ng, ovisno o metodama kvantifikacije DNK navedenima u [Preporuke za unos DNK na stranici 10](#).

Kako bi se odredila učinkovitost u rasponu ulaznih koncentracija gDNK, količina DNK korištena u analizi testirana je na razinama u rasponu od $\pm 28,6$ % preporučenog unosa. Rezultati su pokazali da je -25 % preporučenog unosa gDNK donja granica za analizu. Test radi ispravno s unosom gDNK do $+28,6$ % preporučenog unosa.

Karakterizacija triju različitih metoda kvantifikacije pokazala je da različite metode imaju različite razine varijabilnosti i mogu dati različite rezultate. Ako koristite metodu koja nije navedena u [Preporuke za unos DNK na stranici 10](#), možda će biti potrebno optimizirati ciljani ulaz za gDNK. Preporuča se da se gDNK za uzorke namijenjene za određenu seriju pripreme biblioteke i obrada sekvenciranjem kvantificiraju zajedno kako bi se eliminirala varijabilnost batch-to-batch (od serije do serije) kada je to moguće ili se koriste kontrole procesa kako bi se osigurala $\leq 25\%$ varijabilnost kvantifikacije gDNK batch-to-batch (od serije do serije).

Ometajuće tvari

Ova studija procijenila je učinak s endogenim i egzogenim tvarima povezanim s ljudskom krvlju i epruветama za prikupljanje krvi. Bilirubin, hemoglobin i trigliceridi odabrani su za procjenu za simulaciju ikteričnih, hemoliziranih i lipemičnih uzoraka. Biotin i EDTA odabrani su za procjenu zbog prisutnosti u krvi i epruветama za sakupljanje krvi (BCT) i zbog mogućeg utjecaja na kemijski sastav analize. Uzorci tvari su dodane u uzorke krvi davatelja prije ekstrakcije, bilo izravno ili nakon otapanja u otapalu. Testna koncentracija i pojedinosti o unosu uzorka za svaku tvar nalaze se u sljedećoj tablici.

Tablica 10 Ometajuće tvari testirane na TruSight Whole Genome učinkovitost

Tvar	Testna koncentracija	Otapalo koje se koristi u otopini uzorka	% uzorka dodano u krv
Bilirubin (nekonjugirani)	40 mg/dL (0,4 mg/ml) ¹	DMSO	4 %
Hemoglobin	1000 mg/dl (10 mg/ml) ¹	N/A – otopljen u krvi	N/A – otopljen u krvi
Trigliceridi	1500 mg/dl (15 mg/ml) ¹	100-postotni etanol	4 %
Biotin	0,00351 mg/ml ²	Voda	4 %
EDTA	5,4 mg/ml ³	Voda	3 %

¹ Koncentracije su odabrane kao najviše opažene koncentracije prema „Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry (Dodatnim tablicama za ispitivanje interferencije u kliničkoj kemiji) CLSI EP37-ED1:2018“.

² Odabrana je koncentracija koja je tri puta veća od „Highest Drug Concentration Under Therapeutic Treatment“ (Najveće koncentracije lijeka pod terapijskim liječenjem) navedene u „Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry (Dodatnim tablicama za ispitivanje interferencije u kliničkoj kemiji), CLSI EP37-ED1:2018“.

³ Koncentracija je odabrana na temelju koncentracije EDTA koja varira u epruветama za skupljanje krvi u rasponu do 1,8 mg/ml i za simulaciju kratkog događaja punjenja vađenja krvi od 33 % nominalnog BCT volumena, što dovodi do 3x veće koncentracije EDTA u krvi, što odgovara 5,4 mg/ml.

U testiranju je korištena krv četiri davatelja. Za svaku interferentnu tvar, alikvot pune krvi svakog davatelja je obogaćen s interferentnom tvari i zatim podijeljen u četiri replika ekstrakcije gDNK. Kontrola je obrađena na sličan način bez dodavanja tvari. Upareni testni i kontrolni uvjeti obrađeni su za svakog donora unutar istog događaja ekstrakcije, a ekstrahirana gDNK zatim je obrađena unutar jednog događaja pripreme i sekvenciranja biblioteke. Nije bilo utjecaja na izvedbu analize niti dokaza o interferenciji kao odgovor na bilo koju od testiranih tvari.

Ekvivalencija indeksiranja uzorka

TruSight Whole Genome pruža izbor između četiri skupa indeksa od 6 pleksa za S2 obrade ili dva seta indeksa od 16 pleksova za konfiguracije obrade S4 sekvenciranjem. Pokazalo se da analiza daje ekvivalentnu izvedbu kada su biblioteke sekvencirane na NovaSeq 6000Dx S2 ili S4 konfiguracijama sekvenciranja. Dodatno, pokazalo se da i konfiguracije obrade S2 i S4 postižu > 95 % biblioteka uzoraka s najmanje 35,0x pokrivenosti kada se testiraju s propisanim skupovima indeksa. Stoga se različiti skupovi indeksa i objedinjavanje koji se koriste za sekvenciranje na protočnim stanicama S2 i S4 mogu koristiti naizmjenično kako bi se omogućila skalabilnost za prilagođavanje fluktuacija u protoku uzoraka i omogućila fleksibilnost u laboratorijskim procesima.

Analitička učinkovitost

Provedena su početna ispitivanja karakterizacije kako bi se odredili pragovi razine pouzdanosti za male varijante, granica praznog/ograničenja otkrivanja za mitohondrijske SNV-ove i pragovi veličine za precizno otkrivanje ekspanzija STR-a prilikom korištenja TruSight Whole Genome tijekom rada. Uzorci koji predstavljaju varijantne klase procijenjene pomoću TruSight Whole Genome uključeni su u procjenu analitičke točnosti i ponovljivosti, uključujući preciznost unutar laboratorija i vanjsku ponovljivost. Analitička izvedba prijavljena je za obrade sekvenciranjem i uzorke koji su prošli sve kontrole kvalitete, osim za uzorke izmišljene mješavine korištene za procjenu mitohondrijskih SNV-ova na ili blizu granice detekcije koji nisu zadovoljili metriku kontaminacije. Rezultati za svaku od ovih studija opisani su u odjeljcima u nastavku.

Početna ispitivanja karakterizacije

Određivanje razine pouzdanosti malih varijanti

Za ovu studiju, logistički regresijski model uvježban je na vrlo ponovljivim i slabo ponovljivim varijantnim mjestima iz 96 replika NA12878 kako bi se definirali pragovi za visoke, srednje i niske razine pouzdanosti.

Baze visoke pouzdanosti za određenu vrstu varijante su one u kojima predviđena ponovljivost unutar laboratorija dostiže ili premašuje 99 % za dati prag rezultata i postotak baza koje nisu N koje zadovoljavaju taj kriterij prelazi 30 %. Ako mala vrsta varijante nema bodovni prag koji zadovoljava te kriterije, ta vrsta varijante neće imati visoku razinu pouzdanosti. Baze srednje pouzdanosti su one u kojima predviđena ponovljivost unutar laboratorija dostiže ili premašuje 95 % za dati prag rezultata i vrstu varijante. Baze niske pouzdanosti su one u kojima je predviđena ponovljivost unutar laboratorija ispod 95 % za dati prag rezultata i vrstu varijante. Očitavanja varijanti za određenu vrstu varijante s visokom ili srednjom razinom pouzdanosti uključuju većinu

%ne-N baza (tj. isključujući praznine) (pogledajte tablicu 6) i pokazuju visoku izvedbu kada se procjenjuju u odnosu na male varijante skupova istine i u opsežnim procjenama preciznost unutar laboratorija replika NA12878.

Vrsta varijante	Razina pouzdanosti	% ne-N baza
SNV	Visoka	89,14 %
	Srednja	3,30 %
	Niska	7,56 %
Kratka brisanja (1 – 5 bp)	Visoka	90,88 %
	Srednja	2,45 %
	Niska	6,67 %
Srednja brisanja (6-15 bp)	Srednja	86,94 %
	Niska	13,06 %
Duga brisanja (\geq 16 bp)	Srednja	85,42 %
	Niska	14,58 %
Kratka umetanja (1 – 5 bp)	Visoka	88,94 %
	Srednja	4,61 %
	Niska	6,45 %
Srednja umetanja (6 – 15 bp)	Srednja	89,37 %
	Niska	10,63 %
Duga umetanja (\geq 16 bp)	Srednja	48,92 %
	Niska	50,63 %

Određivanje Ograničenje praznog mjesta (LoB) i Ograničenje otkrivanja mitohondrijskih SNV-ova

Za mitohondrijske SNV-ove provedene su studije Ograničenje praznog mjesta (LoB) i Ograničenje otkrivanja (LoD). Za studiju mitohondrijskog SNV-a, LoB je procijenjen korištenjem lokusa za koje se zna da nemaju varijantu (tj. referentno očitavanje). LoD se definira kao frekvencija alela mtDNK SNV varijante za koju je stopa detekcije te varijante 95 %.

Za određivanje LoB i LoD za detekciju heteroplazmatskih mtSNV-ova, temeljito karakterizirani uzorci gDNK dvaju različitih davatelja krvi pomiješani su u titracijskoj studiji do pet razina razrjeđenja s 20 ponavljanja po razini razrjeđenja. Razine razrjeđenja dizajnirane su tako da ciljaju postotke varijanti mtSNV (1,2 - 6 % VAF) kako bi se oponašale različite razine mitohondrijske heteroplazmije. Mješoviti uzorci gDNK su obrađeni, a očitavanja su smanjena kako bi se postigla prosječna mitohondrijska pokrivenost od 500x. Ukupno 42 umjetnih „heteroplazmičkih“ mjesta korištena su u daljnjoj procjeni. Regresijska analiza korištena je za procjenu potrebnih omjera miješanja za ciljanje 1x LoD i 2x LoD za podskup mtSNV-ova.

Pozicije na kojima gDNK iz oba uzorka krvi ima genotipove referentnih alela očitane su za mtSNV očitavanja koja su prošla filtar s nereferentnim alelom. Lažno pozitivna stopa izračunata je kao 0,8%, što je u skladu s pretpostavkom o nultom LoB-u prema „Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, CLSI EP17-A2-ED1:2012” (Procjena sposobnosti detekcije za kliničke laboratorijske mjerne postupke, CLSI EP17-A2-ED1:2012). Svaka od 42 pozicije analizirana je neovisno pomoću probit regresije. Vrijednost LoD definirana je kao očekivana vrijednost VAF-a koja odgovara stopi otkrivanja od 95 % (C95). Ukupna prijavljena vrijednost LoD-a, definirana kao 95. percentil vrijednosti LoD-a s mjesta istine, iznosila je 4,75 % VAF-a. Srednja vrijednost raspodjele apsolutnih razlika između uočenog i očekivanog VAF-a za sva opažanja iznosila je 0,83 % s gornjim 95 %-tnim ograničenjem pouzdanosti od 0,86 % VAF-a.

Određivanje praga ekspanzije STR

Zbog tehničkih ograničenja raspona STR-ova koji premašuju duljinu čitanja sekvenciranja (~135 bp), opažena duljina STR-a s TruSight Whole Genome često će biti podcijenjena prava duljina. Jednom kad prava duljina STR-a premaši srednju duljinu fragmenta (~330 bp), procjena duljine STR-a se nalazi na platou. Iz tog razloga, TruSight Whole Genome procjenjuje ciljani skup lokusa za koje test može točno razlikovati STR-ove s opaženom duljinom unutar normalne varijacije od onih s duljinom većom od opažene u navodno zdravoj populaciji („expanded” (proširena)) (pogledajte [Tablica 2](#) za popis lokusa procijenjenih putem TruSight Whole Genome).

Kako bi se osigurao ukupni Negative Percent Agreement (negativni postotak slaganja) (NPA) od 95 % na svim STR mjestima koje je procijenio TruSight Whole Genome, postavljeni su pragovi po lokusima za očitavanje proširenog STR-a na tom mjestu kako bi se postiglo prosječno 99,94 % NPA po mjestu. Kako bi se uzela u obzir inherentna varijabilnost u procjenama veličine STR unutar navodno zdrave populacije, pragovi su postavljeni na temelju distribucija neovisno promatranih duljina STR-a u navodno zdravom skupu podataka 1000 Genomes Project (Projekta 1000 genoma) (2504 uzorka iz različitih populacija obrađeno s DRAGEN 3.7.5 i ExpansionHunter 4.0.2).⁴

Kako bi se potvrdili pragovi utvrđeni korištenjem skupa podataka Projekta 1000 genoma, ekstrahirana gDNK iz 16 referentnih uzoraka staničnih linija (Center for Disease Control’s Genetic Testing Reference Material (Get-RM) Program (Program referentnog materijala za genetsko testiranje (Get-RM) Centra za kontrolu bolesti)) s različitim neovisno procijenjenim veličinama STR obrađena je s TruSight Whole Genome. 10 bibliotečnih replika za svaki od 16 uzoraka pripremljeno je i testirano od strane šest operatera za ukupno 960 opažanja, a veličine STR su neovisno procijenjene za svaku repliku. Uočena stopa lažno pozitivnih rezultata na razini uzorka u svim ciljanim lokusima bila je 0,35 %.

Granica detekcije (LoD) procijenjena je za 28 ciljanih STR lokusa sa testiranim staničnim linijama na temelju veličina alela opaženih putem TruSight Whole Genome i očekivanih veličina alela na temelju prethodne neovisne karakterizacije ([Tablica 11](#)). Za odabrane lokuse određena je granica detekcije za više od jedne STR na istoj lokaciji za ukupno 35 STR-a. LoD je procijenjena veličina pri kojoj se očekivano širenje STR otkriva za 95 % alela na temelju probit modela s potvrđenim pragovima za razlikovanje normalne i proširene veličine STR-a. Podaci na svim mjestima s poznatim veličinama alela skupljeni su zajedno kako bi se dobile procjene LoD-a za svako mjesto na temelju praga specifičnog mjesta za prošireni STR. Duljina ponavljanja FMR1 bila je sustavno podcijenjena u usporedbi s drugim STR-ovima i zahtijevala je prilagođeni model za ispravnu procjenu LoD-a.

Potvrđeni pragovi specifični za lokaciju za proširene STR-ove, procijenjeni očekivani i promatrani LoD za ciljana mjesta i prag bolesti temeljen na dostupnoj literaturi (samo u ilustrativne svrhe) ciljanih STR-ova nalaze se u [Tablica 11](#). Za STR ekspanzije dulje od praga diktiranog duljinom očitavanja i za koje se očekivana duljina ne može izravno promatrati, promatrana duljina približno je prosječna duljina koja bi se promatrala tijekom nekoliko obrada sekvenciranjem. Za ekspanzije STR-a kraće od praga diktiranog dužinom očitavanja, očekivane i opažene duljine su iste.

Tablica 11 Sažetak procijenjene sposobnosti otkrivanja za TruSight Whole Genome Ciljana mjesta STR-a

Ciljano mjesto ^a	Prošireni prag STR-a (bp) na temelju skupa podataka projekta 1000 Genomes	Procijenjena LoD (očekivano trajanje, bp)	Procijenjena LoD (opažena duljina, bp)	Prag bolesti (pravo trajanje, 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	Nije primjenjivo
ATXN8OS	200	298	233	237 ^{7,8}
ATXN8OS_CTA	90	92	92	Nije primjenjivo
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	Nije primjenjivo
CNBP_CAGA	68	80	80	Nije primjenjivo
CSTB	200	298	233	348 ^{12,13}
DIP2B	200	298	233	Nije primjenjivo
DMPK	122	132	142	150 ¹⁴
FMR1	175	433	212	600 ^{d,15}
FXN	102	102	102	198 ^{6,16}

Ciljano mjesto ^a	Prošireni prag STR-a (bp) na temelju skupa podataka projekta 1000 Genomes	Procijenjena LoD (očekivano trajanje, bp)	Procijenjena LoD (opažena duljina, bp)	Prag bolesti (pravo trajanje, bp) ^b
FXN_A	200	298	233	Nije primjenjivo
GLS	111	115	115	270 ¹⁷
HTT	108	115	115	120 ¹⁸
HTT_CCG	42	42	42	Nije primjenjivo
JPH3	99	101	101	123 ¹⁹
NIPA1	(33)	(33)	(33)	Nije primjenjivo
NOP56	84	84	84	3900 ^{20,21}
NOP56_CGCCTG	24	24	24	Nije primjenjivo
NOTCH2NL	129	175	174	213 ^{22,23}
PABPN1	27	27	27	Nije primjenjivo
PHOX2B	60	60	60	75 ^{5,24}
PPP2R2B	87	90	90	198 ^{7,8}
TBP	129	175	174	135 ^{7,8}

^a Lokusi s alternativnim STR označeni su sa LOCL<ALTERNATE_REPEAT> (npr. ATXN7_GCC).

^b Pragovi bolesti navedeni u ilustrativne svrhe samo na temelju objavljene literature; N/P (nije primjenjivo) u ovom stupcu ukazuju na to da STR ne može biti povezan s objavljenim patogenim širenjem.

^c 100 % replikata NA23378 otkrilo je ekspanziju STR-a u C9ORF72, što ukazuje na prethodno neokarakteriziranu ekspanziju na tom mjestu u tom uzorku. Ovaj uzorak stanične linije isključen je iz analize.

^d Srednje ekspanzije mogu također biti povezane s fenotipom.

Ova je studija pokazala slične profile preciznosti i točnosti za procjene veličine STR-a u različitim ciljanim lokusima, s ograničenjem otkrivanja za proširenja STR-a koje je uvelike uvjetovano odabranim pragom (temeljenom na distribuciji veličine u populaciji Projekta 1000 genoma), a ne razlikama u mogućnostima otkrivanja među mjestima. Sve procijenjene vrijednosti LoD u ljestvici očekivane duljine bile su veće od duljina viđenih u navodno zdravim populacijama i niže od mnogih objavljenih pragova bolesti, čineći povezane pragove očitavanja ekspanzije STR korisnima za označavanje ponavljanja na određenom lokusu kao potencijalno proširenog. Ovdje navedeni pragovi korišteni su za procjenu točnosti otkrivanja ekspanzije STR-a.

Točnost

Analitička točnost određena je usporedbom TruSight Whole Genome varijantnih očitavanja s rezultatima dobivenim alternativnim metodama. Referentne metode odabrane su na temelju značajne razlike u usporedbi s TruSight Whole Genome, koja koristi Nextera™ biblioteku povezanu sa zrcima, kemiju sekvenciranja s 2 boje na sustavu DRAGEN i NovaSeq 6000Dx 3.9.5 za očitavanje varijanti. Reprezentativni pristup validaciji TruSight Whole Genome proveden je s uzorcima koji predstavljaju varijante u svim klasama varijanti uključenim u izlaz

testa. Za procjenu točnosti TruSight Whole Genome korišteno je ukupno 459 jedinstvenih uzoraka koji su prošli analitičku kontrolu kvalitete. Uzorci su testirani na tri serije reagensa i potrošnog materijala za pripremu biblioteke, četiri serije S4 kompleta za sekvenciranje, osam operatera, pet NovaSeq 6000Dx Instrument i dva interna mjesta. Pripremljen je i sekvenciran 31 nezavisni skup biblioteke.

U sljedećoj tablici navedene su definicije definicije metrika izračunatih u studijama točnosti.

Pojam	Definicija
Donja razina pouzdanosti (LCL)	Jednostrana 95% donja granica pouzdanosti korištenjem Wilsonove metode.
Negativni postotak slaganja (NPA) ¹	Postotak negativnih mjesta kako je definirano referentnom metodom koja su usklađeno identificirana kao negativna s TruSight Whole Genome.
Postotak pozitivnog slaganja (PPA) ²	Postotak varijanti očitanih u referentnoj metodi koje su usklađeno očitane s TruSight Whole Genome.
Tehnička pozitivna prediktivna vrijednost (TPPV) ³	Postotak varijanti očitanih s TruSight Whole Genome koje su usklađeno očitane u referentnoj metodi.

¹ Za točnost otkrivanja ekspanzije STR-a i točnost otkrivanja alela SMN1, NPA = True Negative (Istinski negativan) / (True Negative (Istinski negativan) + False Positive (Lažno pozitivan)).

² Za točnost otkrivanja ekspanzije STR-a i točnost otkrivanja alela SMN1, PPA = True Positive (Istinski pozitivan) / (True Positive (Istinski pozitivan) + False Negative (Lažno negativan)).

³ Za točnost otkrivanja ekspanzije STR-a i točnost otkrivanja alela SMN1, TPPV = True Positive (Istinski pozitivan) / (True Positive (Istinski pozitivan) + False Positive (Lažno pozitivan)).

Točnost malih varijanti

Točnost očitavanja malih varijanti procijenjena je pomoću genomske DNK ekstrahirane iz periferne pune krvi 195 navodno zdravih darivatelja. TruSight Whole Genome očitavanja varijanti uspoređena su s očitavanjima varijanti iz klinički potvrđenog testa sekvenciranja cijelog genoma izvedenog u Illumina Laboratory Services (ILS) CLIA laboratoriju kao referentna metoda. Referentna metoda tijekom rada sekvenciranja cijelog genoma koristi bibliotečni pripravak temeljen na ligaciji TruSeq™ bez PCR-a, kemiju sekvenciranja s 4 boje na sustavu sekvenciranja HiSeq™ i DRAGEN 3.8.4 za očitavanja varijanti. Umetanja i brisanja veličine > 31 bp nisu karakterizirana u ovoj studiji jer nisu validirana u referentnoj metodi.

Sažetak točnosti za sva očitavanja malih varijanti prikazan je u [Tablica 12](#) i [Tablica 13](#).

Tablica 12 TruSight Whole Genome Assay Točnost za male varijante stratificirane prema stupnju pouzdanosti i veličini (navodno zdravi uzorci krvi)

Podvrsta varijante	Razina pouzdanosti	Očitavanja usklađena s referentnom metodom	Isključiva očitavanja za referentnu metodu	Očitavanja usklađena s testom	Isključiva očitavanja za test	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV-ovi	Visoka	261.728.580	1.573.877	261.603.149	208.639	99,4 % (99,4 %)	99,9 % (99,9 %)
	Srednja	6.677.589	421.718	6.519.811	151.128	94,1 % (94,0 %)	97,7 % (97,7 %)
	Niska	6.864.840	3.251.709	6.649.756	2.151.388	67,9 % (67,8 %)	75,6 % (75,5 %)
Kratko brisanje (1–5 bp)	Visoka	11.978.745	201.783	12.246.922	67.277	98,3 % (98,3 %)	99,5 % (99,5 %)
	Srednja	2.875.258	45.290	3.050.170	47.593	98,4 % (98,4 %)	98,5 % (98,5 %)
	Niska	1.802.544	228.582	1.966.974	221.449	88,7 % (88,7 %)	89,9 % (89,8 %)
Srednje brisanje (6–15 bp)	Srednja	858.673	20.079	860.493	18.361	97,7 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Niska	145.618	28.300	157.398	41.824	83,7 % (83,6 %)	79,0 % (78,9 %)
Dugo brisanje (16–31 bp)	Srednja	344.168	14.334	336.976	31.165	96,0 % (95,9 %)	91,5 % (91,5 %)
	Niska	54.444	23.438	53.835	47.272	69,9 % (69,6 %)	53,2 % (53,0 %)
Kratko umetanje (1 – 5 bp)	Visoka	11.212.366	164.651	11.380.307	49.776	98,6 % (98,5 %)	99,6 % (99,6 %)
	Srednja	1.015.324	41.890	988.512	36.051	96,0 % (96,0 %)	96,5 % (96,5 %)
	Niska	639.663	198.700	576.797	180.458	76,3 % (76,2 %)	76,2 % (76,1 %)

Podvrsta varijante	Razina pouzdanosti	Očitavanja usklađena s referentnom metodom	Isključiva očitavanja za referentnu metodu	Očitavanja usklađena s testom	Isključiva očitavanja za test	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Srednje umetanje (6 – 15 bp)	Srednja	790.968	18.163	798.572	17.111	97,8 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Niska	76.105	24.188	88.389	35.819	75,9 % (75,7 %)	71,2 % (71,0 %)
Dugo umetanje (16 – 31 bp)	Srednja	159.927	3.135	159.432	8.639	98,1 % (98,0 %)	94,9 % (94,8 %)
	Niska	102.552	22.199	103.892	55.724	82,2 % (82,0 %)	65,1 % (64,9 %)

Tablica 13 Sažetak TruSight Whole Genome NPA očitavanja malih varijanti stratificiranih prema razini pouzdanosti

Razina pouzdanosti	Usklađena negativna očitavanja	Referentna metoda Isključiva negativna očitavanja	NPA (LCL)
Visoka	202.276.243.790	127.465.816	99,9 % (99,9 %)
Srednja	3.307.740.675	77.650.177	97,7 % (97,7 %)
Niska	3.653.569.580	439.038.662	89,3 % (89,3 %)

Provedena je dodatna studija točnosti kako bi se procijenila detekcija male varijante s komercijalno dostupnim uzorcima DNK referentne stanične linije (Coriell Institute for Medical Research) s dobro karakteriziranim skupovima očitavanja koje je generirao konzorcij Genome in a Bottle (GIAB). Za ovu studiju, kompleti za očitavanje GIAB korišteni su kao referentna metoda. Skup istinitosti u ovim uzorcima uključuje umetanja i brisanja veća od 31 bp, tako da su veća umetanja i brisanja uključena u ovu procjenu. Ovi uzorci uključivali su HG001-005 i NA24695 s rezultatima prikazanim u zbiru u [Tablica 14](#).

Tablica 14 TruSight Whole Genome Assay Točnost za male varijante stratificirane prema razini pouzdanosti i veličini (dobro karakterizirani uzorci staničnih linija)

Podvrsta varijante	Razina pouzdanosti	Očitavanja usklađena s GIAB-om	Isključiva očitavanja GIAB-a	Očitavanja usklađena s testom	Isključiva očitavanja za test	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV-ovi	Visoka	21.431.369	2552	21.439.303	3954	>99,9 % (> 99,9 %)	>99,9 % (> 99,9 %)
	Srednja	908.172	1259	910.058	2175	99,9 % (99,9 %)	99,8 % (99,8 %)
	Niska	720.717	59.691	722.180	28.721	92,4 % (92,3 %)	96,2 % (96,1 %)
Kratko brisanje (1 – 5 bp)	Visoka	1.080.383	690	1.090.370	730	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Srednja	423.547	788	437.019	606	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Niska	263.828	2624	281.217	2088	99,0 % (99,0 %)	99,3 % (99,2 %)
Srednje brisanje (6 – 15 bp)	Srednja	142.671	238	144.997	167	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Niska	86.174	812	91.710	546	99,1 % (99,0 %)	99,4 % (99,4 %)
Dugo brisanje (≥ 16 bp)	Srednja	34.414	315	34.580	55	99,1 % (99,0 %)	99,8 % (99,8 %)
	Niska	9.985	393	10.212	106	96,2 % (95,9 %)	99,0 % (98,8 %)
Kratko umetanje (1 – 5 bp)	Visoka	927.288	221	925.787	271	>99,9 % (> 99,9 %)	>99,9 % (> 99,9 %)
	Srednja	158.346	294	137.081	250	99,8 % (99,8 %)	99,8 % (99,8 %)
	Niska	93.857	2.402	75.687	1427	97,5 % (97,4 %)	98,1 % (98,1 %)

Podvrsta varijante	Razina pouzdanosti	Očitavanja usklađena s GIAB-om	Isključiva očitavanja GIAB-a	Očitavanja usklađena s testom	Isključiva očitavanja za test	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Srednje umetanje (6-15 bp)	Srednja	91.117	116	89.054	60	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Niska	37.925	745	36.670	406	98,1 % (98,0 %)	98,9 % (98,8 %)
Dugo umetanje (≥ 16 bp)	Srednja	11.081	46	11.110	17	99,6 % (99,5 %)	99,8 % (99,8 %)
	Niska	14.086	607	14.312	262	95,9 % (95,6 %)	98,2 % (98,0 %)

Točnost varijante broja kopije

Točnost očitavanja CNV-a procijenjena je istom referentnom metodom i uzorcima navodno zdravih davatelja krvi (195) koji su korišteni za procjenu male varijante točnosti očitavanja. Smatra se da je svaki CNV otkriven u skupu očitavanja ako je najmanje 50% tog CNV-a pokriveno sjedinjenjem CNV očitavanja iste vrste (GAIN/LOSS) u uparenom skupu očitavanja. TruSight Whole Genome definira skup genomskih regija koje su isključene iz očitavanja CNV-a na temelju procjene podataka uzoraka iz 1000 genoma i 77 navodno zdravih darivatelja krvi upotrebom metrike koja se odnosi na ekstremne vrijednosti dubine pokrivenosti, vanjske vrijednosti varijance pokrivenosti i praznine u pokrivenosti kako bi se utvrdile regije genoma koje se ne mogu prijaviti za CNV. Očitavanje CNV-a procijenjeno je samo preko genomskih regija koje su bile zajedničke i za referentnu metodu i za TruSight Whole Genome. Sažetak točnosti za sva očitavanja CNV-a prikazan je u [Tablica 15](#) i [Tablica 16](#).

Tablica 15 TruSight Whole Genome Assay Točnost za CNV-ove stratificirane prema veličini i vrsti

Veličina	Vrsta	Očitavanja usklađena s referentnom metodom	Isključiva očitavanja za referentnu metodu	Očitavanja usklađena s testom	Isključiva očitavanja za test	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
10-25 kbp	GAIN (Dobitak)	443	98	342	56	81,89 % (79,01 %)	85,93 % (82,82 %)
	LOSS (Gubitak)	4.162	457	4.155	679	90,11 % (89,36 %)	85,95 % (85,11 %)

Veličina	Vrsta	Očitavanja usklađena s referentnom metodom	Isključiva očitavanja za referentnu metodu	Očitavanja usklađena s testom	Isključiva očitavanja za test	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
25-50 kbp	GAIN (Dobitak)	355	117	370	76	75,21 % (71,81 %)	82,96 % (79,83 %)
	LOSS (Gubitak)	1.587	16	1.622	7	99,00 % (98,50 %)	99,57 % (99,21 %)
50-100 kbp	GAIN (Dobitak)	228	0	187	20	>99,99 % (98,83 %)	90,34 % (86,42 %)
	LOSS (Gubitak)	723	5	697	6	99,31 % (98,60 %)	99,15 % (98,36 %)
≥ 100 kbp	GAIN (Dobitak)	371	1	335	5	99,73 % (98,80 %)	98,53 % (97,01 %)
	LOSS (Gubitak)	541	23	569	1	95,92 % (94,32 %)	99,82 % (99,22 %)
Sveukupno (svi CNV- ovi ≥ 10 kbp)	GAIN (Dobitak)	1.397	216	1.234	157	86,61 % (85,15 %)	88,71 % (87,24 %)
	LOSS (Gubitak)	7.013	501	7.043	693	93,33 % (92,84 %)	91,04 % (90,49 %)

Tablica 16 Sažetak TruSight Whole Genome NPA očitavanja CNV-a

Veličina	Vrsta	Usklađena negativna očitavanja	Negativna očitavanja isključiva za referentnu metodu	Isključiva očitavanja za test	NPA (LCL)
Sveukupno (svi CNV-ovi \geq 10 kbp)	GAIN (Dobitak)	548.478.033.220	5.701.311	6.400.382	> 99,99% (> 99,99%)
	LOSS (Gubitak)	548.591.794.675	11.719.913	8.543.877	> 99,99 % (> 99,99 %)

Obrade točnosti homozigotnosti

Tehnička pozitivna prediktivna vrijednost (TPPV) za ROH očitavanja procijenjena je istom referentnom metodom i uzorcima navodno zdravih darivatelja krvi (195) koji su korišteni u procjeni točnosti male varijante i CNV-a. ROH događaji određeni su identificiranjem regija u genomu koje sadrže sekvencu homozigotnih SNV očitavanja kojima nedostaju heterozigotni SNV ili duge praznine bez varijanti. Takve regije sjemena zatim su proširene lijevo i desno i procijenjene na okolna homozigotna očitavanja ili prisutnost heterozigotnih SNV-ova. ROH događaji otkriveni putem TruSight Whole Genome uspoređeni su sa SNV očitavanjima iz referentne metode. Sažetak TPPV-a za ROH očitavanja prikazan je u [Tablica 17](#).

Tablica 17 TruSight Whole Genome Točnost za ROH događaje stratificirane prema veličini

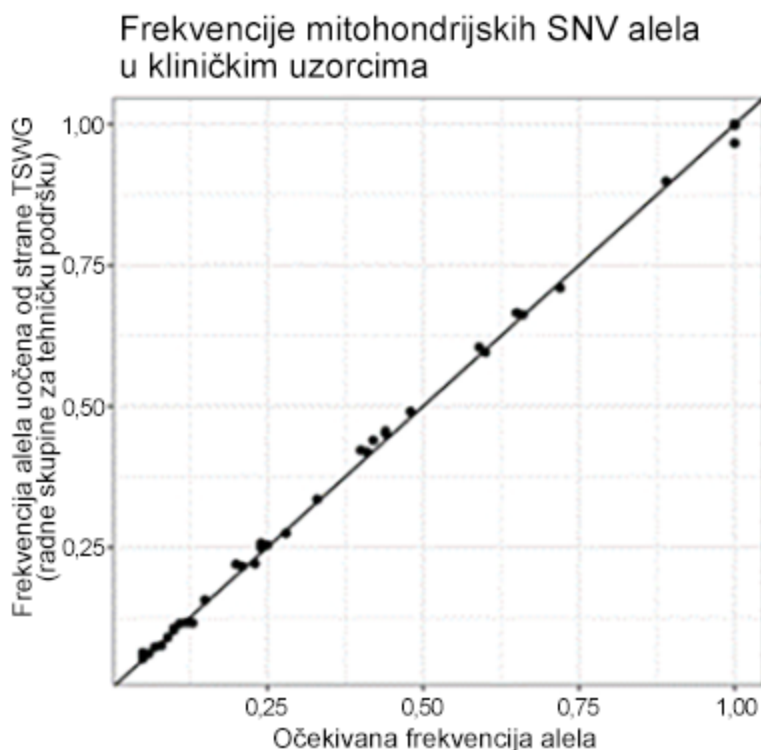
Veličina	Srednja vrijednost TPPV-a	TPPV LCL
10-25 kbp	81,44 %	80,77 %
25-50 kbp	82,14 %	81,82 %
50-100 kbp	81,77 %	81,55 %
100-500 kbp	82,19 %	81,98 %
\geq 10 kbp	82,07 %	81,94 %
\geq 500 kbp	85,47 %	84,66 %

Pozitivni postotak slaganja (PPA) za detekciju ROH-a određen je u vanjskim kliničkim uzorcima usporedbom TruSight Whole Genome očitavanja s ROH očitavateljima iz ortogonalnih metoda uključujući kromosomske mikronizove i procjenu temeljenu na PCR-u. Događaj ROH smatrao se otkrivenim ako se najmanje 50 % regije prijavljene kao ROH ortogonalnom metodom preklapalo s unijom ROH događaja koje je očitao TruSight Whole Genome. PPA između TruSight Whole Genome Assay i ortogonalne metode bio je 34/34 (100 %) za sve očekivane ROH događaje (\geq 4 Mb).

Točnost heteroplazmatskog mitohondrijskog SNV-a

Točnost očitavanja mtSNV-a procijenjena je u 41 kliničkom uzorku koji je prethodno bio pohranjen u banku dobiven s vanjskih mjesta. Svaki klinički uzorak sadržavao je prethodno prijavljen mtSNV na definiranom mjestu i s definiranim stupnjem heteroplazmije na temelju mtDNA Targeted Known Analysis with Heteroplasmy (Ciljane analize poznatih mtDNK s heteroplazmijom) (MITOP). Učestalosti alela procijenjene pomoću TruSight Whole Genome bile su u visokoj korelaciji s očekivanim učestalostima prema predviđanjima MITOP-a. Svi očekivani mtDNK SNV-ovi su otkriveni, što je rezultiralo s PPA od 100 % (41/41).

Slika 3 TruSight Whole Genome Opažene frekvencije alela mitohondrijskog SNV u odnosu na očekivane frekvencije alela



Dodatna studija točnosti mtSNV-a provedena je pomoću istih 195 uzoraka krvi i referentne metode opisane u studijama točnosti male varijante i CNV-a. Negativan referentni skup definiran je kao pouzdani nevarijantna očitavanja (PASS filter), a pozitivni referentni skup definiran je kao mtSNV očitavanja s frekvencijom alela od > 2,5 %. Pozicije s očitavanjem varijante neprolaznog filtra ili ne-SNV-a bile su isključene. Sažetak točnosti za mtSNV prikazan je u [Tablica 18](#).

Tablica 18 TruSight Whole Genome Točnost mtDNK SNV očitavanja

Metrika točnosti	Pozitivna usklađena s referentnom metodom	Pozitivna isključiva za referentnu metodu	Pozitivna isključiva za test	Negativna usklađena s referentnom metodom	Negativna isključiva za referentnu metodu	Negativna isključiva za test	Vrijednost metrike točnosti (LCL)
PPA	6875	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 % (99,96 %)
TPPV	6875	Nije primjenjivo	6	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	99,91 % (99,83 %)
NPA	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	3171049	24268	20564	99,24 % (99,23 %)

Točnost otkrivanja ekspanzije STR-a

Točnost otkrivanja ekspanzije STR-a temeljila se na ukupno 160 uzoraka pripremljenih ekstrakcijom gDNK iz klinički zahvaćenih pojedinaca s ekspanzijama na specifičnim mjestima potvrđenim PCR-om / Repeat-Primed (RP)-PCR-om ili Southern Blotom izvedenim u laboratoriju CLIA. Pragovi utvrđeni u [Tablica 11](#) korišteni su za definiranje STR statusa alela na određenom lokusu kao normalnog (procijenjena veličina STR-a manja ili jednaka pragu) ili proširenog (veća od praga).

PPA je izračunat korištenjem samo klinički potvrđenih uzoraka, NPA je izračunat korištenjem samo pojedinačnih navodno zdravih uzoraka krvi, a TPPV je izračunat za obje skupine uzoraka. Za alele za koje nije bio dostupan klinički potvrđeni uzorak, PPA se nije mogao izračunati. Osim toga, za alele kod kojih klinički potvrđen uzorak nije bio dostupan i nije bilo lažno pozitivnih očitavanja, TPPV se nije mogao izračunati. NPA je izračunat za sve ekspanzije STR-a. Broj kliničkih uzoraka testiranih za određeno proširenje STR-a i metrika točnosti navedeni su u [Tablica 19](#).

Tablica 19 TruSight Whole Genome Metrike točnosti za ekspanzije STR-a

Ekspanzija STR-a	Testirani klinički uzorci	PPA	TPPV	NPA
AFF2	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>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	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>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 %

Ekspanzija STR-a	Testirani klinički uzorci	PPA	TPPV	NPA
ATXN7_GCC	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
ATXN8OS	0	Nije primjenjivo	0,00 %	99,74 %
ATXN8OS_CTA	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
C9ORF72	21	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
CACNA1A	5	>99,99 %	83,33 %	99,74 %
CBL	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
CNBP	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
CNBP_CA	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
CNBP_CAGA	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
CSTB	0	Nije primjenjivo	0,00 %	99,74 %
DIP2B	0	Nije primjenjivo	0,00 %	99,74 %
DMPK	42	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
FMR1	47	>99,99 %	>99,99 %	>99,99 %
FXN	0	Nije primjenjivo	0,00 %	99,74 %
FXN_A	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
GLS	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
HTT	10	>99,99 %	83,33 %	99,49 %
HTT_CCG	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
JPH3	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
NIPA1	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
NOP56	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
NOP56_CGCCTG	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
NOTCH2NL	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
PABPN1	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
PHOX2B	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
PPP2R2B	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
TBP	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
ALL (Sve)	160	98,12 %	92,35 %	99,94 %

Procjena ukupnog PPA otkrivanja ekspanzije STR-a po svim lokusima predstavlja dobru aproksimaciju PPA specifičnog za lokus korištenjem dostupnih kliničkih uzoraka. Procjena PPA posebno za lokus FMR1 može poslužiti kao donja granica za PPA lokusa koji nisu izravno profilirani zbog njegovog velikog praga za abnormalnost veličine STR-a.

Točnost otkrivanja alela SMN1

Točnost otkrivanja odsutnosti alela C u SMN1 (NM_000344.3:c.840C) procijenjena je u 26 kliničkih uzoraka iz slučajeva s dijagnozom spinalne mišićne atrofije (SMA) i homozigotnim gubitkom egzona 7 u SMN1 potvrđenim digitalnom kapljičnom PCR ili MLPA. Točnost otkrivanja prisutnosti alela SMN1 c.840C procijenjena je u uzorcima krvi navodno zdravih pojedinaca. Svakom uzorku dodijeljena je jedna statistička metrika (True positive (istinski pozitivan) (TP), False positive (lažno pozitivan) (FP), False negative (lažno negativan) (FN) ili True negative (istinski negativan) (TN)) na temelju otkrivene prisutnosti (negativan SMA status) ili odsutnost (pozitivan SMA status) alela C na poziciji c.840 gena SMN1 u usporedbi s očekivanim statusom. Procjene PPA, TPPV i NPA napravljene su i za pozitivan i za negativan skup uzoraka (pogledaj [Tablica 20](#)).

Tablica 20 Metrike točnosti za otkrivanje odsutnosti alela SMN1 c.840C

Metrika točnosti	TP	FP	TN	FN	Vrijednost metrike točnosti
PPA	26	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	0	>99,99 %
TPPV	26	0	Nije primjenjivo	Nije primjenjivo	>99,99 %
NPA	Nije primjenjivo	0	195	Nije primjenjivo	>99,99 %

Ponovljivost

Preciznost unutar laboratorija

Preciznost unutar laboratorija procijenjena je korištenjem ekstrahirane gDNK s različitim poznatim varijantama u genomu. To uključuje mtSNV blizu i znatno iznad LoD-a, uzorke koji sadrže alel SMN1 c.840C i uzorke s FMR i HTT1 ponovljenim ekspanzijama na duljinama blizu i znatno iznad LoD-a. Uzorci su testirani pomoću devet jedinstvenih uvjeta osmišljenih s tri operatera, tri serije reagensa za pripremu biblioteke, tri serije potrošnog materijala za sekvenciranje i tri instrumenta za sekvenciranje.

Svaki je uzorak izveden u duplikatu u istoj obradi kako bi se procijenila varijacija unutar obrade, a svaki testni slučaj testiran je dvaput za dvije obrade po uvjetu za varijacije između obrade. Svaki je uzorak procijenjen pomoću 36 promatranja, a dizajn je omogućio 18 stupnjeva slobode za procjenu ponovljivosti. Popis članova panela, tip uzorka i procijenjene varijante po svakom članu panela prikazan je u [Tablica 21](#). Uzorci 1-4 i 9-12 izvedeni su od muškaraca i žena koji su se sami identificirali kao kavkaskog, afričkog i azijskog podrijetla, kako bi se dobio raznolik skup uzoraka.

Tablica 21 Sastav uzorka panela koji se koristi za ispitivanje preciznosti unutar laboratorija

Ploča	Broj uzorka	Vrsta uzorka	Varijante
A	1	gDNK iz krvi	Male varijante, CNV, ROH, STR nije proširen, prisutnost SMN1 c.840C
	2	gDNK iz krvi	Male varijante, CNV, ROH, STR nije proširen, prisutnost SMN1 c.840C
	3	gDNK iz krvi	Male varijante, CNV, ROH, STR nije proširen, prisutnost SMN1 c.840C
	4	gDNK iz krvi	Male varijante, CNV, ROH, STR nije proširen, prisutnost SMN1 c.840C
	5	Umjetna mješavina gDNK iz krvi	Mitohondrijski SNV-ovi na niskoj razini LoD-a
	6	Umjetna stanična linija NA20241 ¹	STR proširen u FMR1 lokuse na niskoj razini LoD-a
	7	Umjetna stanična linija NA20208	STR proširen u HTT lokuse na niskoj razini LoD-a
	8	Umjetna stanična linija NA23686	Odsutnost SMN1 c.840C
B	9	gDNK iz krvi	Male varijante, CNV, ROH, STR nije proširen, prisutnost SMN1 c.840C
	10	gDNK iz krvi	Male varijante, CNV, ROH, STR nije proširen, prisutnost SMN1 c.840C
	11	gDNK iz krvi	Male varijante, CNV, ROH, STR nije proširen, prisutnost SMN1 c.840C
	12	gDNK iz krvi	Male varijante, CNV, ROH, STR nije proširen, prisutnost SMN1 c.840C
	13	Umjetna mješavina gDNK iz krvi	mtSNV-ovi na visokoj razini LoD-a
	14	Umjetna stanična linija NA07862	STR proširen u FMR1 lokusima na visokoj razini LoD-a
	15	Umjetna stanična linija NA20253	STR proširen u HTT lokusima na visokoj razini LoD-a
	16	Umjetna stanična linija NA03814	Odsutnost SMN1 c.840C

Visoka razina LoD-a: Varijanta učestalosti alela približno 2,0x – 4,0x LoD-a.

Niska razina LoD-a: Varijanta frekvencije alela približno 1,0x – 1,5x LoD-a.

¹ Rezultati za NA20241 nisu objavljeni u konačnim brojevima jer je utvrđeno da je znatno ispod 1,0x LoD-a i stoga nije ispunio zahtjeve uzorka.

U kvalitativnoj procjeni, navodi se metrika ponovljivosti tretirajući varijante kao kvalitativne entitete (varijanta prisutna ili varijanta nije prisutna). Različite definicije pozitivnih ili negativnih očitavanja i različita kvalitativna metrika procijenjeni su i prijavljeni za svaku vrstu varijante (Tablica 22). Pri procjeni ponovljivosti očitavanja male varijante, CNV-a i ROH-a, očitavanja varijanti napravljena u replikatu obrade karakterizacije korištena su za svaki uzorak koji je služio kao usporedna točka za sve ostale replike tog uzorka u studiji.

Tablica 22 Sažetak kvalitativne procjene ponovljivosti za svaku vrstu varijante

Vrsta varijante	pozitivna	Negativna	Vrsta usporedbe	Kvalitativna metrika
Male varijante	Filtri za prolaznost očitavanja varijante	Filtri za prolaznost homozigotnih referentnih očitavanja	Usklađenost sa skupom očitavanja iz početnih obrada karakterizacije	Prosječno pozitivno slaganje (APA) i Prosječno negativno slaganje (ANA)
CNV-ovi	CNV filtri za prolaznost očitavanja	Genomski položaji koji se ne preklapaju s očitavanjem broja kopija prolaznih varijanti	Usklađenost sa skupom očitavanja iz početnih obrada karakterizacije	APA i ANA
ROH	ROH očitavanje	Genomski položaji koji se ne preklapaju s ROH očitavanjem	Usklađenost sa skupom očitavanja iz početnih obrada karakterizacije	APA i ANA
Ekspanzija STR-a	Uzorak s ekspanzijom STR-a u najmanje jednom ciljanom lokusu	Uzorak bez ekspanzija u bilo kojem od ciljanih lokusa	Usklađenost sa statusom uzorka definiranom karakterizacijom uzorka ortogonalnim testom	Postotak pozitivnih očitavanja (PPC) i Postotak negativnih očitavanja (PNC)
Otkrivanje SMN1 c.840C	Uzorak bez C alela na c.840 poziciji SMN1 (SMA pozitivan)	Uzorak koji sadrži najmanje jednu kopiju alela C na poziciji c.840 SMN1 (SMA negativan)	Usklađenost sa statusom uzorka definiranom karakterizacijom uzorka ortogonalnim testom	PPC i PNC
mtSNV	Filtri za prolaznost mitohondrijskog SNV očitavanja	Nevarijantni položaj u filtrima za prolaznost mitohondrijskih kromosoma	Usklađenost s varijantnim i nevarijantnim očitavanjima napravljenim u nerazrijeđenim uzorcima	PPC i PNC

Kvantitativna procjena različitih vrsta varijanti uključivala je procjenu varijabilnosti bilo kvantitativne metrike koja podupire kvalitativna prepoznavanja ili, u slučaju malih varijanti, metrike slaganja u odnosu na referentni skup očitavanja. Ova je studija izvršila procjenu ukupne varijabilnosti kvantitativne metrike u ponavljanjima kao i doprinos različitih čimbenika uključenih u studiju varijabilnosti takve kvantitativne metrike putem Analize komponenti varijance. [Tablica 23](#) sažima kvantitativnu metriku korištenu u analizi svake vrste varijante kao i faktore koji su procijenjeni za doprinos varijabilnosti u kvantitativnoj metrici.

Tablica 23 Sažetak kvantitativne metrike korištene u procjeni preciznosti za različite vrste varijanti

Vrsta varijante	Kvalitativna metrika	Čimbenici procijenjeni za doprinos varijabilnosti
Male varijante	APA i ANA	Operator, komplet za pripremu biblioteke, instrument, serija potrošnog materijala za sekvenciranje, podtip varijante, genomski kontekst
CNV-ovi	Normalizirana dubina pokrivenosti u cijeloj CNV regije	Operator, komplet za pripremu biblioteke, instrument, serija potrošnog materijala za sekvenciranje, varijanta podvrste, varijanta duljine
ROH	ROH rezultat u cijeloj ROH regiji	Operator, komplet za pripremu biblioteke, instrument, serija potrošnog materijala za sekvenciranje, varijanta podvrste, varijanta duljine
Ekspanzija STR-a	Procjena veličine STR-a	Operator, komplet za pripremu biblioteke, instrument, serija potrošnog materijala za sekvenciranje, mjesto STR-a, duljina STR-a
Otkrivanje SMN1 c.840C	Log-likelihood ratio za prisutnost referentnog alela (C) na ciljanoj poziciji	Operator, serija kompleta za pripremu biblioteke, instrument, serija potrošnog materijala za sekvenciranje, SMA status
Mitohondrijski SNV	Učestalost frekvencije alela	Operator, serija kompleta za pripremu biblioteke, instrument, serija potrošnog materijala za sekvenciranje, pozicija varijante, očekivana frekvencija alela varijante

Rezultati analize komponenti varijance prikazani su u [Tablica 24](#). Za male varijante, većina varijance pripisana je rezidualnoj pogrešci i nije objašnjena čimbenicima povezanim s ispitivanjem uključenim u dizajn, uključujući seriju kompleta za sekvenciranje, instrument za sekvenciranje, seriju kompleta za pripremu biblioteke, operatera i od obrade do obrade. Jedina iznimka primijećena je za SNV u srednjim regijama pouzdanosti za koje je većina varijance pripisana seriji kompleta za sekvenciranje. Općenito, veća količina varijance pripisana je čimbenicima povezanim s testom za male varijante u regijama genoma niske pouzdanosti. Za sve druge vrste varijanti, većina varijance pripisana je rezidualnoj pogrešci, a ne faktorima povezanim s testom. Ova studija pokazuje da se za većinu malih varijantnih podtipova, filtriranje za regije visoke i srednje pouzdanosti u genomu može koristiti za povećanje ponovljivosti i smanjenje varijabilnosti testa. [Vanjska ponovljivost na stranici 68](#) pruža sveobuhvatnu analizu ponovljivosti testa.

Tablica 24 Rezultati ispitivanja analize komponenata varijance

Metrika	Podtipovi varijanti	Razina pouzdanosti	Rezidualni	Serija kompleta za sekvenciranje	Od obrade do obrade	Instrument	Komplet za pripremu biblioteke	Rukovatelj
APA	Kratko brisanje (1-5 bp)	Visoka	79,36 %	17,52 %	0,00 %	0,00 %	3,13 %	0,00 %
		Srednja	76,97 %	18,59 %	1,53 %	0,00 %	2,91 %	0,00 %
		Niska	67,85 %	24,87 %	4,4 %	0,00 %	2,88 %	0,00 %
	Srednje brisanje (6-15 bp)	Srednja	61,17 %	29,06 %	7,42 %	0,00 %	2,35 %	0,00 %
		Niska	59,33 %	31,76 %	6,38 %	0,17 %	2,35 %	0,00 %
	Dugo brisanje (16-31 bp)	Srednja	52,93 %	33,72 %	11,67 %	0,17 %	1,51 %	0,00 %
		Niska	49,10 %	37,01 %	11,08 %	1,42 %	1,39 %	0,00 %
	Kratko umetanje (1-5 bp)	Visoka	89,93 %	7,32 %	1,76 %	0,00 %	0,99 %	0,00 %
		Srednja	74,52 %	19,96 %	3,44 %	0,00 %	2,08 %	0,00 %
		Niska	60,64 %	29,72 %	8,49 %	0,00 %	1,15 %	0,00 %
	Srednje umetanje (6-15 bp)	Srednja	81,76 %	15,78 %	0,00 %	0,00 %	2,41 %	0,06 %
		Niska	51,28 %	35,07 %	12,07 %	0,00 %	1,58 %	0,00 %
	Dugo umetanje (16-31 bp)	Srednja	87,59 %	9,83 %	1,18 %	0,00 %	1,40 %	0,00 %
		Niska	52,47 %	35,32 %	10,14 %	0,23 %	1,85 %	0,00 %
	SNV	Visoka	78,01 %	17,45 %	0,00 %	0,13 %	1,23 %	3,17 %
		Srednja	79,71 %	16,95 %	0,77 %	0,20 %	1,29 %	1,09 %
		Niska	56,63 %	36,08 %	6,97 %	0,22 %	0,00 %	0,09 %

Metrika	Podtipovi varijanti	Razina pouzdanosti	Rezidualni	Serijska kompleta za sekvenciranje	Od obrade do obrade	Instrument	Komplet za pripremu biblioteke	Rukovatelj
ANA	SNV	Visoka	55,07 %	21,84 %	21,07 %	1,80 %	0,21 %	0,00 %
		Srednja	28,53 %	49,08 %	20,11 %	1,27 %	1,00 %	0,00 %
		Niska	51,78 %	36,04 %	9,76 %	2,42 %	0,00 %	0,00 %

Metrika	Podtipovi varijanti	Razina pouzdanosti	Rezidualni	Serijski kompleti za sekvenciranje	Od obrade do obrade	Instrument	Kompleti za pripremu biblioteke	Rukovatelj
Dubina	CNV GAIN (Dobitak CNV-a) (10 kbp, 25 kbp)	Nije primjenjivo	73,28 %	2,87 %	0,00 %	0,00 %	1,01 %	0,00 %

Metrika	Podtipovi varijanti	Razina pouzdanosti	Rezidualni	Serijska kompleta za sekvenciranje	Od obrade do obrade	Instrument	Komplet za pripremu biblioteke	Rukovatelj
	CNV GAIN (Dobitak CNV-a) (25 kbp, 50 kbp)	Nije primjenjivo	72,99 %	5,25 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,56 %

Metrika	Podtipovi varijanti	Razina pouzdanosti	Rezidualni	Serijski kompleti za sekvenciranje	Od obrade do obrade	Instrument	Komplet za pripremu biblioteke	Rukovatelj
	CNV GAIN (Dobitak CNV-a) (50 kbp, 100 kbp)	Nije primjenjivo	66,40 %	5,16 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Metrika	Podtipovi varijanti	Razina pouzdanosti	Rezidualni	Serijski kompleti za sekvenciranje	Od obrade do obrade	Instrument	Komplet za pripremu biblioteke	Rukovatelj
	CNV GAIN (Dobitak CNV-a) (100 kbp, 500 kbp)	Nije primjenjivo	43,51 %	14,92 %	14,01 %	0,20 %	0,00 %	15,72 %
	CNV LOSS (Gubitak CNV-a) (10 kbp, 25 kbp)	Nije primjenjivo	83,41 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV LOSS (Gubitak CNV-a) (25 kbp, 50 kbp)	Nije primjenjivo	84,67 %	1,20 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV LOSS (Gubitak CNV-a) (50 kbp, 100 kbp)	Nije primjenjivo	84,16 %	2,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV LOSS (Gubitak CNV-a) (100 kbp, 500 kbp)	Nije primjenjivo	81,25 %	5,22 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,55 %

Metrika	Podtipovi varijanti	Razina pouzdanosti	Rezidualni	Serijski kompletnost za sekvenciranje	Od obrade do obrade	Instrument	Komplet za pripremu biblioteke	Rukovatelj
Rezultat u regiji	ROH (1 kbp, 10 kbp)	Nije primjenjivo	74,32 %	1,65 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,52 %
	ROH (10 kbp, 25 kbp)	Nije primjenjivo	84,78 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (25 kbp, 50 kbp)	Nije primjenjivo	84,92 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (50 kbp, 100 kbp)	Nije primjenjivo	85,63 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (100 kbp, 500 kbp)	Nije primjenjivo	85,76 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH \geq 500 kbp	Nije primjenjivo	84,81 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Metrika	Podtipovi varijanti	Razina pouzdanosti	Rezidualni	Serijski kompleti za sekvenciranje	Od obrade do obrade	Instrument	Komplet za pripremu biblioteke	Rukovatelj
Procjena veličine za STR lokuse ¹	AFF2	Nije primjenjivo	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Metrika	Podtipovi varijanti	Razina pouzdanosti	Rezidualni	Serijska kompleta za sekvenciranje	Od obrade do obrade	Instrument	Komplet za pripremu biblioteke	Rukovatelj
	ATXN7	Nije primjenjivo	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Metrika	Podtipovi varijanti	Razina pouzdanosti	Rezidualni	Serijska kompleta za sekvenciranje	Od obrade do obrade	Instrument	Komplet za pripremu biblioteke	Rukovatelj
	ATXN7_GCC	Nije primjenjivo	99,43 %	0,57 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP	Nije primjenjivo	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP_CA	Nije primjenjivo	95,45 %	4,55 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CSTB	Nije primjenjivo	96,45 %	0,87 %	2,57 %	0,00 %	0,00 %	0,11 %
	DIP2B	Nije primjenjivo	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	FMR1	Nije primjenjivo	71,02 %	10,06 %	0,00 %	17,33 %	0,64 %	0,95 %
	FXN_A	Nije primjenjivo	94,52 %	1,37 %	0,00 %	1,37 %	1,37 %	1,37 %
	HTT	Nije primjenjivo	82,23 %	0,00 %	11,99 %	3,81 %	0,00 %	1,97 %
	HTT_CCG	Nije primjenjivo	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	NOTCH2NL	Nije primjenjivo	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,29 %	0,29 %	0,00 %
	TBP	Nije primjenjivo	90,91 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Metrika	Podtipovi varijanti	Razina pouzdanosti	Rezidualni	Serija kompleta za sekvenciranje	Od obrade do obrade	Instrument	Komplet za pripremu biblioteke	Rukovatelj
Log likelihood ratio	c.840C u NA03814	Nije primjenjivo	65,71 %	18,98 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	15,32 %
	c.840C u NA23686	Nije primjenjivo	87,64 %	0,00 %	0,00 %	5,90%	0,00 %	6,46 %
VAF	mtSNV-ovi u blizini LOD-a	Nije primjenjivo	83,13 %	0,37 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,05 %

¹ Analiza komponenti varijance nije provedena za lokuse za koje nije primijećena varijanca.

Priložene upute

Vanjska ponovljivost

Vanjska ponovljivost određena je pomoću jedne serije reagensa za pripremu biblioteke i sekvenciranje na tri vanjske probne lokacije s dva rukovatelja na svakoj lokaciji. Isti uzorci korišteni u ispitivanju [Preciznost unutar laboratorija na stranici 53 \(Tablica 21\)](#) upotrijebljeni su u ispitivanju ponovljivosti uz jednu iznimku: uzorak NA20241 zamijenjen je s NA20239 za procjenu širenja FMR1 loci STR pri niskom LoD-u. Ukupno je 16 jedinstvenih uzoraka testirano kao dva podpanela od po osam jedinstvenih uzoraka (Panel A i Panel B) od strane svakog rukovatelja na svakom mjestu. Izvedene su tri obrade sekvenciranjem za duplicirane biblioteke svake pod-panele za ukupno 36 obrade sekvenciranjem po jedinstvenom uzorku.

Stopa prolaznosti uzorka u 576 biblioteka uzoraka s važećim obradama sekvenciranjem, definirana kao broj uzoraka koji su prošli metriku kontrole kvalitete biblioteke uzoraka u prvom pokušaju, bila je 99,1 % (571/576; 95 % CI: 98,0 %, 99,6 %). Svi rezultati testiranja odnose se na početno testiranje.

Reproducibilnost SNV-ova, umetanja, brisanja, CNV-ova i ROH-a procijenjena je usporedbom podataka s referentnim skupom očitavanja na temelju uobičajene učinkovitosti u tri obrade karakterizacije ([Tablica 25](#) i [Tablica 26](#)). Ponovljivost ekspanzija STR-a, odsutnost alela SMN1 c.840C i mtSNV-ova procijenjena je usporedbom podataka s poznatim statusom ([Tablica 27](#)).

Tablica 25 Ponovljivost TruSight Whole Genome za SNV-ove, CNV-ove i ROH

Vrsta varijante – stratifikacija	Usklađena pozitivna očitavanja ¹ / Pozitivna očitavanja ²			Prosječno pozitivno slaganje (%) (95 % CI) ³
	1. lokacija	2. lokacija	3. lokacija	
Male varijante (visoka pouzdanost)				
SNV-ovi	687.996.150 /	666.509.635 /	688.001.697 /	99,9
	688.770.402	667.253.493	688.766.887	(99,9 - 99,9)
Umetanje — 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)
Brisanje — 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)
Male varijante (srednja pouzdanost)				
SNV-ovi	42.238.226 /	40.920.370 /	42.236.751 /	98,8
	42.737.228	41.391.560	42.725.827	(98,8-98,9)
Umetanje — 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)
Umetanje — 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)
Umetanje — ≥ 16 bp	611.952 /	593.114 /	612.222 /	96,8
	632.214	612.877	632.498	(96,8 – 96,8)
Brisanje — 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)
Brisanje — 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)
Brisanje — ≥ 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)
Male varijante (niska pouzdanost)				
SNV-ovi	78.507.103 /	76.365.789 /	78.863.977 /	81,2
	96.859.682	94.066.720	97.058.652	(81,2 - 81,2)

Vrsta varijante – stratifikacija	Usklađena pozitivna očitavanja ¹ / Pozitivna očitavanja ²			Prosječno pozitivno slaganje (%) (95 % CI) ³
	1. lokacija	2. lokacija	3. lokacija	
Umetanje — 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)
Umetanje — 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)
Umetanje — ≥ 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)
Brisanje — 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)
Brisanje — 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)
Brisanje — ≥ 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-ovi — dobici ≥ 10 kbp	7.883 /	7.664 /	7.916 /	95,5
	8.275	8.012	8.282	(95,2 - 95,8)
CNV-ovi – gubici ≥ 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 Ukupan broj usklađenih pozitivnih očitavanja = Query Concordant Positive (pozitivni usklađen s upitom) (QCP) + Reference Concordant Positive (pozitivni usklađen s referencom) (RCP).

² Ukupan broj pozitivnih očitavanja = Query Concordant Positive (pozitivni usklađen s upitom) (QCP) + Query Exclusive Positive (pozitivni isključiv za upit) (QEP) + Reference Concordant Positive (pozitivni usklađeni s referencom) (RCP) + Reference Exclusive Positive (pozitivni isključiv za referencu) (REP).

³ 2-strani 95% interval pouzdanosti izračunat metodom Wilson Score.

Tablica 26 Ponovljivost TruSight Whole Genome za ANA SNV-ova, CNV-ova i ROH-a

Vrsta varijante – stratifikacija	Usklađena negativna očitavanja ¹ / Negativna očitavanja ²			Prosječno negativno slaganje (%) (95 % CI) ³
	1. lokacija	2. lokacija	3. lokacija	
Male varijante (visoka pouzdanost)	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)
Male varijante (srednja pouzdanost)	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)
Male varijante (niska pouzdanost)	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-ovi — dobici ≥ 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-ovi – gubici ≥ 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 Ukupan broj usklađenih negativnih očitavanja = 2 × Concordant Negative (usklađeni negativni) (CN).

² Ukupan broj negativnih očitavanja = 2 × Concordant Negative (usklađeni negativni) (CN) + Reference Exclusive Negative (negativnih isključivih za referencu) (REN) + Query Exclusive Negative (negativni isključivi za upit) (QEN).

³ 2-strani 95% interval pouzdanosti izračunat metodom Wilson Score.

Tablica 27 Ponovljivost TruSight Whole Genome STR, SMN1 i mtSNV

Vrsta varijante – stratifikacija	Ukupna očekivana pozitivna očitavanja	Pozitivna očitavanja			Ukupna očekivana negativna očitavanja	Negativna očitavanja			Postotak pozitivnih očitavanja (95 % CI) ¹	Postotak negativnih očitavanja (95 % CI) ¹
		1. lokacija	2. lokacija	3. lokacija		1. lokacija	2. lokacija	3. lokacija		
STR ekspanzije - Visoka razina detekcije (2x-4x LOD)										
STR ekspanzije - FMR1	35	12	11	12	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	100 (90,1-100)	Nije primjenji vo
STR ekspanzije - HTT	36	12	12	12	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	100 (90,4-100)	Nije primjenji vo
STR ekspanzije – FMR1 i HTT zajedno	71	24	23	24	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	100 (94,9-100)	Nije primjenji vo
STR ekspanzije - niska razina detekcije (1x-1,5x LOD)										
STR ekspanzije - FMR1	36	11	10	11	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	88,9 (74,7-95,6)	Nije primjenji vo
STR ekspanzije - HTT	36	12	12	12	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	100 (90,4-100)	Nije primjenji vo

Vrsta varijante – stratifikacija	Ukupna očekivana pozitivna očitavanja	Pozitivna očitavanja			Ukupna očekivana negativna očitavanja	Negativna očitavanja			Postotak pozitivnih očitavanja (95 % CI) ¹	Postotak negativnih očitavanja (95 % CI) ¹
		1. lokacija	2. lokacija	3. lokacija		1. lokacija	2. lokacija	3. lokacija		
STR ekspanzije – FMR1 i HTT zajedno	72	23	22	23	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	94,4 (86,6-97,8)	Nije primjenji vo
STR ekspanzije – Kombinacija 28 glavnih ciljnih STR lokusa	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	Nije primjenji vo	285	96	93	96	Nije primjenji vo	100 (98,7-100)
Odsutnost SMN1 c.840C	71	24	24	23	285	96	93	96	100 (94,9-100)	100 (98,7-100)
mtSNVs – visoka razina (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)
mtSNVs – niska razina (1x-1,5x LOD)	1080	360	359	360	457.524	152.481	152.489	152.483	99,9 (99,5-99,9)	> 99,9 (> 99,9-> 99,9)

¹ Dvostrani interval pouzdanosti od 95 % izračunat metodom Wilson Score.

Otklanjanje poteškoća

Pomoću sljedeće tablice riješite probleme u tijeku rada. Ako obrada sekvenciranjem ili priprema biblioteke za uzorak ne uspije dva puta, možda će biti potrebno dodatno rješavanje problema. Obratite se Illumina tehničkoj podršci.

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Problem sa stvaranjem obrade	Povezana Planned arun (Planirana obrada) ne može se ručno odabrati u NovaSeq 6000Dx Control Software nakon učitavanja potrošnog materijala	Netočan ID epruvete biblioteke naveden je tijekom planiranja obrade	Pogledajte Reviziju obrade u TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (broj dokumenta 200049931).

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Problem sa sekvenciranjem	Status greške sekvenciranja u Illumina Run Manager	Sekvenciranje je prekinuto ili nije dovršeno zbog NovaSeq 6000Dx ili problema s rukovanjem potrošnim materijalom sekvenciranja	<p>Pogledajte Dokumentacija proizvoda NovaSeq 6000Dx Instrument (broj dokumenta: 200010105).</p> <p>Nakon rješavanja problema, biblioteka se može ponovno objediniti i ponovno pratiti do jednog puta (zbog volumena).</p>
		<p>Obrada je dovršena, ali grupiranje nije uspjelo. Mogući NovaSeq 6000Dx problem, problem s rukovanjem potrošnim materijalom sekvenciranja ili katastrofalni neuspjeh pripreme biblioteke zbog problema s rukovanjem reagensima ili pogreške operatera (npr. preskočen korak ili odbačen umjesto prenesenog supernatanta tijekom odabira veličine)</p>	<p>Procijenite prinose pojedinačne biblioteke u FLP pomoću qPCR-a za $\geq 0,94$ nM (pretpostavite veličinu umetka od 450 bp) kako biste odredili in/out pripremu biblioteke u odnosu na probleme povezane sa sekvenciranjem.</p> <p>Ako se problemi s pripremom biblioteke isključe i ako se sumnja na problem povezan s sekvenciranjem, pogledajte Dokumentacija proizvoda NovaSeq 6000Dx Instrument (broj dokumenta: 200010105).</p> <p>Ako sumnjate na problem s pripremom biblioteke, pogledajte Savjeti i tehnike na stranici 12 i Upute za upotrebu na stranici 15 prije ponavljanja pripreme i sekvenciranja biblioteke. Ako dođe do ponovljenih grešaka, obratite se Illumina tehničkoj podršci.</p>

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Podaci dobiveni sekvenciranjem ne prenose se na poslužitelj	Slijed prijenosa datoteka za status neuspješne analize u Illumina Run Manager	Problem s mrežnom vezom ili prekid napajanja instrumenta ili poslužitelja dogodio se tijekom prijenosa podataka obrade	<p>Provjerite postoji li prekid napajanja ili gubitak mrežne veze instrumenta. Pričekajte da sustav bude u stanju mirovanja (dovršetak sekvenciranja), zatim idite na postavke instrumenta, IVD POSTAVKE kako biste potvrdili vezu s navedenom izlaznom lokacijom pomoću funkcije pregledavanja.</p> <p>Ako je potrebno daljnje rješavanje problema, pogledajte Dokumentacija proizvoda NovaSeq 6000Dx Instrument (broj dokumenta: 200010105). Ako se nakon rješavanja problema s vezom ili napajanjem prijenos datoteke ne pokrene ponovno i ne dovrši, obratite se Illumina tehničkoj podršci.</p>

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Analiza se ne može pokrenuti	Status analize nije započeo u Illumina Run Manager iako je prijenos datoteke sekvenciranja za analizu završen	Uparivanje ili veza između instrumenta i izgubljen DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx ili DRAGEN istekla licenca.	<p>Pričekajte da sustav bude u stanju mirovanja (sekvenciranje se završi), zatim idite na DRAGEN da potvrdite da je DRAGEN licenca važeća. Ako je licencija istekla, kontaktirajte Illumina. Ako je licenca valjana, odaberite Run Self-Test (Pokreni samotestiranje). Ako test ne uspije ili ako opcija pokretanja samotestiranja nije dostupna, prijavite se na Instrument kako biste provjerili postoji li pogreška povezana s uparivanjem poslužitelja. Pogledajte odjeljak Konfiguracija sustava u Dokumentacija proizvoda NovaSeq 6000Dx Instrument (broj dokumenta: 200010105).</p> <p>Analiza bi se trebala automatski pokrenuti nakon rješavanja problema. Izađite iz stranice i idite na karticu Active Runs (Aktivni cikusi) kako biste potvrdili da je analiza u tijeku. Ako se problem nastavi pojavljivati, obratite se Illumina.</p>

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Analiza se zaglavljuje	Status analize u tijeku u Illumina Run Manager puno dulje od očekivanog	Mrežna povezanost ili napajanje instrumenta ili poslužitelja možda je prekinuto tijekom analize što je uzrokovalo zaglavljivanje analize	<p>Otkazite analizu i provjerite postoji li prekid napajanja ili gubitak mrežne povezanosti instrumenta.</p> <p>Pričekajte da sustav bude u stanju mirovanja (sekvenciranje dovršeno), zatim idite na Instrument Settings (Postavke instrumenta) (IVD SETTINGS) i potvrdite povezanost s navedenom izlaznom lokacijom. Ako je potrebno daljnje rješavanje problema, pogledajte Dokumentacija proizvoda NovaSeq 6000Dx Instrument (broj dokumenta: 200010105).</p> <p>Nakon rješavanja problema, Requeue analysis (ponovno stavite analizu u red čekanja) bez promjena. Pogledajte TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (broj dokumenta 200049931).</p>

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Datoteke analize se ne prenose	Status prijena datoteke analize u pohranu nije uspio u Illumina Run Manager	Problem s mrežnom vezom ili prekid napajanja instrumenta ili poslužitelja dogodio se tijekom prijena datoteke analize	<p>Otkazite analizu i provjerite postoji li prekid napajanja ili gubitak mrežne povezanosti instrumenta.</p> <p>Pričekajte da sustav bude u stanju mirovanja (sekvenciranje dovršeno), zatim idite na Instrument Settings (Postavke instrumenta) (IVD SETTINGS) i potvrdite povezanost s navedenom izlaznom lokacijom. Ako je potrebno daljnje rješavanje problema, pogledajte Dokumentacija proizvoda NovaSeq 6000Dx Instrument (broj dokumenta: 200010105).</p> <p>Nakon rješavanja problema, Requeue analysis (ponovno stavite analizu u red čekanja) bez promjena. Pogledajte TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (broj dokumenta 200049931).</p>
Analiza ne uspijeva na ponovnom čekanju	Analiza nije uspjela nakon ponovnog čekanja	Ako se analiza ponovno stavlja u red čekanja, izvorna obrada je možda izbrisana ili arhivirana i više nije na lokaciji navedenoj za lokaciju vanjske pohrane	Provjerite je li izvorna obrada još uvijek na vanjskoj lokaciji za pohranu. Ako je arhivirana, preuzmite je iz arhive i ponovno stavite analizu u red čekanja.

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Sequencing QC fails (Kontrola kvalitete sekvenciranja nije uspjela)	Sažetak rezultata FAIL (neuspješno) kontrole kvalitete sekvenciranja u konsolidiranom izvješću	„Ukupni % \geq Q30” ispod analitičke specifikacije zbog pogrešnog rukovanja potrošnim materijalom za sekvenciranje (neuspjeh potpunog odmrzavanja ili preokretanja za miješanje nakon odmrzavanja)	Pogledajte Dokumentacija proizvoda NovaSeq 6000Dx Instrument (broj dokumenta: 200010105). Nakon rješavanja problema, biblioteka se može ponovno objediniti i ponovno pratiti do jednog puta (zbog volumena).
Kontrola kvalitete FASTQ ne uspijeva za sve uzorke	Sažetak rezultata kontrole kvalitete FASTQ i sažetak rezultata kontrole kvalitete biblioteke uzoraka FAIL (Neuspješno), s pojedinačnim rezultatima metrike kontrole kvalitete biblioteke prijavljenima kao ND, za sve uzorke u konsolidiranom izvješću s sažetak rezultata kontrole kvalitete sekvenciranja PASS (Uspješno)	Index Adapter Kit naveden tijekom Create Run (Stvaranje obrade) nije usklađen s onim koji je korišten tijekom pripreme biblioteke	Pregledajte uzorke kako biste pregledali informacije indeksa korištene u analizi u IRM. Ako je potrebna korekcija, pogledajte Requeue Analysis (Ponovo postavi analizu u red čekanja) u TruSight Whole Genome Analysis Application Guide (broj dokumenta 200049931).

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Kontrola kvalitete FASTQ bila je neuspješna za jedan ili više uzoraka u odsutnosti niskog prinosa obrade; neindeksirani Total Yield (ukupni prinos) (GB) \geq 2800 GB na S4 ili \geq 1000 GB na S2	Summary FASTQ QC Result (Sažetak rezultata kontrole kvalitete FASTQ) i Summary Sample Library QC FAIL (Sažetak neuspjeha kontrole kvalitete biblioteke uzoraka), s pojedinačnim rezultatima metrike kontrole kvalitete biblioteke zabilježenim kao ND, za jedan ili više, ali ne sve uzorke u konsolidiranom izvješću bez niskog prinosa obrade	Pogreške uporabe tijekom pripreme ili objedinjavanja biblioteke	<p>Procijenite preostali volumen(e) u konačnoj ploči biblioteke (FLP) kako biste potvrdili pogrešku upotrebe izostavljanja uzoraka iz objedinjenih biblioteka. Volumen omogućuje operateru ponovno objedinjavanje i ponovno sekvenciranje do jednog puta. Alternativno, ponovno ubacite neuspjele uzorke u sljedeću seriju pripreme biblioteke i pokrenite nakon pregleda Upute za upotrebu na stranici 15.</p> <p>Po izboru, procijenite prinose pojedinačne biblioteke u FLP pomoću qPCR-a za \geq 0,94 nM (pretpostavite veličinu umetka od 450 bp) da biste isključili probleme povezane s pripremom biblioteke. Ponovno stavite neuspjele uzorke u sljedeću pripremnu seriju biblioteke i obradite nakon pregledavanja Upute za upotrebu na stranici 15.</p> <p>Ne preporučuje se objedinjavanje biblioteka kroz serije za pripremu biblioteka zbog fluktuacija prinosa od serije do serije što može rezultirati većim %CV i većom incidencijom neuspjeha "Average autosomal coverage" (Prosječne autosomne pokrivenosti).</p>

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
FASTQ QC ne uspijeva za neke ne sve uzorke s niskim prinosom; Neindeksirani ukupni prinos (GB) nizak, < 2,800 GB na S4 ili < 1,000 GB na S2	Summary FASTQ QC Result (Sažetak rezultata kontrole kvalitete FASTQ) i Summary Sample Library QC FAIL (Sažetak neuspjeha kontrole kvalitete biblioteke uzoraka), s pojedinačnim rezultatima mjernih podataka kontrole kvalitete biblioteke zabilježenim kao ND, za jedan ili više, ali ne sve uzorke u konsolidiranom izvješću s niskim prinosom obrade	Može ukazivati na problem s pripremom biblioteke ili sekvenciranjem	<p>Procijenite prinose pojedinačne biblioteke u FLP pomoću qPCR-a za $\geq 0,94$ nM (pretpostavite veličinu umetka od 450 bp) kako biste uzeli u obzir/isključili probleme vezane uz pripremu biblioteke u odnosu na sekvenciranje.</p> <p>Ako sumnjate na problem sa sekvenciranjem, pogledajte odjeljak Dokumentacija proizvoda NovaSeq 6000Dx Instrument (broj dokumenta: 200010105). Nakon rješavanja problema, biblioteke se mogu ponovno objediniti i ponovno pratiti do jednog puta (zbog ograničenog volumena).</p> <p>Ako sumnjate na problem s pripremom biblioteke, pogledajte Savjeti i tehnike na stranici 12 i Upute za upotrebu na stranici 15 prije ponavljanja pripreme i sekvenciranja biblioteke. Ako dođe do ponovljenih grešaka, obratite se Illumina tehničkoj podršci.</p>

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Kontrola kvalitete biblioteke nije uspjela zbog niske pokrivenosti	Summary Sample Library QC Result (Sažetak rezultata kontrole kvalitete biblioteke) naveden je kao FAIL (neuspješan) zbog prosječne autosomne pokrivenosti i/ili postotka autosoma s pokrivenošću većom od 20X i/ili prosječne mitohondrijske pokrivenosti genoma koji ne prolaze analitičku specifikaciju	Problem(i) s kvalitetom uzorka ili pripremom biblioteke	<p>Provedite ponovnu kvantifikaciju s kontrolama procesa kako biste isključili probleme povezane s unosom DNK.</p> <p>Pregledajte Savjeti i tehnike na stranici 12 i Upute za upotrebu na stranici 15 prije ponovnog stavljanja neuspjelih uzoraka u sljedeću pripremnu seriju biblioteke i obrade. Ako dođe do ponovljene greške (grešaka) za isti uzorak (uzorke), to može ukazivati na problem(e) kvalitete uzorka.</p> <p>Ako se opet primijeti greška, ali s drugim uzorcima, to može ukazivati na problem vezan uz pripremu biblioteke koji se odnosi na operatera, reagens, potrošni materijal ili opremu. Ako se problem ne riješi, obratite se Illumina tehničkoj podršci.</p>

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Kontrola kvalitete biblioteke nije uspjela na temelju pristranosti GC-a	Summary Sample Library QC Result (Sažetak rezultata kontrole kvalitete biblioteke) naveden je kao FAIL (neuspješan) za jedan ili više uzoraka u konsolidiranom izvješću zbog normaliziranog pokrivanja na 60 % do 79 % GC spremnika i/ili normaliziranog pokrivanja na 20 % do 39 % GC spremnika koji ne prolaze analitičku specifikaciju	Prekomjerno ELM prenošenje ili preskočeno pranje uzrokuje GC pristranost u pokrivenosti	Pregledajte Savjeti i tehnike na stranici 12 i Upute za upotrebu na stranici 15 prije ponovnog stavljanja neuspjelog uzorka (neuspjelih uzoraka) u sljedeću pripremnu seriju biblioteke i obrade.
Kontrola kvalitete biblioteke nije uspjela na temelju kontaminacije za jedan ili više, ali ne za sve uzorke u obradi	Summary Sample Library QC Result (Sažetak rezultata kontrole kvalitete biblioteke) naveden je kao FAIL (neuspješan) za jedan ili više, ali ne za sve uzorke u Konsolidiranom izvješću jer procijenjena kontaminacija uzorka ne prolazi analitičku specifikaciju	Kontaminirani uzorak (uzorci) ili nisu promijenjeni vrhovi tijekom pripreme uzorka ili biblioteke	Pregledajte Savjeti i tehnike na stranici 12 i Upute za upotrebu na stranici 15 prije ponovnog stavljanja neuspjelog uzorka (neuspjelih uzoraka) u sljedeću pripremnu seriju biblioteke i obrade. Ako dođe do ponovljenih grešaka za isti uzorak(e), uzorak DNK može biti kontaminiran.

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Kontrola kvalitete biblioteke nije uspjela na temelju kontaminacije za sve uzorke u obradi	Summary Sample Library QC Result (Sažetak rezultata kontrole kvalitete biblioteke) naveden je kao FAIL (neuspješan) za sve uzorke u Konsolidiranom izvješću jer procijenjena kontaminacija uzorka ne prolazi analitičku specifikaciju	Kontaminirani reagens ili nisu promijenjeni vrhovi tijekom razrjeđivanja uzorka ili pripreme biblioteke	Pregledajte Savjeti i tehnike na stranici 12 za izbjegavanje kontaminacije. Ponovno stavite neuspjele uzorke na čekanje za sljedeću pripremnu seriju biblioteke i pokrenite pomoću svježih razrjeđenja uzoraka i kompleta za pripremu biblioteke.
Sažetak rezultata ploidnosti	Sažetak rezultata ploidnosti, prijavljen kao ND (nije utvrđen) u konsolidiranom izvješću.	Spol je naveden kao nepoznat tijekom stvaranja obrade DRAGEN izvijestio je o rezultatu spolne ploidnosti koji nije XX ili XY, kao što je XO ili XXY	Potvrdite da je „Navedena ploidnost spolnih kromosoma” u Konsolidiranom izvješću bila „Nepoznata”. Preporuča se navesti spol kao „Muški” ili „Ženski” u uzorcima podataka kada je poznat tijekom Create Run (Stvori obradu). Pregled izlaza „Ploidy estimation” (Procjene ploidnosti) od strane DRAGEN u konsolidiranom izvješću.

Vrsta tkiva	Promatranje	Mogući Uzrok	Preporučena Radnja
Sažetak rezultata ploidnosti DISCORDANT (Neusklađen)	Sažetak rezultata ploidnosti prijavljen je kao DISCORDANT (Neusklađen) u konsolidiranom izvješću.	Potencijalni problem s zamjenom uzorka	Pregledajte da biste potvrdili da su podaci o uzorku uneseni tijekom Create Run (Stvori obradu) točni. Ako su netočni, ponovno stavite analizu u red s promjenama. Ako su ispravni, a sumnja se na problem zamjene uzoraka, preporučuje se ponovno staviti uzorak(e) DISCORDANT (Neusklađen) u sljedeću pripremnu seriju biblioteke i obraditi kako bi se izbjeglo prijavljivanje pogrešnih rezultata. Softver za uzorke ne nameće grešku za uzorak s Sažetak rezultata ploidnosti DISCORDANT (Neusklađen).

Reference

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. travnja 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. veljače 2010. PMID: 20179748; PMCID: PMC2987480.
8. Perlman S. Hereditary Ataxia Overview. 28. listopada 1998. [ažurirano 16. studenog 2023.]. U: 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, DNK methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Mol Psychiatry.* 2016;21(8):1112-24. doi: 10.1038/mp.2015.159. Epub 20. listopada 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. rujna 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. studenog 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. svibnja 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. rujna 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. rujna 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 u: *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. lipnja 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. travnja 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. srpnja 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. srpnja 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. ožujka 2003. PMID: 12640453.

Dodatak A

Komplet indeksa S4 1

ID jažice indeksne ploče	Naziv indeksa	Baze i7	Baze 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
G01	UDP0043	CCATCTCGCC	TTCTATGGTT
H01	UDP0044	CTGCGAGCCA	AATCCGGCCA
A02	UDP0065	TAATGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA
G02	UDP0071	CTTGTACACC	AAGCGCGCTT
H02	UDP0072	ACACAGGTGG	TGAGCGTTGT

Komplet indeksa S4 2

ID jažice indeksne ploče	Naziv indeksa	Baze i7	Baze i5
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT

ID jažice indeksne ploče	Naziv indeksa	Baze i7	Baze i5
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC
G03	UDP0087	CCTCTACATG	GATACCTCCT
H03	UDP0088	GGAGCGTGTA	ATCCGTAAGT
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG
G04	UDP0095	GTATTCCACC	ATGTAGACAA
H04	UDP0096	CCTCCGTCCA	CACATCGGTG

Komplet indeksa S2 1

ID jažice indeksne ploče	Naziv indeksa	Baze i7	Baze i5
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG

Komplet indeksa S2 2

ID jažice indeksne ploče	Naziv indeksa	Baze i7	Baze i5
A02	UDP0065	TAATGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC

ID jažice indeksne ploče	Naziv indeksa	Baze i7	Baze i5
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA

Komplet indeksa S2 3

ID jažice indeksne ploče	Naziv indeksa	Baze i7	Baze 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

Komplet indeksa S2 4

ID jažice indeksne ploče	Naziv indeksa	Baze i7	Baze i5
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG

Dodatak B

Dodatni izračuni za Opciju 1: 280 ng unosa DNK za kvantitativne metode širokog raspona Quant i Qubit

Izračun graničnih vrijednosti koncentracije za koncentraciju bujona DNK od 11,2 do 154,0 ng/μl:

Minimalna koncentracija temelji se na unosu 280,0 ng DNK / 25,0 μl volumena = 11,2 ng/μl.

Na temelju minimalnog volumena pipetiranja od 2,0 μl, maksimalna koncentracija je $280 \text{ ng} \times 1,1$ (10 % viška) / 2,0 μl = 154,0 ng/μl, u ukupnom volumenu od 27,5 μl.

Primjer izračuna s unosom DNK od 280,0 ng

Radni primjer za koncentraciju bujona DNK = 95,0 ng/μl:

- Volumen bujona DNK (μl) = $280,0 \text{ ng} \times 1,1/95,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, zaokružuje se na 3,24 μl za točno pipetiranje P-10.
- Ukupni volumen razrijeđene DNK fiksiran je na 27,5 μl.
- Volumen RSB-a (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, zaokružuje se na 24,3 μl za točno pipetiranje s P-200.

Radni primjer za koncentraciju bujona DNK = 308,0 ng/μl:

- Volumen bujona DNK (μl) fiksiran je na 2,0 μl
- Ukupni volumen razrijeđene DNK (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = 55,0 \mu\text{l}$
- Volumen RSB-a (μl) = $55,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 53,0 \mu\text{l}$

Dodatni izračuni za Opciju 2: unos DNK od 350 ng za metodu kvantitativnog određivanja Accuclear Ultra High Sensitivity

Izračun graničnih vrijednosti koncentracije za koncentracije bujona DNK od 14,0 do 192,5 ng/μl:

Minimalna koncentracija temelji se na unosu 350,0 ng DNK / 25,0 μl volumena = 14,0 ng/μl.

Na temelju minimalnog volumena pipetiranja od 2,0 μl, maksimalna koncentracija je $350 \text{ ng} \times 1,1$ (10 % viška) / 2,0 μl = 192,5 ng/μl.

Primjer izračuna s unosom DNK od 350,0 ng

Radni primjer za koncentraciju bujona DNK = 118,75 ng/μl:

- Volumen bujona DNK (μl) = $350,0 \text{ ng} \times 1,1/118,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$, zaokružuje se na 3,24 μl za točno pipetiranje s P-10
- Ukupni volumen razrijeđene DNK fiksiran je na 27,5 μl.
- Volumen RSB-a (μl) = $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$, zaokružuje se na 24,3 μl za točno pipetiranje s P-200.

Radni primjer za koncentraciju bujona DNK = 308,0 ng/μl:

- Volumen bujona DNK (μl) fiksiran je na 2,0 μl
- Ukupni volumen razrijeđene DNK (μl) = $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- Volumen RSB-a (μl) = $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

Povijest revizija

Dokument	Datum	Opis promjene
Broj dokumenta 200050132 v00.1	svibanj 2024.	Ispravljeni ulazni volumen za Accuclear Ultra High Sensitivity Quantitation Method.
Broj dokumenta 200050132 v00	travanj 2024.	Početno izdanje.

Priložene upute

Patenti i žigovi

Ovaj dokument i njegov sadržaj vlasništvo su tvrtke Illumina, Inc. i njezinih povezanih društava („Illumina“) te su namijenjeni isključivo za ugovornu upotrebu klijentima u vezi s proizvodom(ima) opisanima u njemu(ima). Dokument i njegov sadržaj ne smiju se upotrebljavati ni distribuirati ni u koju drugu svrhu niti se smiju na neki drugi način prenositi, otkrivati ili reproducirati bez prethodnog pisanog odobrenja tvrtke Illumina. Illumina ovim dokumentom ne prenosi nikakve licencije zaštićene svojim pravom na patent, žig, autorskim pravom ili običajnim pravom ni slična prava bilo koje treće strane.

Kvalificirano osoblje s odgovarajućom izobrazbom mora se strogo i bez iznimki pridržavati uputa u ovom dokumentu da bi se zajamčila pravilna i sigurna upotreba proizvoda opisanih u njemu. Prije upotrebe proizvoda nužno je s razumijevanjem pročitati cjelokupan sadržaj dokumenta.

AKO UPUTE U DOKUMENTU NE PROČITATE U CIJELOSTI TE IH SE NE PRIDRŽAVATE BEZ IZNIMKI, MOŽE DOĆI DO OŠTEĆENJA PROIZVODA, OZLJEDA KORISNIKA ILI DRUGIH OSOBA I DO OŠTEĆENJA DRUGE IMOVINE TE SE TIME PONIŠTAVAJU SVA JAMSTVA ZA PROIZVOD(E).

ILLUMINA NE PREUZIMA ODGOVORNOST ZA ŠTETE NASTALE USLIJED NEPRAVILNE UPOTREBE PROIZVODA KOJI JE(SU) OPISAN(I) U OVOM DOKUMENTU (UKLJUČUJUĆI DIJELOVE TOG(TIH) PROIZVODA I SOFTVER).

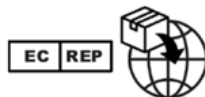
© 2024. Illumina, Inc. Sva prava pridržana.

Svi su žigovi vlasništvo tvrtke Illumina, Inc. ili svojih vlasnika. Konkretno informacije o žigovima potražite na adresi www.illumina.com/company/legal.html.

Podaci za kontakt



Illumina, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 SAD
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (izvan Sjeverne Amerike)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australski sponzor

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

Oznaka proizvoda

Sveobuhvatno objašnjenje simbola koji se nalaze na pakiranju proizvoda i naljepnica potražite u legendi simbola na web-mjestu support.illumina.com na kartici *Documentation* (Dokumentacija) za vaš komplet.