

Pakuotės lapelis

NAUDOTI IN VITRO DIAGNOSTIKAI. TIK EKSPORTUI.

Katalogo Nr. 20005715

Numatytoji paskirtis

„NextSeq 550Dx“ prietaisas prietaisas skirtas DNR bibliotekų sekoskaitai, kai naudojamas *in vitro* diagnostikos tyrimuose. „NextSeq 550Dx“ prietaisą reikia naudoti su konkrečiais registruotais, sertifikuotais ar patvirtintais *in vitro* diagnostikos reagentais ir analitine programine įranga.

Procedūros principai

„Illumina“ „NextSeq 550Dx“ prietaisas yra skirtas DNR bibliotekų sekoskaitai, kai jos naudojamos su *in vitro* diagnostikos tyrimais. Prietaisas skirtas kvalifikuotiems ir išmokytiems klinikinės laboratorijos darbuotojams, mokantiems taikyti klinikinėje laboratorijoje atliekamas *in vitro* diagnostines procedūras. Kaip įvesties duomenis „NextSeq 550Dx“ naudoja bibliotekas, sukurtas iš DNR, kur mėginio indeksai ir užfiksuotos sekos pridedamos prie amplifikuotų taikinių. Mėginių bibliotekos užfiksuojamos pratekamojoje kiuvetėje ir prietaise per sekoskaitą sintezės metu (SSM). Sekoskaitos sintezės metu (SBS) naudojamas ciklinio grįžtamojo blokavimo metodas siekiant aptikti fluorescenciškai pažymėtas pavienių nukleotidų bazes, kurios yra įtrauktos į augančias DNR grandines. Real-Time Analysis (RTA) programinė įranga atlieka vaizdo analizę ir bazių priskyrimą bei kiekvienai sekoskaitos ciklo bazei priskiria kokybės balą. Pasibaigus pirminei analizei, prietaise galima atlikti antrinę analizę ir apdoroti bazių priskyrimus. „NextSeq 550Dx“ naudoja skirtingus antrinės analizės modulius – tai priklauso nuo darbo eigos. Naudojant genocitinių ar somatinių variantų modulius, apdorojimas apima išskirstymą, FASTQ failų generavimą, lygiavimą, variantų priskyrimą ir variantų priskyrimo formato (VCF bei gVCF) failų generavimą. VCF ir gVCF failuose pateikiama informacija apie variantus, aptiktus konkrečiose referentinio genomo padėtyse.

Dvejopo paleidimo konfigūracija

„NextSeq 550Dx“ turi dvigubo paleidimo konfigūraciją, kad prietaisą būtų galima naudoti diagnostikos (Dx) arba tik moksliniams tyrimams skirtu (RUO) režimu. *In vitro* diagnostikos sekoskaitos tyrimai, įskaitant genocitinių ir somatinių variantų modulius, vykdomi diagnostikos režimu. Diagnostikos režimu galima naudoti tik IVD sekoskaitos reagentus. „NextSeq 550Dx“ prietaiso veikimo charakteristikos ir apribojimai buvo nustatyti naudojant diagnostikos režimą ir genocitinių ir somatinių variantų modulius.

Procedūros apribojimai

1. Naudoti *in vitro* diagnostikai.
2. Genocitinių ir somatinių variantų modulius naudojant su „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkiniu (300 ciklų) ar „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkiniu (300 ciklų), galima užtikrinti toliau nurodytas charakteristikas.
 - Sekos nustatymo našumas ≥ 90 gigabazių (Gb).
 - Nuskaitymo ilgis (pagal galą suporuota serija) – 2 x 150 bazių porų (bp).
 - Bazės yra ne mažesnės nei Q30 ≥ 75 %, kai nuskaitymo ilgis – 2 x 150 bp.
Ne mažiau kaip 75 % bazių „Phred“ kokybės balai yra ≥ 30 , o tai nurodo didesnį nei 99,9 % bazių priskyrimo tikslumą.
3. Tyrimo programinė įranga nėra pritaikyta nuskaitymams su intarpais / iškritomis ar jų deriniais, kai turinio ilgis yra > 25 bp. Taigi tyrimo programinė įranga neaptinka didesnio nei 25 bp ilgio tarpų / iškritų.
4. Tyrimo programinė įranga gali nesulygiuoti amplikonų nuskaitymų, kurių variantų turinys yra itin didelis, todėl sritis gali būti deklaruojama kaip nemutantinio tipo. Itin didelio turinio pavyzdžiai:
 - Nuskaitymai, kuriuose yra daugiau nei trys intarpai / iškritos
 - Mažiausiai 30 bp ilgio nuskaitymai su pavienių nukleotidų varianto (SNV) turiniu, kurio ilgis yra > 4 % viso amplikono tikslinio ilgio (išskyrus zondo sritis)
 - Nuskaitymai, kurių ilgis < 30 bp, o SNV turinys > 10 % viso amplikonų ilgio (įskaitant zondo sritis)
5. Dideli variantai, įskaitant multinukleotidų variantus (MNV) ir didelius intarpus / iškritas, išvestiniame VCF faile gali būti pateikiami kaip atskiri mažesni variantai.
6. Iškritų variantai gali būti išfiltruojami arba praleidžiami, kai apimtyje yra išdėstyti du amplikonai, jei iškritos ilgis yra didesnis už persidengimą tarp išdėstytų amplikonų arba lygus jam.
7. Sistema negali aptikti tarpų / iškritų, jei jie yra tiesiogiai šalia pradmens ir nėra persidengiančių amplikonų. Sričių, kuriose yra persidengiančių amplikonų, tyrimas negali aptikti iškritų, kai persidengimo sritis yra mažesnė už aptinkamo dydžio iškritą. Pavyzdžiui, jei dviejų gretimų amplikonų persidengimo sritis yra dvi bazės, tyrimas negali aptikti jokių iškritų, apimančių abi šias bazes. Galima aptikti vienos bazės iškritą bet kurioje iš šių bazių.
8. Kaip ir bet kioje hibridizavimu pagrįstoje bibliotekos paruošimo darbo eigoje, pagrindiniai polimorfizmai, mutacijos, intarpai ar iškritos oligonukleotidus rišančiose srityse gali turėti įtakos zonduojamiems aleliams ir sekoskaitos metu atliekamiems priskyrimams. Pavyzdžiai pateikti toliau.
 - Variantas fazėje gali būti neamplifikuotas su variantu pradmenų srityje, todėl rezultatas gali būti klaidingai neigiamas.
 - Variantai pradmenų srityje gali užkirsti kelią referentinio alelio amplifikacijai, todėl gali įvykti neteisingas homozigotinio varianto priskyrimas.
 - Tarpų / iškritų variantai pradmenų srityje gali sukelti klaidingą teigiamą priskyrimą nuskaitymo pabaigoje šalia pradmens.

9. Intarpai / iškritos gali būti filtruojami dėl grandinių tendencingumo, jei jie atsiranda ties vieno nuskaitymo pabaiga ir atliekant lygiavimą nėra sulygiuojami, tačiau nepašalinami.
10. Maži MNV nebuvo patvirtinti ir įtraukiami į ataskaitas tik naudojant somatinių variantų modulį.
11. Apie iškritas pranešama VCF pagal ankstesnės bazės VCF formato koordinatę. Todėl prieš įtraukdami į ataskaitą, kad atskira priskirta bazė yra homozigotinis referentas, patikrinkite greta esančias bazes.
12. Specifiniai genocitų linijos apribojimai:
 - „NextSeq 550Dx“ prietaisas, naudojantis „Local Run Manager“ genocitinių variantų modulį, skirtą „NextSeq 550Dx“, yra sukurtas kokybiniais gonocitų linijos variantų priskyrimo rezultatams pateikti (pvz., homozigotiniam, heterozigotiniam, nemutantinio tipo).
 - Naudojant kartu su genocitų variantų moduliu, mažiausia reikalinga aprėptis vienam amplikonui, kad būtų gautas tikslaus varianto priskyrimas, yra 150x. Dėl to reikia 150 suderinamų DNR fragmentų, o tai prilygsta 300 persidengiančių, abiejų sekų nuskaitymų. Mėginių skaičius ir bendras tikslinių bazių skaičius turi įtakos aprėpčiai. GC kiekis ir kitas genomo turinys gali turėti įtakos aprėpčiai.
 - Kopijų skaičiaus kitimas gali turėti įtakos tam, ar variantas identifikuojamas kaip homozigotinis, ar heterozigotinis.
 - Variantai tam tikruose pasikartojančiuose kontekstuose yra išfiltruojami VCF failuose. Kartotinis RMxN filtras naudojamas variantams filtruoti, jei visa variantų seka ar jos dalis pakartotinai matoma referenciniame genome šalia varianto padėties. Gonocitų linijos varianto iškvietimo atveju, norint filtruoti variantą, reikia bent devynių referentinio geno pakartojimų. Tinka tik tie pakartojimai, kurie nėra ilgesni kaip 5 bp (R5x9).
 - Jei vienoje padėtyje yra intarpas / iškrita ir SNV, gali būti nurodytas tik vienas variantas.
13. Specifiniai somatiniai apribojimai.
 - Kai naudojamas „NextSeq 550Dx“ skirtas „Local Run Manager“ somatinių variantų modulis, „NextSeq 550Dx“ prietaisas leidžia pateikti somatinių variantų iškvietimo kiekybinius rezultatus (pvz., somatinio varianto, kurio dažnis yra $\geq 0,026$, o aptikimo riba 0,05).
 - Naudojant kartu su somatinių variantų moduliu, mažiausia reikalinga aprėptis vienam amplikonui, kad būtų gautas tikslaus varianto priskyrimas, yra 450x vienam oligonukleotidų telkiniui. Dėl to reikia 450 suderinamų DNR fragmentų oligonukleotidų telkiniui, o tai prilygsta 900 persidengiančių pagal galus suporuotų nuskaitymų. Mėginių skaičius ir bendras tikslinių bazių skaičius turi įtakos aprėpčiai. GC kiekis ir kitas genomo turinys gali turėti įtakos aprėpčiai.
 - Somatinio varianto priskyrimo atveju norint filtruoti variantą, reikia bent šešių referentinio geno pakartojimų, ir tinka tik tie pakartojimai, kurių ilgis yra iki 3 bp (R3x6).
 - Somatinių variantų modulis negali atskirti gonocitų linijos ir somatinių variantų. Modulis naudojamas norint aptikti variantus plataus intervalo variantų dažniuose, tačiau varianto dažnis negali būti naudojamas norint atskirti somatinius variantus nuo gonocitų linijos variantų.
 - Normalus mėginio audinys turi įtakos variantų aptikimui. Pranešta aptikimo riba yra pagrįsta santykinio varianto dažniu, nustatytu pagal visą DNR, gautą iš naviko ir normalaus audinio.

Gaminio komponentai

„Illumina“ „NextSeq 550Dx“ sudaro:

1. „NextSeq 550Dx“ prietaisas (Katalogo Nr. 20005715)
2. Programinės įrangos komponentai „NextSeq 550Dx“ prietaisas, įskaitant nurodytus toliau.

Programa	Funkcija	Aprašymas
„NextSeq 550Dx“ operacinė programinė įranga (NOS)	Valdo prietaiso veikimą	NOS programa valdo prietaiso veikimą sekoskaitos metu ir generuoja vaizdus, skirtus naudoti Real-Time Analysis (RTA) programinei įrangai.
Real-Time Analysis (RTA) programinė įranga	Atlieka pirminę analizę	RTA programa kiekvienos išsklotinės vaizdus, kuriuos NOS generuoja vieno sekoskaitos serijos ciklo metu, konvertuoja į bazių priskyrimo failus, kurie įvedami į „Local Run Manager“ analizės modulius. RTA programoje nėra naudotojo sąsajos.
„Local Run Manager“	Modulio pasirinkimo sąsaja	Prietaise integruota „Local Run Manager“ programinė įranga skirta tvarkyti analizės modulius, juos pasirinkti ir jų būsenai stebėti.
Somatinio varianto modulis	Atlieka antrinę analizę	Ši „Local Run Manager“ analizės modulio programinė įranga atlikdama antrinę analizę apdoroja bazių priskyrimus. Apdorojimas apima išskirstymą, FASTQ failų generavimą, lygiavimą, variantų priskyrimą ir ataskaitų kūrimą. Variantų priskyrimo priemonė („Pisces“) generuoja VCF failus, kuriuose pateikiama informacija apie variantus, aptiktus konkrečiose referentinio genomo padėtyse, ir nurodytas išmatuotas variantų dažnis.
Genocitinio varianto modulis	Atlieka antrinę analizę	Ši „Local Run Manager“ analizės modulio programinė įranga atlikdama antrinę analizę apdoroja bazių priskyrimus. Apdorojimas apima išskirstymą, FASTQ failų generavimą, lygiavimą, variantų priskyrimą ir ataskaitų kūrimą. Variantų priskyrimo priemonė („Pisces“) generuoja VCF failus, kuriuose pateikiama informacija apie variantus, aptiktus konkrečiose referentinio genomo padėtyse, ir nustato, ar konkretus variantas yra heterozigotinis, ar homozigotinis.

3. **Pasirenkamas** „Illumina DRAGEN Server“, skirtas „NextSeq 550Dx“ (katalogo Nr. 20086130), įskaitant šį programinės įrangos komponentą:

Programa	Funkcija	Aprašymas
„Illumina Run Manager“	Sąsaja taikymo modulio pasirinkimui	„Illumina Run Manager“ programinė įranga yra įdiegta pasirenkamame „DRAGEN“ serveryje be prietaiso. „Illumina Run Manager“ leidžia naudotojams valdyti, pasirinkti analizės modulį ir stebėti sekoskaitą bei analizės būseną.

Pasirenkamas „Illumina DRAGEN“ serveris, naudojamas „NextSeq 550Dx“, galimas tik tam tikrose šalyse. Dėl galimybių susisieki su „Illumina“ atstovu jūsų regione.

Naudojimo sąlygos

Daugiau informacijos apie naudojimo sąlygas žr. „NextSeq 550Dx“ prietaiso vietos paruošimo vadovo skyriuje „Aplinkosaugos reikalavimai“ (dokumento Nr. 1000000009869).

Elementas	Specifikacija
Temperatūra	Laboratorijoje turi būti palaikoma 19–25 °C (22 ± 3 °C) temperatūra. Ši temperatūra yra darbinė prietaiso temperatūra. Naudojant prietaisą, aplinkos temperatūra negali kisti daugiau kaip ± 2 °C.
Drėgnis	Išlaikykite 20–80 % santykinį drėgnį be kondensacijos.

Įranga ir medžiagos

Reikalinga įranga ir medžiagos parduodamos atskirai

„NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinys v2.5 (75 ciklai), katalogo Nr. 20028870

„NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinys v2.5 (300 ciklų), katalogo Nr. 20028871

Reikalinga įranga ir medžiagos – nepridėta

Naudotojo pateikiamos eksploatacinės medžiagos, kurių reikia sekoskaitos serijoms vykdyti

Eksploatacinė medžiaga	Tiekėjas	Paskirtis
Alkoholio servetėlės, 70 % izopropilas arba Etanolis, 70 %	VWR, katalogo Nr. 95041-714 (arba lygiavertis) Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas	Pratekamosios kiuvetės valymas ir bendroji paskirtis
Laboratorinis audinys, kurio sudėtyje mažai medvilnės	VWR, katalogo. Nr. 21905-026 (arba lygiavertis)	Pratekamosios kiuvetės valymas ir bendroji paskirtis

Naudotojo pateikiamos eksploatacinės medžiagos prietaiso priežiūrai

Eksploatacinė medžiaga	Tiekėjas	Paskirtis
NaOCl, 5 % (natrio hipochloritas)	„Sigma-Aldrich“, katalogo Nr. 239305 (arba laboratorinis ekvivalentas)	Prietaiso plovimas taikant rankinį plovimą po serijos; skiedžiama iki 0,12 % tūrio
„Tween 20“	„Sigma-Aldrich“, katalogo Nr. P7949	Prietaiso plovimas naudojant rankinio plovimo parinktį; skiedžiama iki 0,05 % tūrio
Vanduo, laboratorinis	Bendrasis laboratorinių reikmenų tiekėjas	Prietaiso plovimas (rankinis plovimas)
Oro filtras	„illumina“, katalogo Nr. 20063988	Oro, kurį prietaisas naudoja aušinimui, valymas

Laboratorinio vandens gairės

Prietaiso procedūroms visada naudokite laboratorinį arba dejonizuotą vandenį. Niekada nenaudokite vandentiekio vandens. Naudokite tik toliau nurodytų rūšių vandenį arba atitikmenis.

- Dejonizuotas vanduo
- „illumina PW1“
- 18 megaomų (MΩ) vanduo
- „Milli-Q“ vanduo
- „Super-Q“ vanduo
- Molekulinės biologijos klasės vanduo

Įspėjimai ir atsargumo priemonės



DĖMESIO!

Federaliniai įstatymai draudžia šį prietaisą pardavinėti ar užsakinėti gydytojui ar kitam specialistui, kuriam išduota licencija pagal valstybės, kurioje jis (ji) praktikoja, įstatymus, naudoti ar užsakyti prietaiso naudojimo paslaugą.

1. **Kai kuriuose reagentų, kuriuos „illumina“ teikia naudoti su „NextSeq 550Dx“ prietaisas, komponentuose yra cheminių medžiagų, kurios gali būti pavojingos. Pavojus žmogui kyla, jei pavojingos medžiagos įkvepiamos, nuryjamos, patenka ant odos ir į akis. Dėvėkite tinkamai nuo pavojaus saugančias apsaugines priemones, įskaitant akių apsaugos priemones, pirštines ir laboratorinį chalata. Su panaudotais reagentais elkitės kaip su cheminėmis atliekomis ir utilizuokite laikydamiesi taikomų regiono, nacionalinių ir vietinių įstatymų bei teisės aktų.** Papildomos aplinkosaugos, sveikatos ir saugos informacijos ieškokite saugos duomenų lape (SDS) adresu support.illumina.com/sds.html.
2. Apie rimtus nelaimingus atsitikimus, susijusius su šiuo gaminiu, nedelsdami praneškite įmonei „illumina“ bei šalių narių, kuriose gyvena naudotojas ir pacientas, kompetentingoms institucijoms.
3. Su visais kraujo mėginiais dirbkite taip, tarytum būtų žinoma, kad jie yra užkrėsti žmogaus imunodeficito virusu (ŽIV), žmogaus hepatito B virusu (HBV) ir kitais krauju pernešamais patogeniniais agentais (bendros atsargumo priemonės).
4. Nesilaikant nurodytų procedūrų gali būti gauti klaidingi rezultatai arba smarkiai suprastėti mėginio kokybė.
5. Laikykitės įprastų laboratorinių atsargumo priemonių. Nesiurbkite pipetės burna. Darbo vietoje nevalgykite, negerkite ir nerūkykite. Dirbdami su mėginiais ir rinkinių reagentais mėvėkite vienkartinės pirštines bei dėvėkite laboratorinį chalata. Baigę dirbti su mėginiais ir rinkinių reagentais, kruopščiai nusiplaukite rankas.
6. Kad PGR produktai neužterštų reagentų, instrumentų ir genomo DNR mėginių, būtina laikytis tinkamos laboratorinės praktikos ir laboratorinės higienos taisyklių. PGR užteršimas gali lemti netikslius ir nepatikimus rezultatus.

7. Norėdami išvengti užteršimo užtikrinkite, kad prieš amplifikaciją ir po jos būtų naudojama speciali įranga (pvz., pipetės, pipečių antgaliai, šilumos blokai, maišytuvai ir centrifugos).
8. Indekso ir mėginio pora turi tiksliai sutapti su atspausdintu plokštelės išdėstymu. „Local Run Manager“ automatiškai įveda indeksų pradmenis, susietus su mėginių pavadinimais (kai jie įvedami į modulį). Naudotojui patariama prieš pradėdant sekos nustatymo vykdymą patikrinti indeksų pradmenis, susietus su mėginiais. Nesutapusi mėginių ir plokštelės išdėstymo rezultatams, prarandama teigiamų mėginių identifikacija ir pateikiami neteisingi rezultatai.
9. Siekiant kompiuterį apsaugoti nuo virusų, naudotojui primygtinai rekomenduojama įdiegti antivirusinę programinę įrangą. Diegimo instrukcijas žr. naudotojo vadove.
10. Nenaudokite „NextSeq 550Dx“, jei nuimtas bet kuris skydelis. Jei prietaisas naudojamas nuėmus bet kokius skydelius, kyla linijos įtampos ir nuolatinės srovės įtampos poveikio pavojus.
11. Nelieskite pratekamosios kiuvetės platformos, esančios pratekamosios kiuvetės skyriuje. Šiame skyriuje esančio šildytuvo veikimo temperatūra yra 22–95 °C, todėl jis gali nudeginti.
12. Prietaisas sveria apie 86 kg (185 lb) ir gali sukelti sunkų sužeidimą, jei nukristų ar būtų naudojamas netinkamai.

Naudojimo instrukcija

Toliau pateikta „NextSeq 550Dx“ prietaiso naudojimo instrukcija numato „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 300 arba 75 ciklų didelės išvesties reagentų rinkinio naudojimą.

Paleidimas

Sukurkite sekoskaitos seriją naudodami „Local Run Manager“ arba „Illumina Run Manager“. „Local Run Manager“ naudojimo instrukcija pateikta toliau „NextSeq 550Dx“ prietaiso informacinis vadovas (dokumento Nr. 1000000009513). Paleidimo instrukciją naudojant „Illumina Run Manager“ rasite „Illumina Run Manager“, skirtas „NextSeq 550Dx“, programinės įrangos vadovas (dokumento Nr. 200025239).

„Local Run Manager“ arba „Illumina Run Manager“ pasirinkimo instrukciją rasite „Illumina Run Manager“, skirtas „NextSeq 550Dx“, programinės įrangos vadovas (dokumento Nr. 200025239). Išsamias konkrečių programų instrukcijas rasite atitinkamo tyrimo modulyje ar programos vadove.

Toliau pateiktos instrukcijos yra susijusios su „Local Run Manager“ genocitinių ir somalinių variantų modulių naudojimu.

Parametrų nustatymas

1. Prisijunkite prie „Local Run Manager“.
2. Pasirinkite **Create Run** (kurti paleidimą) ir **Somatic Variant** (somatic variantas) arba **Germline Variant** (genocitinis variantas).
3. Įveskite paleidimo pavadinimą, pagal kurį vykdymas bus identifikuojamas nuo sekos nustatymo iki analizės. Naudokite raides, skaitmenis, tarpus, apatinius brūkšnius ar brūkšnelius.

4. [Pasirinktinai] Įveskite paleidimo aprašymą jo identifikacijai.
Naudokite raides, skaitmenis, tarpus, apatinius brūkšnius ar brūkšnelius.
5. Išskleidžiamajame sąrašė pasirinkite mėginių skaičių ir indeksų rinkinį.
Rinkdamiesi atsižvelkite į toliau pateiktą informaciją.
 - Išskleidžiamajame sąrašė nurodytas mėginių skaičius indeksų rinkinyje. Pavyzdžiui, „24-Set 1“ nurodo, kad turi būti tiriami 24 mėginiai, taikant indeksus iš 1 indeksų rinkinio.
 - Indeksų rinkinio skaičiai nurodo skirtingus i5 ir i7 indeksų porų rinkinius. Tiek „Set 1“ (1 rinkinys), tiek „Set 2“ (2 rinkinys) užtikrina indeksų įvairovę. Du indeksų rinkiniai siūlomi siekiant išvengti vieno rinkinio išsekimo.
 - Pasirinkite mėginių skaičių, kuo panašesnį į tiriamų mėginių skaičių. Jei tikslaus mėginių skaičiaus sąrašė nėra, pasirinkite panašiausią, bet mažesnį už tiriamų mėginių skaičių. Pavyzdžiui, jei ketinate tirti 18 mėginių, pasirinkite 16.
 - Siūlomi mėginių šulinėliai ir indeksų deriniai, atitinkantys indeksų įvairovės reikalavimus, paryškinti žalia spalva.

Paleidimui skirtų manifesto failų importavimas

1. Patikrinkite, ar manifestai, kurias norite importuoti, prieinami tinkle arba USB atmintinėje.
2. Pasirinkite **Import Manifests** (importuoti manifestus).
3. Raskite manifesto failą ir pasirinkite manifestus, kuriuos norite pridėti.

PASTABA Kad manifestų failai būtų prieinami visiems paleidimams naudojant genocitinių arba somatinių variantų analizės modulį, manifestus įtraukite naudodami funkciją „Module Settings“ (modulio nustatymai). Šiai funkcijai reikalingos administratoriaus teisės. Daugiau informacijos rasite „NextSeq 550Dx“ prietaiso informacinis vadovas (dokumento Nr. 100000009513).

Mėginių priskyrimas paleidimui

Norėdami priskirti mėginius paleidimui, pasirinkite vieną iš parinkčių ir vykdykite tolesnius nurodymus.


Enter samples manually (įvesti mėginius) – „Create Run“ (kurti paleidimą) lange naudokite tuščią lentelę.

Import samples (importuoti mėginius) – suraskite išorinį CSV formato failą. Lange „Create Run“ (kurti paleidimą) galima atsisiųsti šabloną.


Neautomatinis mėginių įvedimas

1. Įveskite unikalų mėginio pavadinimą (*somatinio varianto analizės modulius*) arba mėginio ID (*genocitinio varianto analizės modulius*).
Naudokite raides, skaitmenis, brūkšnelius arba apatinius brūkšnius.
2. [Pasirinktinai] Kai naudosite teigiamus ar neigiamus kontrolinius mėginius, spustelėkite dešinįjį pelės klavišą ir pasirinkite kontrolinės medžiagos tipą.

Vieno mėginio šulinėlio kontrolinė medžiaga ta pačia kontroline medžiaga automatiškai užpildo atitinkamą šulinėlį kitame telkinyje.

- [Pasirinktinai] Laukelyje „Sample Description“ (mėginio aprašymas) įveskite mėginio aprašymą. Naudokite raides, skaitmenis, brūkšnelius arba apatinius brūkšnius.
- Išskleidžiamajame sąrašė „Index 1“ (1-asis indeksas) (i7) pasirinkite 1-ojo indekso adapterį. Jei naudojate siūlomus mėginių šulinėlius, programinė įranga automatiškai parenka i7 ir i5 indeksų adapterius, atitinkančius indeksų įvairovės reikalavimus. Jei tikslaus tiriamų mėginių skaičiaus sąrašė nėra, būtinai pasirinkite papildomiems šulinėliams skirtus indeksų adapterius.
- Išskleidžiamajame sąrašė „Index 2“ (2-asis indeksas) (i5) pasirinkite 2-ojo indekso adapterį.
- Išskleidžiamajame manifestų sąrašė pasirinkite manifesto failą. „Pool A“ (A telkinys) esantiems mėginiams reikalingas kitas manifesto failas, nei naudojamas „Pool B“ (B telkinys) mėginiams.
- Pasirinkite atitinkamą parinktį, jei norite peržiūrėti, išspausdinti ar išsaugoti plokštelės išdėstymą, kad juo būtų galima remtis ruošiant bibliotekas.
 - Norėdami pamatyti plokštelės išdėstymą, pasirinkite piktogramą  **Print** (spausdinti). Pasirinkite **Print** (spausdinti), kad išspausdintumėte plokštelės išdėstymą.
 - Pasirinkite **Export** (eksportuoti), kad eksportuotumėte mėginio informaciją į išorinį failą.
- Pasirinkite **Save Run** (išsaugoti paleidimą).

Mėginių importavimas

- Pasirinkite **Import Samples** (importuoti mėginius) ir pasirinkite mėginio informacijos failo vietą. Galima importuoti dviejų rūšių failus.
 - Ekrane „Create Run“ (kurti paleidimą) pasirinkite **Template** (šablonas), kad sukurtumėte naują plokštelės šabloną. Šablono faile pateikiamos tinkamos importuotinos stulpelių antraštės. Kiekviename stulpelyje įveskite paleidimo mėginių informaciją. Ištrinkite informaciją nenaudojamuose langeliuose ir išsaugokite failą.
 - Pasinaudoję funkcija „Export“ (eksportuoti) galėsite naudoti iš genocitinio arba somatinio varianto modulio eksportuotą mėginio informacijos failą.
- Norėdami pamatyti plokštelės išdėstymą, pasirinkite piktogramą  **Print** (spausdinti).
- Pasirinkite **Print** (spausdinti), kad atspausdintumėte plokštelės išdėstymą, kuris bus naudojamas ruošiant bibliotekas.
- Pasirinkite **Save Run** (išsaugoti paleidimą).

Reagentų kasetės paruošimas

Įsitikinkite, kad kruopščiai laikotės reagentų kasetės nurodymų, kad būtų galima sėkmingai atlikti sekoskaitą.

- Išimkite reagentų kasetę iš saugyklos (nuo –25 iki –15 °C).

2. Pasirinkite vieną iš toliau nurodytų būdų, kaip atšildyti reagentus. Kasetės nemerkite. Atšildę kasetę, prieš atlikdami kitą veiksmą, ją išdžiovinkite.

Temperatūra	Laikas atšildyti	Stabilumo riba
15–30 °C temperatūros vandens vonelė	60 minučių	Neviršyti 6 valandų
2–8 °C	7 valandos	Neviršyti 5 dienų

PASTABA Jei daugiau nei viena kasetė atšildoma toje pačioje vonelėje, pridėkite papildomai laiko.

3. Apverskite kasetę penkis kartus, kad sumaišytumėte reagentus.
4. Patikrinkite kasetės apačią ir įsitikinkite, kad reagentai yra atšildyti ir be nuosėdų. Patvirtinkite, kad padėtys Nr. 29, 30, 31 ir 32 yra atšildytos, nes jos yra didžiausios ir jas atšildyti užtrunka ilgiausiai.
5. Švelniai pabaksnokite stalą, kad sumažėtų oro burbuliukų. Norėdami geriausių rezultatų, iš karto įdėkite mėginį ir nustatykite seriją.

Pratekamosios kiuvetės paruošimas

1. Išimkite naują pratekamąją kiuvetę iš dėžutės laikymo vietos (nuo 2 iki 8 °C).
2. Pašalinkite pakavimo plėvelę nuo dėžutės ir padėkite kambario temperatūroje 30–čiai minučių.

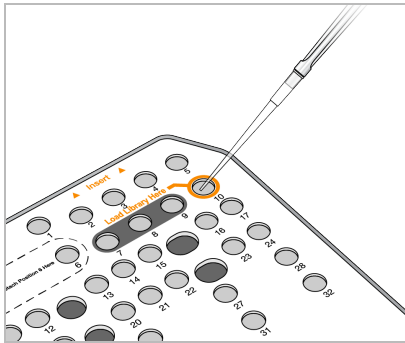
Bibliotekų parengimas nustatyti seką

Denatūruokite ir atskieskite bibliotekas iki 1,3 ml įkrovos tūrio. Praktiškai koncentracija atsižvelgiant į bibliotekos parengimo ir kiekybinio įvertinimo metodus gali skirtis. Mėginio bibliotekų skiedimas priklauso nuo oligonukleotidų telkinių kompleksškumo. Nurodymus, kaip paruošti mėginio bibliotekas nustatyti seką, įskaitant bibliotekos skiedimą ir telkimą, žr. taikytino bibliotekos paruošimo rinkinio naudojimo instrukcijose. „NextSeq 550Dx“ reikia optimizuoti sankaupos tankį.

Bibliotekų įdėjimas į reagentų kasetę

1. Nuvalykite plėvele padengtą rezervuarą Nr. 10, pažymėtą **Load Library Here** (įdėti biblioteką čia), naudodami pūkelių nepaliekantį audinį.
2. Pradurkite sandariklį švari 1 ml pipetės galiuku.
3. Įpilkite 1,3 ml paruoštų bibliotekų į rezervuarą Nr. 10, pažymėtą kaip **Load Library Here** (įdėti biblioteką čia). Dozuodami bibliotekas venkite paliesti folijos sandariklį.

pav. 1 Bibliotekų įkėlimas



Sekoskaitos serijos nustatymas

Išsamias vykdymo sąrankos instrukcijas žr. „NextSeq 550Dx“ prietaiso informacinis vadovas (dokumento Nr. 1000000009513).

1. Prisijunkite prie „NextSeq 550Dx“ naudodami savo „Local Run Manager“ (vietinio vykdymo tvarkytuvės) arba „Illumina Run Manager“ programinės įrangos slaptažodį.
2. Pagrindiniame NOS programinės įrangos ekrane pasirinkite **Sequence** (seka).
3. Sąrašė pasirinkite vykdymą, tada – **Next** (pirmyn).
Atsidarys nurodyta tvarka pateikta vykdymo sąrankos ekranų serija: įdėkite pratekamąją kiuvetę, buferio kasetę, reagento kasetę ir atlikite išankstinį patikrinimą.

PASTABA Vykdymai pasiekiami tik naudojant tą patį „Run Manager“, kuris naudojamas planuojant vykdymą. Instrukcijas, kaip nustatyti „Run Manager“ programinę įrangą, žr. „Illumina Run Manager“, skirtas „NextSeq 550Dx“, programinės įrangos vadovas (dokumento Nr. 200025239).

4. Pasirodžius ekranui „Load Flow Cell“ (pratekamosios kiuvetės įdėjimas), išvalykite ir įdėkite pratekamąją kiuvetę.
 - Išimkite pratekamąją kiuvetę iš pakavimo plėvelės.
 - Atidarykite permatomą plastikinę užveriamą pakuotę ir išimkite pratekamąją kiuvetę.
 - Pūkelių nepaliekančia alkoholiu suvilgyta šluoste nuvalykite stiklinį pratekamosios kiuvetės paviršių. Stiklą nusauskinkite laboratoriniu pūkelių nepaliekančiu audiniu.
 - Įsitikinkite, kad stiklinis pratekamosios kiuvetės paviršius yra švarus. Jei reikia, pakartokite valymo veiksmą.
 - Išimkite panaudotą pratekamąją kiuvetę iš ankstesnės serijos.
 - Sulygiuokite pratekamąją kiuvetę pagal sulygiavimo kaiščius ir padėkite ant platformos.
5. Pasirinkite **Load** (įdėti).
Durelės užsidarys automatiškai, ekrane pasirodys pratekamosios kiuvetės ID ir įvyks jutiklių patikrinimas.

- Laikydami programinės įrangos raginimų, ištuštinkite panaudotų reagentų talpą, įdėkite „NextSeq 550Dx“ buferinio tirpalo kasetę ir „NextSeq 550Dx“ reagentų kasetę.
Kai įdėsite „NextSeq 550Dx“ buferinio tirpalo ir reagentų kasetes, programinė įranga nuskaitys bei įrašys RFID. Ekrane matysite buferinio tirpalo ir reagentų kasečių ID ir bus atliktas jutiklių patikrinimas.
- Kai automatizuota prieš seriją vykdoma patikra pasibaigs, pasirinkite **Start** (paleisti). (Nereikia, jei sukonfigūruotas automatinis paleidimas.)
- Prasidėjus vykdymui atsiradys sekoskaitos langas. Šiame lange matysite proceso vizualizaciją, įskaitant intensyvumą ir kokybės įverčius.

Rezultatai

Integruotoji Real-Time Analysis (RTA) programinė įranga atlieka vaizdo analizę ir bazių priskyrimą bei kiekvienai sekoskaitos ciklo bazei priskiria kokybės balą. Pasibaigus pirminei analizei, pasirinktas modulis antrinę analizę pradeda automatiškai. Čia aprašyti antrinės analizės procesai taikomi „Local Run Manager“ genocitinių ir somatinių variantų moduliams („NextSeq 550Dx“ prietaisas).

Išskirstymas

Išskirstymas palygina kiekvieną „Index Read“ seką su paleidimui nurodytomis indekso sekomis. Atliekant šį veiksmą neatsižvelgiama į jokias kokybės vertes.

Indeksų nuskaitymai identifikuojami atliekant toliau nurodytus veiksmus.

- Mėginiai numeruojami nuo 1, atsižvelgiant į tai, kokia tvarka jie yra išvardyti serijoje.
- Mėginys, kurio numeris 0, rezervuojamas sankaupoms, kurios nebuvo priskirtos mėginiui.
- Sankaupos mėginiui priskiriamos, kai indeksų seka tiksliai atitinka arba kai yra ne daugiau kaip viena indeksų nuskaitymo neatitiktis.

FASTQ failo generavimas

Atlikus išskirstymą programinė įranga sugeneruoja tarpinės analizės failus FASTQ formatu (tekstiniu formatu, naudojamu sekoskaitoms apibūdinti). FASTQ failai apima kiekvieno mėginio nuskaitymus ir susijusius kokybės įverčius. Filtro nepraėjusios sankaupos neįtrauktos.

Viename FASTQ faile yra tik vieno mėginio nuskaitymai. To mėginio pavadinimas yra įtrauktas į FASTQ failo vardą. Genocitiniuose ir somatiniuose moduluose vienam oligonijų telkinio mėginiui generuojami aštuoni FASTQ failai, keturi iš 1-oko nuskaitymo ir keturi iš 2-ojo. Šioje išvestyje kiekvienam genocitiniam ir somatiniam mėginiui atitinkamai gaunama po 8 ir 16 FASTQ failų. FASTQ failai yra pirminė lygiavimo funkcijos įvestis.

Lygiavimas

Lygiavimo metu juostinis Smith-Waterman algoritmas sulygiuoja kiekvieno mėginio sankaupas pagal amplikonų sekas, nurodytas manifesto faile.

Juostinis Smith-Waterman algoritmas atlieka pusiau visuotinį sekos lygiavimą, kad aptiktų panašius regionus tarp dviejų sekų. Užuoat lyginęs visą seką, Smith-Waterman algoritmas lygina visų galimų ilgių segmentus.

Kiekvienas dviejų sekų nuskaitymas įvertinamas pagal jo lygiavimą su atitinkamomis nuskaitymo zondo sekomis.

- 1-as nuskaitymas įvertinamas pagal pasrovinių konkrečios srities oligonukleotidų (angl. „Downstream Locus-Specific Oligos“, DLSO) atvirkštinį papildymą.
- 2-as nuskaitymas įvertinamas pagal priešrovinius konkrečios srities oligonukleotidus (angl. „Upstream Locus-Specific Oligos“, ULSO).
- Jei nuskaitymo pradžia sutampa su zondo seka, kurioje yra ne daugiau kaip vienas nesutapimas, visas nuskaitymo ilgis lygiuojamas pagal tos sekos tikslinį amplikoną.
- Jei nuskaitymo pradžia ir zondo seka sutampa su ne daugiau kaip trimis skirtumais (nesutapimais arba poslinkiais dėl priekinių sekų intarpų / iškritų), visas nuskaitymo ilgis lygiuojamas pagal tos sekos tikslinį amplikoną.
- Dėl tyrimo cheminių savybių DLSO ir ULSO esantys intarpai / iškritos nestebimi.

Lygiavimai rezultatai filtruojami remiantis neatitikties rodikliais aktuolioje srityje arba visame amplikone, atsižvelgiant į amplikono ilgį. Lygiavimo failuose išfiltruoti lygiavimai įrašomi kaip nesulygiuoti ir nenaudojami priskiriant variantus.

Variantų priskyrimas

Variantų priskyrimo priemonė „Pisces“ priskiria SNV ir intarpų / iškritų variantus iš prietaisui parengtų bibliotekų.

Ataskaitos ir papildomi išvesties failai

Variantų analizės moduliai sukuria PDF ir TXT ataskaitas, kuriose rodoma įvairi metrika, pvz., sekos nustatymo aprėpties gylis ir variantų skaičius. Šie moduliai taip pat sukuria įvairius išvesties failus, pvz., VCF ir variantų priskyrimo formato (gVCF) failus, skirtus variantų priskyrimo tikslams.

Kokybės kontrolės procedūros

„NextSeq 550Dx“ programinė įranga kiekvieną vykdymą, mėginio ir bazės priskyrimą įvertina pagal kokybės kontrolės metriką. Parengiant bibliotekas taip pat rekomenduojama naudoti teigiamus ir neigiamus kontrolinius mėginius, kuriuos reikia įvertinti. Kontrolinius mėginius įvertinkite taip, kaip nurodyta toliau.

- **Neigiamas kontrolinis mėginys (šablono kontrolinio mėginio nėra)** – turi būti sugeneruotas numatomas rezultatas. Jei, naudojant neigiamą kontrolinį mėginį, sugeneruojamas rezultatas, kuris skiriasi nuo numatomo, galėjo įvykti mėginių stebėjimo klaida, galėjo būti neteisingai įrašyti indeksavimo pradmenys arba kažkas galėjo užsiteršti.

- **Teigiamas kontrolinis mėginys** – turi būti sugeneruotas numatomas rezultatas. Jei naudojant teigiamą kontrolinį mėginį sugeneruojamas rezultatas, kuris skiriasi nuo numatomo, galėjo įvykti mėginių stebėjimo klaida arba galėjo būti neteisingai įrašyti indeksavimo pradmenys.

Veikimo charakteristikos

„NextSeq 550Dx“ prietaisas veikimo charakteristikos buvo nustatytos naudojant genocitinių ir somatinių variantų modulius, „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ ir „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų) bei patvirtintos naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų). Tyrimai apėmė mėginių indeksavimą, mėginių pernašą, DNR įvestį, analitinį jautrį (tuščios vertės ribą / aptikimo ribą), preciziškumą, metodų palyginimą ir atkuriamumą.

Analitiniai tyrimai, kurių metu naudojamas „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinys (300 ciklų), buvo sukurti siekiant įvertinti tvirtinimus apie veikimą, anksčiau nustatytus naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų). Rezultatai rodo, kad reagentų rinkiniai (ver. 2 ir ver. 2.5) naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ veikia panašiai. Veikimo charakteristikas, susijusias su prieš analizę esančiais veiksniais, pvz., išskyrimo metodais ar trikdančiomis medžiagomis, žr. „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ pakuotės lapelyje.

Skaičiavimų, naudojamų veikimo charakteristikose, apibrėžtys

1. Teigiamą procentinę atitiktį (PPA) apskaičiuojama kaip padėčių, kurios referentiniu metodu klasifikuojamos kaip variantai, dalis, tiksliai nurodoma tyrime.
 - $\frac{\text{(tiksliai tyrime nurodomų variantų padėčių kiekis)}}{\text{(bendrasis variantų padėčių kiekis)}}$
Tyrime pateikiami variantų lokusai, atitinkantys referentinio metodo reikalavimus, yra tikrosios teigiamos reikšmės (TP). Variantų padėtys, tyrime pateikiamos kaip referencijos priskyrimai arba skirtingi variantų priskyrimai, yra klaidingos neigiamos reikšmės (FN).
2. Neigiamą procentinę atitiktį (NPA) apskaičiuojama kaip padėčių, kurios referentiniu metodu klasifikuojamos kaip nemutantinio tipo, dalis, tiksliai nurodyta tyrime.
 - $\frac{\text{(tyrime tiksliai nurodytų nemutantinio tipo padėčių kiekis)}}{\text{(bendrasis nemutantinio tipo padėčių kiekis)}}$
Tyrime pateikiami nemutantinio tipo lokusai, atitinkantys referentinio metodo reikalavimus, yra tikrosios neigiamos reikšmės (TN). Nemutantinio tipo padėtys, tyrime pateikiamos kaip variantai, yra klaidingos teigiamos reikšmės (FP).
3. Bendroji procentinė atitiktis (OPA) apskaičiuojama kaip lokusų, kurie tiksliai pateikiami tyrime, dalis, referentinio metodo atžvilgiu.
 - $\frac{\text{((tyrime tiksliai nurodytų variantų lokusų kiekis))} + \text{(tyrime tiksliai nurodytų nemutantinio tipo lokusų kiekis)}}{\text{(bendrasis variantų lokusų kiekis)}} / \frac{\text{(bendrasis nemutantinio tipo lokusų kiekis)}}{\text{(bendrasis variantų lokusų kiekis)}}$

4. Skaičiuojant PPA, NPA ir OPA, priskyrimai neįtraukiami (variantų ar referentiniai lokusai, netenkinantys vieno ar kelių kokybės filtrų sąlygų).
5. Autosomų priskyrimo dažnis apskaičiuojamas bendrąjį filtrų sąlygas tenkinančių padėčių kiekį padalijus iš bendrojo 1–22 chromosomų nustatytos sekos padėčių kiekio; X ir Y chromosomos neįtraukiamos. Ši metrika neatsižvelgia į priskyrimų atitikimą referentiniam metodui.

„NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) veiksmingumas

Mėginių indeksavimas

Mėginių indekso pradmenys, pridėti ruošiant bibliotekas, kiekvieno mėginio DNR priskiria unikalią seką. Naudojant šias unikalias sekas, kelis mėginius galima sutelkti vienoje sekoskaitos serijoje. Mėginių indeksavimo funkcija naudojama tiek su gonocitų linijos, tiek su somatinių variantų darbo eigomis. Šiuo tyrimu buvo siekiama nustatyti mažiausią (8) ir didžiausią (96) mėginių skaičių, kurį „NextSeq 550Dx“ prietaisas gali apdoroti vienos sekoskaitos serijos metu. Buvo ištirti aštuoni unikalūs „Platinum Genome“ mėginiai, kiekvienam iš jų taikant 12 skirtingų indeksavimo pradmenų derinių. Mėginių rezultatai, gauti atlikus keturias sekoskaitos serijas naudojant „Germline“ variantų modulį, buvo palyginti su „Platinum Genomes“ 2016-1.0 versija.

Per pirmąsias serijas 96 unikalios indeksuotos mėginių bibliotekos buvo ištirtos atliekant reprezentatyvų tyrimą, skirtą įvairiems genams analizuoti ir apimantį 12 588 kiekvieno fragmento bazes visose 23 žmogaus chromosomose, siekiant patikrinti, ar tyrimu galima nuosekliai priskirti konkretaus mėginio genotipus, kai taikomi skirtingi indeksavimo pradmenų deriniai. Per antrąsias sekoskaitos serijas (dvi) buvo nustatyta aštuonių unikalios indeksuotų mėginių bibliotekų seka, siekiant patikrinti mažiausią palaikomą indeksų skaičių.

96 indeksų serijų metu kiekvieno iš 96 indeksų derinių SNV skirta PPA buvo 98,7–100 %, tarpų ir iškritų PPA – 100 %, o NPA – 100 %. 8 indeksų serijų metu kiekvieno iš aštuonių indeksų derinių PPA (SNV, tarpai ir iškritos) ir NPA vertės buvo 100 %.

Mėginių pernaša

Naudojant „NextSeq 550Dx“ prietaisą, vienos sekoskaitos serijos metu galima nustatyti kelių įprastų bei kontrolinių mėginių seką. Buvo atliktas tyrimas siekiant įvertinti mėginių pernašos mastą vienos sekoskaitos serijos metu ir tarp sekoskaitos serijų. Du „Platinum Genome“ mėginiai – vienas vyriškas ir vienas moteriškas – buvo ištirti atliekant reprezentatyvų tyrimą, skirtą įvairiems genams analizuoti ir apimantį 12 588 bazes (150 amplikonų) 23 skirtingose chromosomose, įskaitant abiejų lyčių chromosomas. Bibliotekų seka buvo nustatyta „NextSeq 550Dx“ prietaisu, naudojant genocitų variantų modulį. Vyriškų mėginių pernaša į moteriškus mėginius buvo stebima žiūrint, ar moteriškuose mėginiuose nuskaitoma Y chromosomos amplikonų.

Pernaša serijos metu gali įvykti generuojant sankaupas, priskiriant indekso ciklų bazes ir išskirstant mėginius. Siekiant ištirti mėginių pernašą sekoskaitos serijos metu, „NextSeq 550Dx“ prietaise vieną kartą buvo nustatyta bibliotekų telkinio, kurį sudarė 46 vyriškų mėginių ir 46 moteriškų mėginių replikatai bei keturios nešabloninės

kontrolinės medžiagos, seka. Mėginių pernaša serijos metu buvo įvertinta kiekvieno moteriško replikato Y chromosomos amplikonų aprėptį palyginant su visų telkinyje esančių vyriškų replikatų vidutine Y chromosomos amplikonų aprėptimi. Užfiksuotos pernašos serijos metu mediana buvo 0,084 %.

Siekiant iširti mėginių pernašą tarp serijų, buvo paruošti du bibliotekų telkiniai, kurių seka tada buvo nuosekliai nustatyta „NextSeq 550Dx“ prietaise. Pirmajame telkinyje buvo 46 moteriško mėginio replikatai ir du nešabloniniai kontroliniai mėginiai. Antrajame telkinyje buvo 46 vyriško mėginio replikatai ir du nešabloniniai kontroliniai mėginiai. Abiejuose telkiniuose buvo naudojami tie patys indekso adapteriai. Pirmiausia buvo nustatyta moteriško telkinio seka, tada buvo atlikta vyriško telkinio sekoskaitos serija, po kurios sekė dar viena kartotinė moteriško telkinio sekoskaitos serija. Mėginių pernaša tarp serijų buvo įvertinta Y chromosomos amplikonų aprėptį palyginant atitinkamuose kartotinės moteriško telkinio serijos ir vyriško telkinio serijos replikatuose. Užfiksuotos pernašos tarp serijų mediana buvo 0,0076 %.

DNR įvestis

Kraujas (genocitų linija)

Kraujo DNR įvesties intervalas „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ bibliotekai ruošti naudojant genocitinių variantų modulio darbo eigą buvo nustatytas „NextSeq 550Dx“ prietaisais. Šis intervalas įvertintas atliekant nuosekliojo praskiedimo tyrimą naudojant 13 „Platinum Genome“ mėginių; tai – reprezentatyvus tyrimas, skirtas įvairiems genams analizuoti, apimantis 12 588 bazes iš 23 skirtingų chromosomų. Bibliotekos seka buvo nustatyta dviejuose „NextSeq 550Dx“ prietaisuose, naudojant vieną „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) partiją.

Buvo iširti penki mėginiai po du egzempliorius, taikant penkis DNR įvesties lygius nuo 250 ng iki 12 ng (250 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng ir 12 ng). Aštuoni mėginiai buvo iširti naudojant vieną replikatą ir taikant kiekvieną iš penkių DNR įvesties lygių. Siekiant nustatyti tikslumą, mėginių genotipai buvo palyginti su „Platinum Genomes“ 2016-1.0 versija. Rezultatai buvo nustatyti kiekviename įvesties lygyje. Kiekvieno varianto tipo (SNV, intarpų ir iškritų) PPA pateikiama [lentelė 1](#); NPA pateikiama [lentelė 2](#). Visų įvesties lygių tikslumas buvo panašus.

Rekomenduojama „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ DNR įvestis yra 50 ng, o 25 ng ir 100 ng naudotinos kaip viršutinė ir apatinė ribos siekiant atitikti veikimo charakteristikas.

lentelė 1 Kiekvienos DNR įvesties PPA rezultatai pagal varianto tipą

DNR įvestis (ng)	Varianto tipas	Numatomi variantai	TP	FN	Variantų nepriskyrimai	PPA (%)
12	SNV	2412	2381	31	0	98,7
25			2404	8	0	99,7
50			2403	9	0	99,6
100			2412	0	0	100
250			2412	0	0	100

12	Intarpas	808	784	3	21	99,6
25			781	5	22	99,4
50			786	2	20	99,8
100			786	0	22	100
250			786	0	22	100
12	Iškrita	758	732	12	14	98,4
25			737	7	14	99,1
50			742	2	14	99,7
100			744	0	14	100
250			744	0	14	100

lentelė 2 Kiekvienos DNR įvesties NPA

DNR įvestis (ng)	TN	FP	Referencijos nepriskyrimai	NPA (%)
12	430940	4	26	>99,9
25	430936	0	34	100
50	430936	2	32	>99,9
100	430942	0	28	100
250	430942	0	28	100

FFPE (somatinis)

Buvo nustatytas „NextSeq 550Dx“ prietaiso formalinu fiksuotos, į parafiną įlietos DNR įvesties intervalas, naudojamas ruošiant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ biblioteką ir somatinių variantų modulio darbo eigą. DNR įvesties intervalas buvo įvertintas atliekant nuosekliojo praskiedimo tyrimą naudojant tris „Platinum Genome“ mėginius; tai – reprezentatyvus tyrimas, skirtas įvairiems genams analizuoti, apimantis 12 588 bazes iš 23 skirtingų chromosomų. „Platinum Genome“ ląstelių linijos GM12878 ir GM12877 buvo fiksuotos formaliniu ir įlietos į parafiną, o paskui buvo išskirta DNR. GM12878 buvo atskiesta GM12877 taip, kad 79 (55 SNV, 9 intarpai ir 15 iškritų) variantų alelių dažnio vertės (VAF) buvo artimos 0,025, 0,05 arba 0,10. Be to, kiekviename mėginyje buvo 91 iki 1,0 VAF aukštesnio dažnio variantas. Mėginiai buvo apdoroti po du egzempliorius, taikant penkis DNR įvesties lygius ir 2,1, 3,6, 4,6, 6,0 bei 7,8 vidutinį kiekybinio ciklo skirtumą (dCq), kuris išmatuotas naudojant „TruSeq Custom Amplicon Dx – FFPE QC“ rinkinį. Kiekvienos bibliotekos seka buvo nustatyta dviejuose „NextSeq 550Dx“ prietaisuose, naudojant dvi „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2 (300 ciklų) partijas. Siekiant nustatyti tikslumą, mėginių variantų priskyrimai buvo palyginti su „Platinum Genomes“ 2016-1.0 versija. Kiekvieno varianto tipo (SNV, intarpų ir iškritų) PPA pateikiama [lentelė 3](#); NPA pateikiama [lentelė 4](#). Rekomenduojama variantų, kurių VAF vertė yra 0,05 arba didesnė, DNR įvestis yra dCq ≤ 4, o 4,6 naudotina kaip apatinė riba siekiant atitikti veikimo charakteristikas.

lentelė 3 Kiekvienos DNR įvesties PPA rezultatai pagal varianto tipą

Vidutinis dCq	Varianto tipas	Numatomi variantai	Numatomi nepriskyrimai	Tikslinis skiedimo VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Variantų nepriskyrimai	PPA (%)	Variantų nepriskyrimai	PPA (%)	Variantų nepriskyrimai	PPA (%)
2,1	SNV	808	Netaikoma.	196	100	0	100	0	100
3,6				250	99,3	4	100	0	100
4,6				251	94,6	51	99,2	5	100
6,0				257	65,3	213	91,4	100	100
7,8				254	69,3	185	90,7	100	100
2,1	Intarpas	264	8	66	96,5	8	100	8	100
3,6				62	97,0	8	100	8	100
4,6				48	96,3	21	100	8	100
6,0				40	80,4	47	98,2	24	95,8
7,8				57	87,0	56	96,2	31	100
2,1	Iškrita	304	16	58	100	16	100	16	100
3,6				80	100	16	100	16	100
4,6				65	95,4	28	100	16	100
6,0				78	74,8	105	94,0	36	100
7,8				76	75,0	79	95,1	57	98,8

lentelė 4 Kiekvienos DNR įvesties NPA

Vidutinis dCq	Numatomas nemutantinis tipas	Tikslinis skiedimo VAF					
		0,025		0,05		0,10	
		Referencijos nepriskyrimai	NPA (%)	Referencijos nepriskyrimai	NPA (%)	Referencijos nepriskyrimai	NPA (%)
2,1	93688	344	100	260	100	324	100
3,6		400	100	332	100	380	100
4,6		1308	100	1336	100	784	100
6,0		3900	>99,9	3296	>99,9	2996	100
7,8		3020	>99,9	2880	>99,9	2448	>99,9

Analitinis jautris (tuščios vertės riba [LoB] ir aptikimo riba [LoD])

Šis tyrimas buvo atliktas siekiant įvertinti somatinių variantų modulio, naudojamo su „NextSeq 550Dx“ prietaisu, tuščios vertės ribą (LoB) ir aptikimo ribą (LoD). Tai buvo atliekama naudojant reprezentatyvų tyrimą, skirtą įvairiems genams analizuoti, apimantį 12 588 bazes iš 23 skirtingų chromosomų. „Platinum Genome“ ląstelių linijos GM12878 ir GM12877 buvo fiksuotos formalinu ir įlietos į parafiną, o paskui buvo išskirta DNR. GM12878 buvo atskiesta linija GM12877, kad 74 variantų (53 SNV, 7 intarpų ir 14 iškritų) dažniai būtų $0,05 \pm 0,02$. GM12877 ir atskiesta GM12878 (GM12878-D) buvo iširtos per šešias paleidimo dienas iš eilės, naudojant vieną instrumentą ir vieną „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) partiją keičiant kita; iš viso atliktos šešios sekoskaitos serijos. Atlikus šį tyrimą kiekvienoje reagentų partijoje gauta 60 kiekvieno GM12878-D varianto replikatų ir 72 kiekvienos atitinkamos nemutantinio tipo GM12877 koordinatės replikatai. LoB ir LoD buvo apskaičiuotos įprastu metodu, nurodytu CLSI EP17-A2 dokumente, naudojant neparametrinę parinktį. SNV, intarpų ir iškritų LoB bei LoD buvo apskaičiuotos atskirai, kaupiant konkretaus varianto tipo dažnius. I tipo klaida buvo apibrėžta kaip 0,01, o II tipo – kaip 0,05.

LoB atveju sukaupti variantų dažniai buvo surikiuoti nuo žemiausio iki aukščiausio ir buvo apskaičiuota 99-oji kiekvieno varianto tipo kiekvienos reagentų partijos klasifikacijos padėtis (lentelė 5). Kokybiniam variantų aptikimui nustatyti somatinių variantų modulis naudoja 0,026 VAF ribinę vertę (tikrąją LoB). Apskaičiavus LoB buvo patvirtinta, kad, taikant šią ribinę vertę, I tipo klaidos dažnis yra ne didesnis nei 0,01.

lentelė 5 Tuščios vertės riba

Varianto tipas	Iš viso stebėjimų	1-osios reagentų partijos LoB (%)	2-osios reagentų partijos LoB (%)
SNV	3816	0,77	0,77
Intarpas	504	0,56	0,56
Iškrita	1008	1,20	1,20

LoD atveju buvo apskaičiuota kiekvieno varianto tipo kiekvienos reagentų partijos atskiro mutacijos dažnio procentinė dalis, mažesnė nei ribinė 0,026 vertė (lentelė 6). Kadangi šios procentinės dalys buvo mažesnės už II tipo klaidos dažnį (5 %, 0,05), kaip LoD buvo apskaičiuota sujungtų variantų dažnių mediana (lentelė 6). Kaip kiekvieno varianto tipo LoD buvo paimta didesnioji iš apskaičiuotų dviejų reagentų partijų verčių – 4,97 % SNV atveju, 5,12 % – intarpų ir 5,26 % – iškritų.

lentelė 6 Aptikimo riba

Reagentų partija	Varianto tipas	Iš viso stebėjimų	VAF matavimų sk. < 2,6 %	VAF matavimų proc. < 2,6 %	Aptikimo riba (%)
1	SNV	3180	53	1,7	4,94
	Intarpas	420	6	1,4	5,08
	Iškrita	840	7	0,8	5,22

2	SNV	3180	51	1,6	4,97
	Intarpas	420	5	1,2	5,12
	Iškrita	840	7	0,80	5,26

Tikslumas

Genocitų linija

Tolesnis tyrimas buvo atliktas siekiant įvertinti „Germline“ variantų modulio „NextSeq 550Dx“ prietaisais, naudojamo su „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkiniu (300 ciklų), variantų priskyrimo tikslumą. Naudojant reprezentatyvų tyrimą, skirtą įvairiems genams analizuoti, apimantį 12 588 bazes (150 amplikonų) iš 23 skirtingų chromosomų, buvo ištirta 13 „Platinum Genome“ mėginių. Per penkias paleidimo dienas iš viso atliktos devynios serijos, naudojant tris sekoskaitos prietaisus, tris reagentų partijas ir tris operatorius. SNV, intarpų ir iškritų tikslumas buvo nustatytas rezultatus palyginant su išsamiai apibūdintu kompozitiniu referentiniu metodu („Platinum Genomes“ 2016-1.0 versija). Remiantis šiuo referentiniu metodu buvo apibrėžtos didelio pasikliovimo genomo sritys, nebent nurodyta kitaip.

lentelė 7 Genocitų linijos atitikties suvestinė

Kriterijai	Iš viso stebėjimų ¹	Rezultatas pagal stebėjimą ²	Rezultatas pagal seriją ³
SNV skirta PPA	819	98,7	>99,9
Intarpų PPA	819	95,0	98,9
Iškritų PPA	819	100	100
NPA	819	100	100
OPA	819	>99,9	>99,9

¹Apskaičiuojama kaip serijos mėginių skaičius (91) x serijų skaičius (9) = 819.

²Mažiausia pastebėta vertė pagal mėginio replikatą per visas 9 serijas.

³Mažiausia vertė, kai kiekvienos serijos duomenys analizuojami bendrai.

lentelė 8 pateikiami tyrimo duomenys su teigiama ir neigiama procentine atitiktimi kiekvieno mėginio atveju, o variantų rezultatai dėl PPA skaičiavimo palyginami su „Platinum Genomes“ 2016-1.0 versija. Trys variantų tipai (SNV, intarpai ir iškritos) sujungiami. Kadangi taikant referentinį metodą rezultatai gaunami tik apie vieno nukleotido variantus ir intarpus / iškritas, dėl NPA skaičiavimo ne variantų bazių rezultatai palyginami su žmogaus genomo referentinės sekos hg19 versija.

lentelė 8 Genocitų linijos atitiktis pagal mėginį

Mėginys	Vidutinis priskyrimo dažnis	Numatomi variantai ¹	TP	FN	Variantų nepriskyrimai	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12877	>99,9	4788	4788	0	0	756762	0	100	100	100
NA12878	>99,9	8505	8379	1	125	751464	0	>99,9	100	>99,9
NA12879	>99,9	6048	5985	5	58	757701	0	99,9	100	>99,9
NA12880	>99,9	6993	6930	0	63	757638	0	100	100	100
NA12881	>99,9	7875	7811	3	61	751653	0	>99,9	100	>99,9
NA12882	>99,9	6300	6174	3	123	754803	0	>99,9	100	>99,9
NA12883	>99,9	7119	7056	0	63	751905	0	100	100	100
NA12884	>99,9	7182	7119	6	57	754146	0	99,9	100	>99,9
NA12885	>99,9	7686	7560	2	124	754173	0	>99,9	100	>99,9
NA12886	>99,9	7245	7182	7	56	752469	0	99,9	100	>99,9
NA12887	>99,9	7119	7119	0	0	750645	0	100	100	100
NA12888	>99,9	6804	6804	0	0	756065	0	100	100	100
NA12893	>99,9	7434	7371	1	62	750015	0	>99,9	100	>99,9

¹ Bendrasis variantų skaičius visuose mėginių replikatuose per 9 serijas.

lentelė 9 pateikiami tyrimo duomenys kiekvieno mėginio atveju; variantų rezultatai palyginami su išsamiai apibūdintu kompozitiniu referentiniu metodu. Kiekvieno varianto tipo – SNV, intarpų ir iškritų – aptikimas įvertinamas atskirai. Referentinės padėtys neįtraukiamos.

lentelė 9 Genocitų linijos atitiktis pagal mėginį ir varianto tipą

Mėginys	SNVs			Intarpai			Iškritos		
	Numatoma	TP	FN	Numatoma	TP	FN	Numatoma	TP	FN
NA12877	2331	2331	0	1323	1323	0	1134	1134	0
NA12878	5733	5733	0	1260	1197	1	1512	1449	0
NA12879	3591	3591	0	1323	1260	5	1134	1134	0
NA12880	4221	4221	0	1512	1512	0	1260	1197	0
NA12881	4914	4913	1	1512	1449	2	1449	1449	0
NA12882	3717	3717	0	1386	1323	3	1197	1134	0
NA12883	4284	4284	0	1449	1449	0	1386	1323	0
NA12884	4284	4284	0	1575	1512	6	1323	1323	0

Mėginys	SNVs			Intarpai			Iškritos		
	Numatoma	TP	FN	Numatoma	TP	FN	Numatoma	TP	FN
NA12885	4725	4725	0	1575	1512	2	1386	1323	0
NA12886	4347	4347	0	1449	1386	7	1449	1449	0
NA12887	4284	4284	0	1323	1323	0	1512	1512	0
NA12888	4158	4158	0	1449	1449	0	1197	1197	0
NA12893	4599	4599	0	1386	1323	1	1449	1449	0

Buvo atlikta papildoma mėginių analizė, susijusi su mažų intarpų ir iškritų priskyrimu. Bendra suvestinė pateikiama [lentelė 10](#). Iš viso buvo 71 intarpas / iškrita, kurių dydis intarpų atveju buvo 1–24 bp, o iškritų atveju – 1–25 bp.

lentelė 10 Genocitų linijos intarpų / iškritų aptikimo suvestinė

Variantas Tipas	Numatomi variantai	TP	FN	Variantų nepriskyrimai	PPA
Intarpas	18522	18018	27	477	99,9
Iškrita	17388	17073	0	315	100

Reprezentatyvų tyrimą sudarė 150 amplikonų, skirtų įvairiam genomo turiniui apimti. Amplikonų GC turinio intervalas – 0,19–0,87. Be amplikonų, taip pat pasitaikė įvairių vienkartinų pasikartojančių nukleotidų (pvz., PolyA, PolyT), dinukleotidų ir trinukleotidų. Duomenys buvo kaupiami apie kiekvieną amplikoną (lentelė 11) siekiant nustatyti genomo turinio poveikį teisingų priskyrimų procentui. Teisingų priskyrimų procentą sudaro variantų ir referencijos priskyrimai; jei yra neteisingų priskyrimų arba kažkas nepriskiriama, šis procentas yra mažesnis už 100 %.

lentelė 11 Genocitų linijos amplikonų lygio tikslumas

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklovimo srityse	Amplikonų genomo turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
1	1	36450499	36450591	93	93	Intarpas / iškrita	0,22	76167	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), intarpas / iškrita	0,38	64701	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Intarpas / iškrita	0,4	74529	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Intarpas / iškrita	0,49	75348	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	66339	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), intarpas / iškrita	0,39	57330	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA (3), intarpas / iškrita	0,27	72072	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Intarpas / iškrita	0,28	73710	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Intarpas / iškrita	0,38	65520	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Netaikoma	0,65	66339	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	61425	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	72072	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), intarpas / iškrita	0,31	71253	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), intarpas / iškrita	0,3	74529	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Intarpas / iškrita	0,43	76167	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), intarpas / iškrita	0,42	59787	0	0	100

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklovimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), intarpas / iškrita	0,27	74823	0	1344	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Netaikoma	0,43	67977	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), intarpas / iškrita	0,49	57330	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	72072	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Intarpas / iškrita	0,57	60543	0	63	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	63882	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	79443	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Netaikoma	0,29	63882	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), intarpas / iškrita	0,36	50778	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	56511	0	0	100
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), intarpas / iškrita	0,27	50778	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Netaikoma	0,78	61425	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	68796	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Netaikoma	0,39	52416	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), intarpas / iškrita	0,3	67977	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	54873	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	74529	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Intarpas / iškrita	0,43	61425	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	83538	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Intarpas / iškrita	0,63	75348	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), intarpas / iškrita	0,61	76608	0	378	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	80262	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Intarpas / iškrita	0,53	77805	0	0	100

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklojimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	70434	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), intarpas / iškrita	0,61	76986	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	74529	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Netaikoma	0,44	59787	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Intarpas / iškrita	0,35	72072	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	71253	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Intarpas / iškrita	0,38	69615	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), intarpas / iškrita	0,62	73710	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), intarpas / iškrita	0,71	74529	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Netaikoma	0,31	54054	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Intarpas / iškrita	0,35	76167	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Netaikoma	0,42	67977	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), intarpas / iškrita	0,61	72171	0	720	99,0
53	8	76518625	76518691	67	67	Intarpas / iškrita	0,3	54873	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	80262	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Intarpas / iškrita	0,32	53235	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Netaikoma	0,49	78624	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	67977	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), intarpas / iškrita	0,68	79443	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), intarpas / iškrita	0,47	63882	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	74529	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	64701	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	73710	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Intarpas / iškrita	0,35	77805	0	0	100

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasikliovimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), intarpas / iškrita	0,42	71747	0	325	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Netaikoma	0,49	65520	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Netaikoma	0,51	66339	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Netaikoma	0,45	78624	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Intarpas / iškrita	0,46	57330	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Netaikoma	0,65	81900	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Intarpas / iškrita	0,37	50778	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Netaikoma	0,59	83538	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	59787	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Netaikoma	0,42	69615	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	74529	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Intarpas / iškrita	0,53	69615	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), intarpas / iškrita	0,34	69615	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	69615	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), intarpas / iškrita	0,52	68796	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	76167	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Netaikoma	0,49	66339	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	58149	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	77805	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Netaikoma	0,52	59787	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), intarpas / iškrita	0,22	72072	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Intarpas / iškrita	0,49	72891	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Intarpas / iškrita	0,39	63063	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	54873	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Netaikoma	0,25	67977	0	0	100

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasikliovimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), intarpas / iškrita	0,19	58642	0	326	99,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Intarpas / iškrita	0,38	66339	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Intarpas / iškrita	0,35	74529	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	54054	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Intarpas / iškrita	0,62	76986	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	78624	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Intarpas / iškrita	0,25	55692	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), intarpas / iškrita	0,68	76167	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	77805	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Intarpas / iškrita	0,65	58149	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Netaikoma	0,36	74529	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Intarpas / iškrita	0,56	57330	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Netaikoma	0,27	51597	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	77805	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	71253	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	85176	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), intarpas / iškrita	0,37	74529	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	72891	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), intarpas / iškrita	0,67	71247	0	6	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Intarpas / iškrita	0,46	74529	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Intarpas / iškrita	0,26	76167	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	72891	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), intarpas / iškrita (x2)	0,29	66343	27	788	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	74529	0	0	100

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklojimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), intarpas / iškrita	0,26	75348	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Intarpas / iškrita	0,41	64413	0	288	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	70434	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	68796	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	54873	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Netaikoma	0,37	74529	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	56511	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), intarpas / iškrita	0,37	61425	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), intarpas / iškrita	0,47	66339	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), intarpas / iškrita	0,45	69615	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Netaikoma	0,48	53235	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Netaikoma	0,59	81081	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Netaikoma	0,68	60605	1	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Netaikoma	0,64	57330	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Netaikoma	0,61	76986	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	67158	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	62244	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), intarpas / iškrita	0,46	57330	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Intarpas / iškrita	0,63	82719	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Intarpas / iškrita	0,36	54873	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	72072	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Intarpas / iškrita	0,57	71253	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Intarpas / iškrita	0,35	54054	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	80262	0	0	100

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasikliovimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), intarpas / iškrita	0,39	71253	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), intarpas / iškrita	0,32	56439	0	72	99,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	73710	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Intarpas / iškrita	0,63	81900	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Netaikoma	0,68	79443	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Intarpas / iškrita	0,46	79443	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Netaikoma	0,6	81081	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Intarpas / iškrita	0,66	75348	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	56511	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	56511	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Netaikoma	0,52	58149	0	0	100
148	Y	2655397	2655461	65	0	Netaikoma	0,55	0	0	0	Netaikoma
149	Y	2655519	2655609	91	0	Netaikoma	0,48	0	0	0	Netaikoma
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	Netaikoma

Mėginio NA12878 sekos nustatymo rezultatai buvo palyginti su didelio pasiklovimo lygio NA12878 genotipu, kurį nustatė Nacionaliniai standartų ir technologijų institutai (NIST) (2.19 v.). Iš 150 amplikonų 92 amplikonai buvo didelio pasiklovimo lygio genomo sričių ribose, 41 amplikonas su NIST seka persidengė iš dalies, o 17 amplikonų visiškai nepersidengė. Kaip palyginimas, buvo gauta 10 000 vieno replikato koordinatų. Ne variantų bazių priskyrimai buvo palyginti su žmogaus genomo referentinės sekos hg19 versija. Tikslumo rezultatai parodyti [lentelė 12](#).

lentelė 12 NA12878 mėginio genocitų linijos atitiktis NIST duomenų bazei

Mėginys	Amplikonų kiekis	Vidutinis priskyrimo dažnis	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	>99,9	6552	1	610470	0	>99,9	100	>99,9

Remiantis šio devynių serijų genocitų linijos tyrimo duomenimis, „NextSeq 550Dx“ prietaisas gali nuosekliai atlikti toliau nurodytas sekas.

- GC turinys $\geq 19\%$ (visos priskirtos bazės 819 nustatytos sekos amplikonų: 19 % GC turinio priskirta teisingai, o nepriskyrimo dažnis – 0,6 %)
- GC turinys $\leq 87\%$ (visos priskirtos bazės 819 nustatytos sekos amplikonų: 87 % GC turinio priskirta teisingai, o nepriskyrimo dažnis – 0 %)
- PolyA ilgiai ≤ 9 (visos priskirtos bazės 819 nustatytos sekos amplikonų su tinkamai priskirtais devyniais pasikartojančiais PolyA nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 0 %)
- PolyT ilgiai ≤ 10 (visos priskirtos bazės 819 nustatytos sekos amplikonų su tinkamai priskirtais dešimt pasikartojančių PolyT nukleotidų, o nepriskyrimo dažnis – 0 %)
- PolyG ilgiai ≤ 7 (visos priskirtos bazės 819 nustatytos sekos amplikonų su tinkamai priskirtais septyniais pasikartojančiais PolyG nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 1,0 %)
- PolyC ilgiai ≤ 6 (visos priskirtos bazės 2457 nustatytos sekos amplikonuose su tinkamai priskirtais šešiais pasikartojančiais PolyC nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 0 %)
- Pasikartojančių dinukleotidų ilgiai $\leq 11x$ (visos priskirtos bazės 819 nustatytos sekos amplikonų su tinkamai priskirtais 11x pasikartojančių dinukleotidų, o nepriskyrimo dažnis – 0,5 %)
- Pasikartojančių trinukleotidų ilgiai $\leq 5x$ (visos priskirtos bazės 819 nustatytos sekos amplikonų su tinkamai priskirtais 5x pasikartojančiais trinukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 0,5 %)
- Intarpo ilgiai ≤ 24 (66 343 iš 66 370 priskirtų bazių 819 nustatytos sekos amplikonų su tinkamai priskirtais įdėtais 24 nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 1,2 %; srityje, kurioje įdėti 24 nukleotidai, neteisingų priskyrimų nebuvo)
- Iškritos ilgiai ≤ 25 (visos priskirtos bazės 2457 nustatytos sekos amplikonuose su tinkamai priskirtais 25 ištrintais nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 0 %)

Somatinis

Naudojant čia aprašytą tyrimą buvo įvertintas „NextSeq 550Dx“ prietaisas somatinio variantų modulio, naudojamo su „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkiniu (300 ciklų), variantų priskyrimo tikslumas.

Tai buvo atliekama naudojant reprezentatyvų tyrimą, skirtą įvairiems genams analizuoti, apimantį 12 588 bazes (150 amplikonų) iš 23 skirtingų chromosomų. Iš FFPE apdorotų blokų buvo išskirta „Platinum Genome“ DNR, kad būtų generuoti šeši unikalūs mėginiai, vertintini tyrimo metu.

Mėginio GM12877 DNR buvo atskiesta mėginio GM12878 DNR ir buvo sukurti GM12877-D5 bei GM12877-D7 kaip unikalūs heterozigotiniai variantai, kurių dažnis artimas 5 % ir 7 %. Mėginio GM12878 DNR buvo panašiai atskiesta mėginio GM12877 DNR, taip sukuriant GM12878-D5 ir GM12878-D7. Kiekvienas iš mėginių buvo ištirtas po tris egzempliorius, išskyrus atskiestus mėginius, kurie buvo ištirti po šešis replikatus. Per penkias paleidimo dienas iš viso atliktos devynios serijos, naudojant tris sekoskaitos prietaisus, tris reagentų partijas ir tris operatorius. SNV, intarpų ir iškritų tikslumas buvo nustatytas rezultatus palyginant su išsamiai apibūdintu kompozitiniu referentiniu metodu („Platinum Genomes“ 2016-1.0 versija). Remiantis šiuo referentiniu metodu buvo apibrėžtos didelio pasiklovimo genomo sritys, nebent nurodyta kitaip.

lentelė 13 Somatinės atitikties suvestinė

Kriterijai	Iš viso stebėjimų ¹	Rezultatas pagal stebėjimą ²	Rezultatas pagal seriją ³
SNV skirta PPA	378	98,9	99,9
Intarpų PPA	378	96,9	99,9
Iškritų PPA	378	97,1	99,9
NPA	378	>99,9	>99,9
OPA	378	>99,9	>99,9

¹Apskaičiuojama kaip serijos mėginių skaičius (42) x serijų skaičius (9) = 378.

²Mažiausia pastebėta vertė pagal mėginio replikatą per visas 9 serijas.

³Mažiausia vertė, kai kiekvienos serijos duomenys analizuojami bendrai.

lentelė 14 pateikiami tyrimo duomenys su teigiama ir neigiama procentine atitiktimi kiekvieno mėginio atveju, o variantų rezultatai dėl PPA skaičiavimo palyginami su išsamiai apibūdintu kompozitiniu referentiniu metodu. Trys variantų tipai (SNV, intarpai ir iškritas) sujungiami. Kadangi taikant referentinį metodą rezultatai gaunami tik apie vieno nukleotido variantus ir intarpus / iškritas, dėl NPA skaičiavimo ne variantų bazių rezultatai palyginami su žmogaus genomo referentinės sekos hg19 versija.

lentelė 14 Somatinė atitiktis pagal mėginį

Mėginys	Vidutinis priskyrimo dažnis	Numatoma	TP	FN	Variantų nepriskyrimai	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	2052	2025	0	27	318682	15	100	>99,9	>99,9
GM12878	98,8	3645	3564	0	81	317645	0	100	100	100
GM12879	99,8	2592	2538	0	54	323614	2	100	>99,9	>99,9

Mėginys	Vidutinis priskyrimo dažnis	Numatoma	TP	FN	Variantų nepriskyrimai	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12884	99,8	3078	3024	0	54	322038	5	100	>99,9	>99,9
GM12885	99,8	3294	3213	0	81	322121	0	100	100	100
GM12888	99,8	2916	2889	0	27	323048	2	100	>99,9	>99,9
GM12877-D5	99,8	9288	8930	0	358	630621	0	100	100	100
GM12877-D7	99,7	9288	9032	0	256	629719	0	100	100	100
GM12878-D5	99,5	9288	8699	42	547	628582	0	99,5	100	>99,9
GM12878-D7	99,7	9288	9108	0	180	629803	0	100	100	100

lentelė 15 pateikiami tyrimo duomenys kiekvieno mėginio atveju; variantų rezultatai palyginami su išsamiai apibūdintu kompozitiniu referentiniu metodu. Kiekvieno varianto tipo – SNV, intarpų ir iškritų – aptikimas įvertinamas atskirai. Referentinės padėtyš neįtraukiamos.

lentelė 15 Somatinė atitiktis pagal mėginį ir varianto tipą

Mėginys	SNVs			Intarpai			Iškritos		
	Numatoma	TP	FN	Numatoma	TP	FN	Numatoma	TP	FN
GM12877	999	999	0	567	567	0	486	459	0
GM12878	2457	2457	0	540	513	0	648	594	0
GM12879	1539	1539	0	567	540	0	486	459	0
GM12884	1836	1836	0	675	648	0	567	540	0
GM12885	2025	2025	0	675	648	0	594	540	0
GM12888	1782	1782	0	621	621	0	513	486	0
GM12877-D5	5454	5392	0	1782	1647	0	2052	1891	0
GM12877-D7	5454	5406	0	1782	1728	0	2052	1898	0
GM12878-D5	5454	5192	28	1782	1651	9	2052	1856	5
GM12878-D7	5454	5445	0	1782	1719	0	2052	1944	0

Buvo atlikta papildoma dešimties mėginių analizė, susijusi su mažų intarpų ir iškritų priskyrimu (lentelė 16). Iš viso buvo 71 intarpas / iškrita, kurių dydis intarpų atveju buvo 1–24 bp, o iškritų atveju – 1–25 bp.

lentelė 16 Somatinių intarpų / iškritų aptikimo suvestinė

Variantų tipas	Numatomi variantai	TP	FN	Variantų nepriskyrimai	PPA
Intarpas	10773	10282	9	482	99,2
Iškrita	11502	10667	5	830	>99,9

150 amplikonų buvo skirta įvairiam genomo turiniui apimti. Amplikonų GC turinio intervalas – 0,19–0,87 %. Be amplikonų, taip pat pasitaikė įvairių vienkartinį pasikartojančių nukleotidų (pvz., PolyA, PolyT), dinukleotidų ir trinukleotidų. Duomenys buvo kaupiami apie kiekvieną amplikoną (lentelė 17) siekiant nustatyti genomo turinio poveikį teisingų priskyrimų procentui. Teisingų priskyrimų procentą sudaro variantų ir referencijos priskyrimai; jei yra neteisingų priskyrimų arba kažkas nepriskiriama, šis procentas yra mažesnis už 100 %.

lentelė 17 Somatinių amplikonų lygio tikslumas

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasikliovimo srityse	Amplikonų genomo turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
1	1	36450499	36450591	93	93	Intarpas / iškrita	0,22	35066	0	88	99,7
2	1	109465122	109465200	79	79	Poly A (5), Poly C (5), intarpas / iškrita	0,38	29827	0	35	99,9
3	1	218353867	218353957	91	91	Intarpas / iškrita	0,4	34202	0	283	99,2
4	1	223906657	223906748	92	92	Intarpas / iškrita	0,49	34613	0	163	99,5
5	1	228526602	228526682	81	81	Poly G (5)	0,69	30571	0	47	99,8
6	1	236372039	236372108	70	70	Poly T (10), intarpas / iškrita	0,39	26452	0	8	100,0
7	1	247812041	247812128	88	88	Poly A (5), CT(3), TAA (3), intarpas / iškrita	0,27	33148	0	116	99,7
8	2	55862774	55862863	90	90	Intarpas / iškrita	0,28	33928	0	92	99,7
9	2	87003930	87004009	80	80	Intarpas / iškrita	0,38	30218	0	22	99,9
10	2	177016721	177016805	85	81	Netaikoma	0,65	30616	0	2	>99,9
11	2	186625727	186625801	75	75	Poly A (8)	0,35	28017	0	499	98,3
12	2	190323504	190323591	88	88	Poly T (5)	0,42	33207	0	57	99,8
13	2	200796740	200796826	87	87	Poly T (5), intarpas / iškrita	0,31	32524	9	718	97,8
14	2	212245049	212245139	91	91	Poly T (5), Poly A (6), intarpas / iškrita	0,3	33972	0	456	98,7
15	2	228147052	228147144	93	93	Netaikoma	0,43	35051	0	103	99,7
16	2	235016350	235016422	73	73	Poly T (5), intarpas / iškrita	0,42	27459	0	136	99,5
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), intarpas / iškrita	0,27	34534	0	620	98,2

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklivimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
18	3	46620561	46620643	83	83	Netaikoma	0,43	31339	0	44	99,9
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), intarpas / iškrita	0,49	26373	0	87	99,7
20	3	189713161	189713248	88	88	Poly A (5), Poly T (5), Poly A (9), TG(3)	0,41	32829	0	857	97,5
21	3	190106030	190106104	75	74	Intarpas / iškrita	0,57	27925	0	47	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	Poly A (6)	0,26	29327	4	162	99,4
23	4	7780541	7780637	97	97	Poly G (6), Poly T (5), Poly A (5)	0,42	36585	0	117	99,7
24	4	15688604	15688681	78	78	Netaikoma	0,29	29427	0	57	99,8
25	4	56236521	56236586	66	62	Poly A (5), intarpas / iškrita	0,36	23356	5	75	99,7
26	4	102839244	102839314	71	69	Poly A (5)	0,46	25942	0	140	99,5
27	4	164446743	164446804	62	62	Poly A (7), intarpas / iškrita	0,27	22944	0	560	97,6
28	5	1882081	1882158	78	75	Netaikoma	0,78	28299	0	53	99,8
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	31658	0	94	99,7
30	5	41069808	41069871	64	64	Netaikoma	0,39	24120	0	72	99,7
31	5	74077114	74077196	83	83	Poly A (6), intarpas / iškrita	0,3	31297	0	77	99,8
32	5	147475343	147475409	67	67	Poly T (5)	0,37	25277	0	55	99,8
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	34308	0	90	99,7
34	5	155662213	155662287	75	75	Intarpas / iškrita	0,43	28266	0	163	99,4
35	6	6318713	6318814	102	102	Poly G (6)	0,68	38489	0	67	99,8
36	6	24949983	24950074	92	92	Intarpas / iškrita	0,63	34730	0	46	99,9
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), intarpas / iškrita	0,61	35057	0	483	98,6
38	6	32147987	32148084	98	98	Poly T (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	36647	0	406	98,9
39	6	32986864	32986958	95	95	Intarpas / iškrita	0,53	35681	0	238	99,3
40	6	33408498	33408583	86	86	Poly C (6)	0,7	32438	0	70	99,8

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasikliovimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
41	6	41647401	41647495	95	94	Poly G (5), intarpas / iškrita	0,61	35441	0	91	99,7
42	6	112435865	112435955	91	91	Poly A (5)	0,44	34354	0	44	99,9
43	7	22202076	22202148	73	73	Netaikoma	0,44	27575	0	28	99,9
44	7	66276100	66276187	88	88	Intarpas / iškrita	0,35	33060	0	213	99,4
45	7	77365735	77365821	87	87	Poly A (7), AG(4)	0,26	32423	0	489	98,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Intarpas / iškrita	0,38	32074	0	56	99,8
47	7	128533468	128533557	90	90	Poly G (5), intarpas / iškrita	0,62	33791	0	281	99,2
48	7	149503875	149503965	91	91	Poly G (6), Poly C (6), intarpas / iškrita	0,71	34316	0	82	99,8
49	7	154404519	154404599	81	66	Netaikoma	0,31	24901	0	47	99,8
50	7	156476507	156476599	93	93	Intarpas / iškrita	0,35	35067	0	87	99,8
51	8	1817312	1817394	83	83	Netaikoma	0,42	31365	0	9	>99,9
52	8	24811020	24811109	90	89	Poly G (7), CTC(4), intarpas / iškrita	0,61	32781	0	890	97,4
53	8	76518625	76518691	67	67	Intarpas / iškrita	0,3	25228	0	146	99,4
54	9	103054909	103055006	98	98	Poly G (6)	0,67	36968	0	76	99,8
55	9	105586150	105586214	65	65	Intarpas / iškrita	0,32	24472	0	100	99,6
56	9	107620823	107620918	96	96	Netaikoma	0,49	36203	0	85	99,8
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	31329	0	45	99,9
58	9	138995345	138995441	97	97	Poly C (6), intarpas / iškrita	0,68	36472	0	201	99,5
59	10	5987120	5987198	79	78	Poly G (5), intarpas / iškrita	0,47	29473	0	11	>99,9
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	34188	0	213	99,4
61	10	27317777	27317855	79	79	Poly T (5)	0,3	29843	0	19	99,9
62	10	33018351	33018440	90	90	Poly A (5), Poly T (5)	0,2	33968	0	68	99,8
63	10	45084159	45084253	95	95	Intarpas / iškrita	0,35	35829	0	81	99,8

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasikliovimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), intarpas / iškrita	0,42	32098	88	2048	93,8
65	10	101611250	101611329	80	80	Netaikoma	0,49	30217	0	28	99,9
66	10	118351373	118351453	81	81	Netaikoma	0,51	30531	0	96	99,7
67	11	8159816	8159912	97	96	Netaikoma	0,45	36105	0	192	99,5
68	11	30177648	30177717	70	70	Intarpas / iškrita	0,46	26318	0	153	99,4
69	11	47470345	47470444	100	100	Netaikoma	0,65	37785	0	24	99,9
70	11	59837679	59837740	62	62	Intarpas / iškrita	0,37	23368	0	68	99,7
71	11	64418856	64418957	102	102	Netaikoma	0,59	38546	0	10	>99,9
72	11	93529612	93529684	73	73	Poly A (5)	0,4	27516	0	78	99,7
73	11	101347052	101347136	85	85	Netaikoma	0,42	32083	0	48	99,9
74	11	102477336	102477426	91	91	Poly G (6)	0,55	34047	0	369	98,9
75	11	118406285	118406369	85	85	Intarpas / iškrita	0,53	32065	0	74	99,8
76	11	120357801	120357885	85	85	Poly A (5), CA(3), intarpas / iškrita	0,34	32083	0	47	99,9
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	32103	0	27	99,9
78	12	2834770	2834853	84	84	Poly C (5), intarpas / iškrita	0,52	31645	16	525	98,3
79	12	26811004	26811096	93	93	Poly A (7), AC(4)	0,33	34824	0	330	99,1
80	12	30881766	30881846	81	81	Netaikoma	0,49	30497	0	121	99,6
81	12	88474105	88474175	71	71	Poly A (6)	0,35	26773	0	65	99,8
82	12	120966872	120966966	95	95	Poly G (5)	0,68	35830	9	72	99,8
83	13	24167504	24167576	73	73	Netaikoma	0,52	27498	0	114	99,6
84	13	25816961	25817049	89	88	Poly A (5), Poly T (7), Poly A (7), intarpas / iškrita	0,22	32824	0	566	98,3
85	13	44880112	44880200	89	89	Intarpas / iškrita	0,49	33574	0	77	99,8
86	13	77665218	77665294	77	77	Intarpas / iškrita	0,39	29075	0	31	99,9
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3),TA(3)	0,39	25313	0	13	99,9
88	14	39517884	39517966	83	83	Netaikoma	0,25	31360	0	22	99,9

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasikliovimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
89	14	46958962	46959034	73	72	Poly T (5), intarpas / iškrita	0,19	26499	0	717	97,4
90	14	58050030	58050110	81	81	Intarpas / iškrita	0,38	30494	0	133	99,6
91	14	82390559	82390649	91	91	Intarpas / iškrita	0,35	34313	0	86	99,7
92	14	92549544	92549609	66	66	Poly A (5)	0,41	24555	0	1527	94,1
93	14	102808496	102808589	94	94	Intarpas / iškrita	0,62	35472	0	69	99,8
94	15	43170751	43170848	98	96	Poly C (5)	0,45	36264	0	24	99,9
95	15	63446149	63446216	68	68	Intarpas / iškrita	0,25	25667	0	37	99,9
96	15	77879807	77879901	95	93	Poly G (5), intarpas / iškrita	0,68	34745	0	432	98,8
97	15	81625334	81625428	95	95	Poly T (6)	0,43	35870	0	40	99,9
98	15	85438263	85438334	72	71	Intarpas / iškrita	0,65	26762	0	76	99,7
99	15	89817413	89817503	91	91	Netaikoma	0,36	34286	0	112	99,7
100	15	89864274	89864343	70	70	Intarpas / iškrita	0,56	26449	0	11	>99,9
101	16	1894910	1894972	63	63	Netaikoma	0,27	23809	0	5	>99,9
102	16	28997904	28997998	95	95	Poly C (5)	0,67	35860	0	50	99,9
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	32835	0	60	99,8
104	16	57954406	57954509	104	104	Poly C (5)	0,67	39177	0	144	99,6
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), intarpas / iškrita	0,37	34075	0	323	99,1
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	33632	0	11	>99,9
107	17	3594191	3594277	87	87	Poly C (5), intarpas / iškrita	0,67	32752	0	134	99,6
108	17	3970090	3970180	91	91	Intarpas / iškrita	0,46	34343	0	82	99,8
109	17	16084945	16085037	93	93	Intarpas / iškrita	0,26	35077	0	78	99,8
110	17	33998759	33998849	91	89	Poly T (5)	0,54	33553	0	89	99,7
111	17	39589691	39589774	84	82	Poly A (13), intarpas / iškrita (x2)	0,29	30554	53	2296	92,9
112	17	41244394	41244484	91	91	Poly A (5)	0,34	34360	0	38	99,9

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasikliovimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
113	17	45438866	45438957	92	92	Poly A (7), AT(3), AT(4), AT(4), intarpas / iškrita	0,26	34367	0	418	98,8
114	17	61502432	61502510	79	79	Intarpas / iškrita	0,41	29751	0	119	99,6
115	17	64023582	64023667	86	86	Poly T (7)	0,22	32176	0	340	99,0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	31604	7	141	99,5
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	25273	8	45	99,8
118	18	6980478	6980568	91	91	Netaikoma	0,37	34386	0	12	>99,9
119	18	9888026	9888094	69	69	Poly A (6), TG(3)	0,43	25692	0	399	98,5
120	18	38836999	38837073	75	75	Poly A (5), intarpas / iškrita	0,37	27923	0	893	96,9
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), intarpas / iškrita	0,47	30598	0	20	99,9
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), intarpas / iškrita	0,45	31969	0	161	99,5
123	18	59773996	59774060	65	65	Netaikoma	0,48	24531	0	48	99,8
124	19	625143	625241	99	99	Netaikoma	0,59	37298	0	124	99,7
125	19	18121418	18121491	74	74	Netaikoma	0,68	27881	0	109	99,6
126	19	18186574	18186643	70	70	Netaikoma	0,64	26442	0	26	99,9
127	20	746056	746149	94	94	Netaikoma	0,61	35501	0	31	99,9
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	30951	0	72	99,8
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	28686	0	42	99,9
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), intarpas / iškrita	0,46	26372	0	88	99,7
131	20	25278421	25278521	101	101	Intarpas / iškrita	0,63	38159	0	20	99,9
132	20	50897302	50897368	67	67	Intarpas / iškrita	0,36	25188	0	544	97,9
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	32969	0	309	99,1
134	20	62690860	62690946	87	87	Intarpas / iškrita	0,57	32818	0	77	99,8
135	21	30300823	30300888	66	66	Intarpas / iškrita	0,35	24758	9	181	99,2
136	21	33694176	33694273	98	98	Poly T (6), CA(3)	0,54	36902	0	160	99,6

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklivimo srityse	Amplikonų geno turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepriskyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), intarpas / iškrita	0,39	32841	0	48	99,9
138	21	46644924	46644992	69	69	Poly A (6), AG(3), intarpas / iškrita	0,32	25939	0	280	98,9
139	21	46705575	46705664	90	90	Poly T (5), Poly A (6)	0,5	33942	0	78	99,8
140	22	25750774	25750873	100	100	Intarpas / iškrita	0,63	37733	0	86	99,8
141	22	32439233	32439329	97	97	Netaikoma	0,68	36617	0	49	99,9
142	22	37409844	37409940	97	97	Intarpas / iškrita	0,46	36525	0	162	99,6
143	22	37637596	37637694	99	99	Netaikoma	0,6	37398	0	24	99,9
144	22	47081347	47081438	92	92	Intarpas / iškrita	0,66	34754	0	22	99,9
145	X	15870424	15870492	69	69	Poly T (5)	0,26	26046	0	36	99,9
146	X	135288543	135288611	69	69	Poly C (5)	0,62	26019	0	63	99,8
147	X	135290777	135290847	71	71	Netaikoma	0,52	26780	0	58	99,8
148	Y	2655397	2655461	65	0	Netaikoma	0,55	0	0	0	NA (netaikoma)
149	Y	2655519	2655609	91	0	Netaikoma	0,48	0	0	0	NA (netaikoma)
150	Y	2655609	2655679	71	0	Poly A (5)	0,37	0	0	0	NA (netaikoma)

Mėginio GM12878 sekoskaitos rezultatai buvo palyginti su didelio pasiklovimo lygio NA12878 genotipu, kurį nustatė Nacionaliniai standartų ir technologijų institutai (NIST) (2.19 v.). Iš 150 amplikonų 92 amplikonai buvo didelio pasiklovimo lygio genomo sričių ribose, 41 amplikonas su NIST seka persidengė iš dalies, o 17 amplikonų visiškai nepersidengė. Kaip palyginimas, buvo gauta 10 000 vieno replikato koordinatų. Ne variantų bazių priskyrimai buvo palyginti su žmogaus genomo referentinės sekos hg19 versija. Tikslumo rezultatai parodyti [lentelė 18](#).

lentelė 18 GM12878 mėginio somatinė atitiktis NIST duomenų bazei

Mėginys	Amplikonų kiekis	Vidutinis priskyrimo dažnis	TP	FN	TN	FP	PPA	NPA	OPA
GM12878	133	98,8	2808	0	258488	0	100	100	100

Remiantis šio devynių serijų somatinio tyrimo duomenimis, „NextSeq 550Dx“ prietaisais gali nuosekliai atlikti toliau nurodytas sekas.

- GC turinys ≥ 19 % (visos priskirtos bazės 378 nustatytos sekos amplikonuose: 19 % GC turinio priskirta teisingai, o nepriskyrimo dažnis – 2,6 %)
- GC turinys ≤ 87 % (visos priskirtos bazės 378 nustatytos sekos amplikonuose: 87 % GC turinio priskirta teisingai, o nepriskyrimo dažnis – 0,6 %)
- PolyA ilgiai ≤ 9 (visos priskirtos bazės 378 nustatytos sekos amplikonuose su tinkamai priskirtais devyniais pasikartojančiais PolyA nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 2,5 %)
- PolyT ilgiai ≤ 10 (visos priskirtos bazės 378 nustatytos sekos amplikonuose su tinkamai priskirtais dešimt pasikartojančių PolyT nukleotidų, o nepriskyrimo dažnis – mažesnis nei 0,1 %)
- PolyG ilgiai ≤ 6 (visos priskirtos bazės 2268 nustatytos sekos amplikonuose su tinkamai priskirtais šešiais pasikartojančiais PolyG nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 0,5 %)
- PolyC ilgiai ≤ 6 (visos priskirtos bazės 756 nustatytos sekos amplikonuose su tinkamai priskirtais šešiais pasikartojančiais PolyC nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 0,4 %)
- Pasikartojančių dinukleotidų ilgiai $\leq 4x$ (visos priskirtos bazės 1890 nustatytos sekos amplikonų su tinkamai priskirtais 4x pasikartojančių dinukleotidų, o nepriskyrimo dažnis – 0,9 %)
- Pasikartojančių trinukleotidų ilgiai $\leq 5x$ (visos priskirtos bazės 378 nustatytos sekos amplikonuose su tinkamai priskirtais 5x pasikartojančiais trinukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 1,4 %)
- Intarpo ilgiai ≤ 23 (visos priskirtos bazės 378 nustatytos sekos amplikonuose su tinkamai priskirtais 23 nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 0,8 %)
- Iškritos ilgiai ≤ 25 (visos priskirtos bazės 1134 nustatytos sekos amplikonuose su tinkamai priskirtais 25 ištrintais nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 0,7 %)

Preciziškumas

„NextSeq 550Dx“ prietaisas preciziškumas buvo nustatytas tiriant 13 unikalių „Platinum Genome“ mėginių, naudojant tris instrumentus, tris reagentų partijas ir tris operatorius, taip per penkias paleidimo dienas generuojant devynias sekoskaitos serijas. Reprezentatyvus tyrimas, mėginiai ir referentinis metodas yra tokie patys, kaip aprašyta genocitų linijos tikslumo tyrimo atveju. Preciziškumą lemiantys elementai buvo nustatyti atliekant nuokrypio komponentų analizę, kaip atsako kintamąjį naudojant VAF ir apskaičiuojant standartinius prietaiso, reagentų partijos, operatoriaus bei paleidimo dienos komponentų lygio nuokrypius ([lentelė 19](#)). Bendrasis stebėjimų, naudotų analizuojant kiekvieną prietaiso, operatoriaus ar reagentų partijos komponento kintamumą, skaičius SNV, intarpų ir iškritų atveju atitinkamai buvo 699, 176 ir 235.

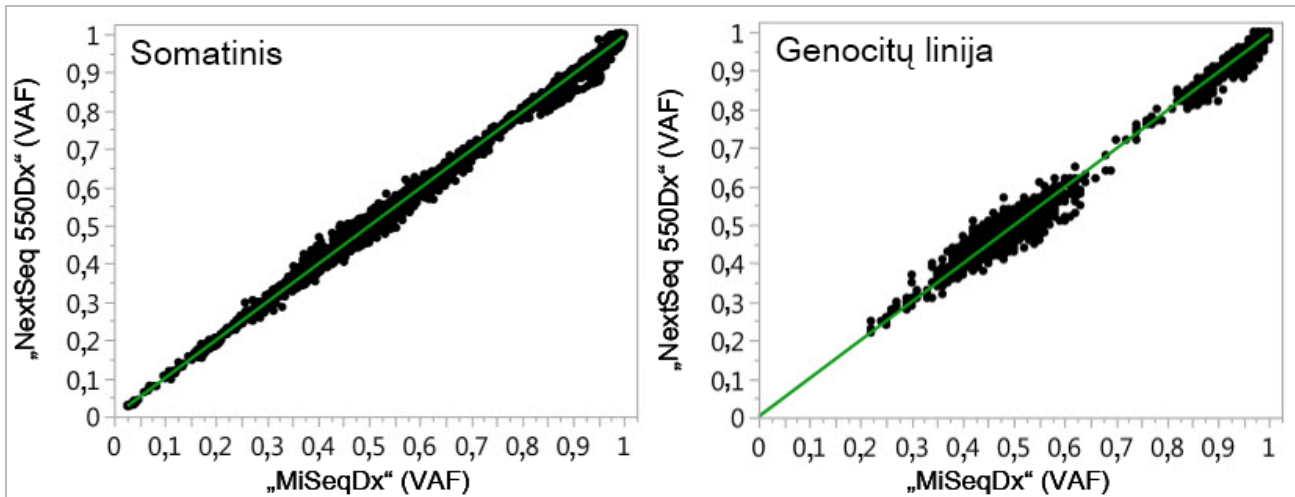
lentelė 19 „NextSeq 550Dx“ prietaiso preciziškumo rezultatai (standartinis nuokrypis)

Komponentas	Varianto tipas	Komponentų SD		Bendrasis SD	
		Didž.	Mediana	Didž.	Mediana
Partija	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Intarpas	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Iškrita	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187
Prietaisas	SNV	0,0114	0,0003	0,0840	0,0153
	Intarpas	0,0138	0,0009	0,0407	0,0161
	Iškrita	0,0079	0,0008	0,0549	0,0187
Operatorius	SNV	0,0226	0,0008	0,0841	0,0155
	Intarpas	0,0344	0,0010	0,0417	0,0164
	Iškrita	0,0083	0,0013	0,0547	0,0187
Diena	SNV	0,0277	0,0012	0,0825	0,0160
	Intarpas	0,0235	0,0012	0,0409	0,0169
	Iškrita	0,0271	0,0014	0,0548	0,0188

Metodų palyginimas (sekoskaitos platforma)

Viso kraujo ir FFPE mėginiai buvo įvertinti „NextSeq 550Dx“ prietaisas bei „MiSeqDx“ prietaisu, naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ genocitų linijos ir somatines darbo eigas. Kraujo ir FFPE mėginių variantų dažnio atitiktis buvo įvertinta naudojant kelis reprezentatyvius tyrimus. [pav. 2](#) parodyta VAF koreliacija tarp šių dviejų prietaisų atlikus vieną reprezentatyvų tyrimą, o [lentelė 20](#) koreliacija apibendrinama pagal tyrimų skydelį. Remiantis didele koreliacija tarp „MiSeqDx“ prietaiso ir „NextSeq 550Dx“ prietaisas, nustatyta, kad veikimo charakteristikos, susijusios su prieš analizę esančiais veiksniais (pvz., išskyrimo metodais ar trikdančiomis medžiagomis), yra taikytinos abiem prietaisams. Papildomą informaciją žr. „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ pakuotės lapelyje.

pav. 2 „MiSeqDx“ ir „NextSeq 550Dx“ prietaisų VAF koreliacija FFPE (kairėje) ir kraujo (dešinėje) mėginiams naudojant 1-ąjį tyrimą



lentelė 20 Metodų palyginimo rezultatai naudojant unikalius kraujo ir FFPE mėginius

gDNR šaltinis	Tyrimas (oligonukleotidų skydelis)	Biologiniai replikatai (mėginiai)	Techniniai replikatai (kiekvieno mėginio)	Stebėjimai (variantų sk.)	Statumas	Ašinė atkarpa	Koreliacija (R^2)
Kraujas	1-asis tyrimas	45	2	8369 ¹	0,992	0,002	0,995 ²
Kraujas	2-asis tyrimas	45	2	5457	0,995	0,005	0,981
FFPE	1-asis tyrimas	46	2	8319	0,993	0,000	0,997 ²
FFPE	3-iasis tyrimas	40	1	280	0,969	0,015	0,978

¹Du duomenų elementai buvo pašalinti remiantis nurodytu genocitinių variantų modulio ribotumu.

²2 pav. parodytų VAF diagramų nustatymo koeficientas.

Atkuriamumas

„NextSeq 550Dx“ prietaisas atkuriamumas buvo įvertintas naudojant „Platinum Genome“ mėginius su reprezentatyviu tyrimu, skirtu įvairiems genams analizuoti, apimantį 12 588 bazes iš 23 skirtingų chromosomų, kai naudojama 150 amplikonų. Genocitinius tyrimus sudarė septyni 13 mėginių replikatai; somatinius tyrimus sudarė šeši 7 mėginių replikatai, taikant skirtingą VAF lygį. Mėginiai buvo paruošti naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“.

Tyrimai buvo atlikti trijose išorinėse vietose, naudojant vieną „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) partiją. Kiekvienoje vietoje buvo naudojamas vienas „NextSeq 550Dx“ prietaisas. Kiekvienoje vietoje tyrimus atliko du operatoriai. Kiekvienas operatorius kiekvieno mėginio tipo tyrimus atliko tris paleidimo dienas ne iš eilės – trijose vietose iš viso buvo atliktos 36 serijos. Šių tyrimų metu buvo atlikta po 18 serijų genocitinei ir somatinei darbo eigai.

Genocitų linija

Genocitiniai variantai, kurių VAF lygis $\geq 0,2$, į ataskaitą įtraukiami kaip teigiami (variantai). Numatomų teigiamų genocitinių variantų atveju duomenys buvo įvertinti kiekvieno varianto tipo (SNV, intarpo, iškritos) nepriskyrimo dažnio ir teisingo teigiamo priskyrimo dažnio atžvilgiu. [lentelė 21](#) apibendrinami užfiksuoti kiekvieno varianto tipo dažniai, o apatinis ir viršutinis 95 % pasiklivimo lygis (LCL / UCL) apskaičiuotas naudojant „Wilson Score“ metodą.

lentelė 21 Genocitinių priskyrimų stebėjimai siekiant užfiksuoti numatomus teigiamus rezultatus pagal varianto tipą

Varianto tipas	Nepriskyrimas			Teisingas teigiamas priskyrimas				
	Užfiksuota	Iš viso	Procentas	Užfiksuota	Iš viso	Procentas	95 % LCL	95 % UCL
SNV	16	110,376	0,014	110,349	110,360	99,99	99,98	99,99
Intarpai	1026	37,044	2,77	36,018	36,018	100	99,99	100,00
Iškritos	648	34,776	1,86	34,128	34,128	100	99,99	100,00

Genocitiniai variantai, kurių VAF lygis $< 0,2$, į ataskaitą įtraukiami kaip neigiami (nemutantinio tipo). Numatomų neigiamų genocitinių vietų atveju duomenys buvo įvertinti nepriskyrimo dažnio ir teisingo nemutantinio tipo priskyrimo dažnio atžvilgiu. [lentelė 22](#) apibendrinami užfiksuoti dažniai, o apatinis ir viršutinis 95 % pasiklivimo lygis (LCL / UCL) apskaičiuotas naudojant „Wilson Score“ metodą.

lentelė 22 Genocitinių priskyrimų stebėjimai siekiant užfiksuoti numatomus neigiamus rezultatus

Varianto tipas	Nepriskyrimas			Teisingas neigiamas priskyrimas				
	Užfiksuota	Iš viso	Procentas	Užfiksuota	Iš viso	Procentas	95 % LCL	95 % UCL
Nemutantinio tipo	4883	19 600 182	0,025	19 595 299	19 595 299	100	100,00	100,00

Genocitiniai variantai, kurių VAF lygis $\geq 0,2$ ir $< 0,7$, yra vadinami varianto teigiamais heterozigotiniais, o variantai, kurių VAF lygis $\geq 0,7$, vadinami varianto teigiamais homozigotiniais. Naudojant genocitinius mėginius su heterozigotiniais variantais buvo nustatyta, ar savitasis tyrimo kintamumas turi įtakos genotipo priskyrimui. Buvo nustatytas abiejų ribinių verčių Cx (heterozigotinių genotipų atveju – 0,2, o homozigotinių – 0,7) (x yra ribinę vertę viršijančių pakartotinių tyrimų dalis). Kai apatinė ribinė vertė yra 0,2 VAF, Cx buvo $\geq 99,999\%$, o tai rodo, kad $\geq 99,999\%$ heterozigotinių variantų būtų vadinami heterozigotiniais. Atsižvelgiant į 0,7 VAF viršutinę ribinę vertę, Cx buvo $\leq 0,001\%$, o tai rodo, kad $\leq 0,001\%$ heterozigotinių variantų būtų vadinami homozigotiniais. [lentelė 23](#) rezultatai apibendrinami pagal varianto tipą.

Genocitiniai variantai, kurių VAF lygis $\geq 0,2$ ir $< 0,7$, yra vadinami varianto teigiamais heterozigotiniais, o variantai, kurių VAF lygis $\geq 0,7$, vadinami varianto teigiamais homozigotiniais. Naudojant genocitinius mėginius su heterozigotiniais variantais buvo nustatyta, ar savitasis tyrimo kintamumas turi įtakos genotipo priskyrimui. Buvo nustatytas abiejų ribinių verčių Cx (heterozigotinių genotipų atveju – 0,2, o homozigotinių – 0,7) (x yra

ribinę vertę viršijančių pakartotinių tyrimų dalis). Atsižvelgiant į 0,2 VAF apatinę ribinę vertę, Cx buvo $\geq 99,999\%$, o tai rodo, kad $\geq 99,999\%$ heterozigotinių variantų būtų vadinami heterozigotiniais. Kai viršutinė ribinė vertė buvo 0,7 VAF, Cx buvo $\leq 0,001\%$, o tai rodo, kad $\leq 0,001\%$ heterozigotinių variantų būtų vadinami homozigotiniais. [lentelė 23](#) rezultatai apibendrinami pagal varianto tipą.

lentelė 23 Heterozigotinių variantų genocitų linijos Cx vertės

Varianto tipas	Ribinė vertė – 0,2 VAF	Ribinė vertė – 0,7 VAF
	$\geq C99,999\%$	$\leq C0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Intarpai	24/24	24/24
Iškritos	35/35	35/35
Iš viso	153	153

Somatinis

Somatiniai variantai, kurių VAF lygis $\geq 0,026$, į ataskaitą įtraukiami kaip teigiami (variantai). Stebėjimai, kai VAF lygis $\geq 0,01$ ir $< 0,026$, šios analizės atžvilgiu buvo laikomi dviprasmiai (nei teigiamais, nei neigiamais, pažymėtais kaip žemo variantų dažnio). Siekiant įvertinti veikimą, rezultatai buvo apskaičiuoti trimis tolesniais būdais.

- Geriausias atvejis: Geriausias atvejis: bet koks dviprasmis rezultatas buvo laikomas teisingu teigiamu priskyrimu (atitinkančiu numatomus rezultatus)
- Blogiausias atvejis: Blogiausias atvejis: bet koks dviprasmis rezultatas buvo laikomas neteisingu priskyrimu (neatitinkančiu numatomų rezultatų)
- Neįtraukimo atvejis: Neįtraukimo atvejis: joks dviprasmis rezultatas nebuvo įtrauktas į analizę

Trijose lentelėse – [lentelė 24](#), [lentelė 25](#) ir [lentelė 26](#), priskyrimo rezultatai atitinkamai apibendrinami geriausiu atveju, blogiausiu atveju ir neįtraukimo atveju, bei pateikiami apatinis ir viršutinis 95 % pasiklovimo lygis (LCL / UCL), apskaičiuotas naudojant „Wilson Score“ metodą.

lentelė 24 Somatinių priskyrimų stebėjimai siekiant užfiksuoti numatomus teigiamus rezultatus pagal varianto tipą (geriausias atvejis)

Varianto tipas	Teisingas teigiamas priskyrimas				
	Užfiksuota	Iš viso	Procentas	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Intarpai	18 036	18 036	100	99,98	100,00
Iškritos	18 381	18 381	100	99,98	100,00

lentelė 25 Somatinių priskyrimų stebėjimai siekiant užfiksuoti numatomus teigiamus rezultatus pagal varianto tipą (blogiausias atvejis)

Varianto tipas	Teisingas teigiamas priskyrimas				
	Užfiksuota	Iš viso	Procentas	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Intarpai	18 000	18 036	99,8	99,72	99,86
Iškritos	18 381	18 381	100	99,98	100,00

lentelė 26 Somatinių priskyrimų stebėjimai siekiant užfiksuoti numatomus teigiamus rezultatus pagal varianto tipą (dviprasmiai priskyrimai pašalinti)

Varianto tipas	Teisingas teigiamas priskyrimas				
	Užfiksuota	Iš viso	Procentas	95 % LCL	95 % UCL
SNV	54 346	54 346	100	99,99	100,00
Intarpai	18 000	18 000	100	99,98	100,00
Iškritos	18 381	18 381	100	99,98	100,00

Somatiniai variantai, kurių VAF lygis $< 0,01$, į ataskaitą įtraukiami kaip neigiami (nemutantinio tipo) priskyrimai. Numatomų neigiamų somatinių vietų atveju duomenys buvo įvertinti nepriskyrimo dažnio ir teisingo nemutantinio tipo priskyrimo dažnio atžvilgiu. Teisingi nemutantinio tipo priskyrimai buvo nustatyti neįtraukiant nepriskyrimų ir iš bendrojo kiekio atimant užfiksuotus priskyrimus, patenkančius į dviprasmę zoną (VAF lygis $\geq 0,01$ ir $< 0,026$), bei neteisingus priskyrimus, viršijusius ribinę vertę (VAF lygis $\geq 0,026$). [lentelė 27](#) apibendrinami neigiamų somatinių vietų užfiksuoti, bendrieji ir procentiniai nepriskyrimo dažnio bei teisingų nemutantinio tipo priskyrimų dažnio rezultatai ir pateikiami apatinis bei viršutinis 95 % pasiklovimo lygiai (LCL / UCL), apskaičiuoti naudojant „Wilson Score“ metodą.

lentelė 27 Somatinių priskyrimų stebėjimai siekiant užfiksuoti numatomus neigiamus rezultatus

Varianta s Tipas	Nepriskyrimas			Teisingas priskyrimas						
	Užfiksuot a	Iš viso	Procenta s	Dviprasmi s	Neteising as	Teisinga s	Iš viso	Procenta s	95 % LCL	95 % UCL
Nemutantinio tipo	36 326	8 909 67 6	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 35 0	99,97	99,972	99,974

Buvo įvertinti to paties varianto somatiniai mėginiai taikant skirtingą VAF lygį, siekiant nustatyti tyrimo C95 (kiekvieno varianto tipo). Siekiant įvertinti kintamumą prie tyrimo ribinės vertės, buvo naudojami mėginiai, kurių numatomas VAF lygis – 0,02–0,07. Buvo nustatyta kiekvieno varianto C95 vertė, o didžiausia kiekvieno varianto tipo C95 vertė pateikta [lentelė 28](#).

lentelė 28 Somatinio C95 suvestinė

Varianto tipas	N	C95
SNV	74	0,0613
Intarpas	24	0,0573
Iškrita	33	0,0575

„NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) veiksmingumas

Apžvalga

„NextSeq 550Dx“ prietaisas suderinamas su dviem reagentų rinkiniais: „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkiniu (300 ciklų) ir „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkiniu (300 ciklų). Siekiant pademonstruoti, kad „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinys (300 ciklų) gali atitikti patvirtintus ir patikrintus „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) analitinio veiksmingumo reikalavimus, buvo atlikti tyrimai su „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkiniu (300 ciklų). Naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ buvo parengtos dvi bibliotekos, viena – naudojant genocitų linijos darbo eigą, o kita – somatinės linijos darbo eigą. Kiekvienos darbo eigos bibliotekos buvo išbandytos naudojant tris „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) partijas ir tris „NextSeq 550Dx“ prietaisus. Be to, bandant kiekvieną darbo eigą, viena serija buvo įtraukta naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų).

Analitinis jautris (tuščios vertės riba [LoB] ir aptikimo riba [LoD])

Patikra naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų) pademonstravo, kad „NextSeq 550Dx“ prietaisas prietaisas gali aptikti variantus esant 0,05 VAF, o II tipo klaidos dažnis yra $\leq 0,05$. Taip pat 0,026 VAF ribinė vertė, kurią naudoja somatinių variantų modulis (tikroji LoB) palaiko $\leq 0,01$ I tipo paklaidą. Remiantis šiais patvirtinimais numatoma, kad, esant 0,05 VAF, variantas už 0,026 VAF didesnis ar šiai vertei lygus yra 95 proc. atvejų, o nemutantinio tipo padėtis už 0,026 VAF yra mažesnė 99 proc. atvejų. Siekiant įsitikinti, kad šie patvirtinimai yra teisingi naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų), buvo pakartoti „NextSeq 550Dx“ prietaiso matavimai naudojant nemutantinio tipo mėginius (LoB mėginius) ir mėginius, kuriuose yra variantų esant 0,05 VAF (LoD mėginius), bei „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų). Aukščiau ir žemiau 0,026 VAF ribinės vertės esančių priskyrimų dalis tada buvo palyginta su patvirtinimais, nustatytais naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų).

Buvo bandomi du LoD mėginiai, kurių kiekvieno unikalių variantų rinkinio tikslinė vertė buvo 0,05 VAF, ir atitinkami LoB mėginiai, kurie tikslinių variantų atveju buvo nemutantinio tipo. Bibliotekoms paruošti naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ LoD ir LoB mėginiai buvo apdoroti, atitinkamai po aštuonis ir septynis. Bibliotekų sekoskaita iš pradžių buvo atlikta naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų), siekiant nustatyti variantus / genomo koordinatas, skirtus įvertinti LoB / LoD naudojant „NextSeq

550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų). LoD analizei (N = 51 variantas) buvo naudojami visi variantai, kurių vidutinė VAF vertė siekė 0,045–0,055 (LoD variantai), remiantis „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) rezultatais. LoB analizei buvo įvertinta 51 atitinkama geno koordinatė.

Siekiant įvertinti „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų), bibliotekų sekoskaita buvo atliekama trimis serijomis tris dienas iš eilės, naudojant tą patį prietaisą ir reagentų rinkinio partiją. Šie bandymai apėmė 24 kiekvieno iš 51 LoD variantų replikatus ir 21 kiekvienos iš atitinkamų nemutantinio tipo padėčių replikatą. Nemutantinio tipo priskyrimų, kurių VAF < 0,026, dalis nurodyta [lentelė 29](#). LoD variantų priskyrimų, kurių VAF yra didesnis už 0,026 arba šiai vertei lygus, dalis nurodyta [lentelė 30](#).

lentelė 29 Nemutantinio tipo padėčių priskyrimų, kurių VAF < 0,026, dalis (LoB patvirtinimų įvertinimas)

Variantas Tipas	Įvertintos padėtys	Iš viso stebėjimų	VAF matavimų numeris ≥ 2,6 %	Dalis < 2,6 %	Dalis – 95 % Pasiklovimo lygio intervalas
SNV	32	672	0	1	0,994–1
Intarpas	11	231	0	1	0,984–1
Iškrita	8	168	0	1	0,978–1

lentelė 30 LoD variantų priskyrimų, kai VAF ≥ 0,026, dalis (LoD patvirtinimų įvertinimas)

Variantas Tipas	Įvertintos padėtys	Iš viso stebėjimų	VAF matavimų numeris < 2,6 %	VAF matavimų numeris ≥ 2,6 %	Dalis ≥ 2,6 %	Dalis – 95 % Pasiklovimo lygio intervalas
SNV	32	768	1	767	0,999	0,993–1
Intarpas	11	264	3	261	0,989	0,967–0,996
Iškrita	8	192	2	190	0,99	0,963–0,997

Tikslumas

Genocitų linija

Buvo atliktas toliau nurodytas tyrimas, siekiant įvertinti variantų priskyrimo tikslumą, kai naudojamas genocitinių variantų modulis ir „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinys (300 ciklų). Reprezentatyvaus tyrimo metu buvo iširta dvylika unikalių „Platinum Genome“ mėginių. Naudojant tris „NextSeq 550Dx“ prietaisus ir tris „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinius (300 ciklų), iš viso buvo atlikta 11 serijų.

SNV, intarpų ir iškritų tikslumas buvo nustatytas rezultatus palyginant su išsamiai apibūdintu kompozitiniu referentiniu metodu („Platinum Genomes“ 2016-1.0 versija). Palyginimo tikslu pateikiami tikslumo rezultatai iš vienos sekoskaitos serijos, atliktos naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų). Rezultatų suvestinė pateikta [lentelė 31](#).

lentelė 31 Genocitų linijos atitikties suvestinė

Kriterijai	Iš viso stebėjimų (v2.5) ¹	Rezultatas pagal stebėjimą (v2.5) ²	Rezultatas pagal stebėjimą (v2) ³	Rezultatas pagal seriją (v2.5) ⁴	Rezultatas pagal seriją (v2) ⁴
SNV skirta PPA	1056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
Intarpų PPA	1056	100	100	100	100
Iškritų PPA	1056	95,2	95,2	>99,9	>99,9
NPA	1056	100	100	100	100
OPA	1056	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

¹Apskaičiuojama kaip serijos mėginių skaičius x serijų skaičius (96 serijos mėginiai x 11 serijų = 1056 stebėjimai).

²Mažiausia pastebėta vertė pagal mėginio replikatą per visas serijas (pagal 11 serijų, atliktų naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinį).

³Mažiausia pastebėta vertė pagal mėginio replikatą per 1 seriją (iš viso 96 stebėjimai).

⁴Mažiausia vertė, kai kiekvienos serijos duomenys analizuojami bendrai.

Somatinis

Atlikus toliau nurodytą tyrimą buvo įvertintas somatinių variantų modulio, naudojamo „NextSeq 550Dx“ prietaise su „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkiniu (300 ciklų), variantų priskyrimo tikslumas.

Atliekant reprezentatyvų tyrimą, buvo iširta dešimt „Platinum Genome“ FFPE mėginių (iš kurių dviejų mėginių variantai buvo atskiesti iki 0,05 VAF). Naudojant tris „NextSeq 550Dx“ prietaisus ir tris „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) partijas, iš viso buvo atlikta 11 serijų.

SNV, intarpų ir iškritų tikslumas buvo nustatytas rezultatus palyginant su išsamiai apibūdintu kompozitiniu referentiniu metodu („Platinum Genomes“ 2016-1.0 versija). Palyginimo tikslu pateikiami tikslumo rezultatai iš vienos sekoskaitos serijos, atliktos naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų). Rezultatų suvestinė pateikta [lentelė 32](#).

lentelė 32 Somatinės atitikties suvestinė

Kriterijai	Iš viso stebėjimų (ver. 2.5) ¹	Rezultatas pagal stebėjimą (ver. 2.5) ²	Rezultatas pagal stebėjimą (ver. 2) ³	Rezultatas pagal seriją (ver. 2.5) ⁴	Rezultatas pagal seriją (ver. 2) ⁴
SNV skirta PPA	528	100	100	100	100
Intarpų PPA	528	96,9	96,9	>99,9	>99,9

Iškritų PPA	528	100	100	100	100
NPA	528	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9
OPA	528	>99,9	>99,9	>99,9	>99,9

¹Apskaičiuojama kaip serijos mėginių skaičius x serijų skaičius (48 serijos mėginiai x 11 serijų = 528 stebėjimai).

²Mažiausia pastebėta vertė pagal mėginio replikatą per visas serijas (pagal 11 serijų, atliktų naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinį).

³Mažiausia pastebėta vertė pagal mėginio replikatą per 1 seriją (iš viso 96 stebėjimai).

⁴Mažiausia vertė, kai kiekvienos serijos duomenys analizuojami bendrai.

Preciziškumas

Genocitų linija

„NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2.5 (300 ciklų), naudojamo su genocitinių variantų moduliui, preciziškumas buvo įvertintas naudojant „Platinum Genome“ mėginius ir reprezentatyvų tyrimą. Tyrimo metu buvo paruošta viena biblioteka naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ ir iširta 12 mėginių, kurių buvo apdorota po aštuonis replikatus. Bibliotekų seka buvo nustatyta naudojant tris „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) partijas ir tris „NextSeq 550Dx“ prietaisus – iš viso atliktos devynios sekoskaitos serijos.

Naudojant mėginius su heterozigotiniais variantais buvo nustatyta, ar savasis tyrimo kintamumas turi įtakos genotipo priskyrimui (N = 153 unikalūs heterozigotiniai variantai). Buvo nustatytas abiejų genocitinių variantų modulio ribinių verčių Cx (heterozigotinių genotipų atveju – 0,2, o homozigotinių – 0,7) (x yra ribinę vertę viršijančių pakartotinių tyrimų dalis). Kai apatinė ribinė vertė yra 0,2 VAF, naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 reagentų rinkinį (300 ciklų) nustatytas mažiausios Cx vertės variantas buvo > 99,9 %, o tai rodo, kad > 99,9 % heterozigotinių variantų būtų vadinami heterozigotiniais. Kai viršutinė ribinė vertė yra 0,7 VAF, naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 reagentų rinkinį (300 ciklų) nustatytas didžiausios Cx vertės variantas buvo < 1,5 %, o tai rodo, kad ≤ 1,5 % heterozigotinių variantų būtų vadinami homozigotiniais. [lentelė 33](#) rezultatai apibendrinami pagal varianto tipą. Palyginimo tikslu pateikiamos Cx vertės iš vienos sekoskaitos serijos, atliktos naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų).

lentelė 33 Heterozigotinių variantų genocitų linijos Cx vertės

Varianto tipas	N	Ribinė vertė – 0,2 VAF		Ribinė vertė – 0,7 VAF	
		Maž. Cx (v2.5) ¹	Maž. Cx (v2) ²	Didž. Cx (v2.5) ¹	Didž. Cx (v2) ²
SNV	94	>99,9 %	>99,9 %	1,5 %	1,0 %
Intarpai	24	100 %	100 %	0 %	<0,1 %
Iškritos	35	100 %	>99,9 %	<0,1 %	<0,1 %

¹Cx vertės pagal bendrąjį standartinį nuokrypį atlikus nuokrypio komponentų analizę.

²Cx vertės pagal standartinius mėginių nuokrypius.

Somatinis

„NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų), naudojamo su somatinių variantų modulių, preciziškumas buvo įvertintas naudojant „Platinum Genome“ FFPE mėginius ir reprezentatyvų tyrimą. Tyrimo metu buvo paruošta viena biblioteka naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ ir ištirti du mėginiai, kurių buvo apdorota po aštuonis replikatus. Bibliotekų seka buvo nustatyta naudojant tris „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) partijas ir tris „NextSeq 550Dx“ prietaisus – iš viso atliktos devynios sekoskaitos serijos.

Naudojant somatinius variantus, kurių numatomas VAF lygis $\leq 0,10$ VAF (N = 131 unikalūs variantai), buvo įvertintas prietaiso kintamumas prie somatinių variantų modulio VAF ribinės vertės (somatiniai variantai, kurių VAF lygis $\geq 0,026$, yra vadinami teigiamais varianto atžvilgiu). Buvo nustatytos kiekvieno iš somatinių variantų C95 vertės. C95 vertės nurodo VAF, kuriam esant tikimybė, kad vertė bus didesnė už somatinių variantų modulio VAF ribinę vertę, yra 95 %. Didžiausios C95 vertės pagal varianto tipą pateikiamos [lentelė 34](#). Palyginimo tikslu pateikiami C95 rezultatai iš vienos sekoskaitos serijos, atliktos naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų).

lentelė 34 Somatinio C95 suvestinė

Varianto tipas	Įvertintų variantų kiekis	C95 (2.5 versija) ¹	C95 (v2) ²
SNV	74	0,064	0,063
Intarpai	24	0,062	0,061
Iškritos	33	0,060	0,060

¹C95 vertės pagal bendrąją standartinę nuokrypį atlikus nuokrypio komponentų analizę.

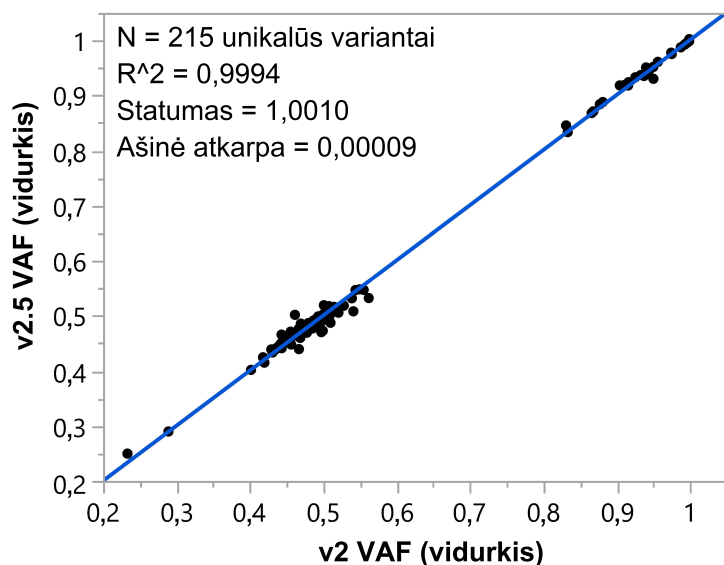
²C95 vertės pagal standartinius mėginių nuokrypius.

Metodų palyginimas (reagentų rinkinys)

Genocitų linija

Vidutinės 215 unikalių variantų VAF vertės buvo įvertintos naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų) ir „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų) bei rezultatus, kuriuos sugeneravo genocitinių variantų modulis. VAF vidurkiai buvo apskaičiuoti atlikus 11 sekoskaitos paleidimų su ver. 2.5 ir vieną sekoskaitos paleidimą su ver. 2. Kiekvieno varianto vidurkiui apskaičiuoti buvo naudojami mažiausia aštuoni replikatai. [pav. 3](#) parodyta VAF koreliacija tarp šių dviejų reagentų rinkinių. Remiantis didele tiesine abiejų reagentų rinkinių VAF koreliacija ir rezultatų panašumu, nustatyta, kad veikimo charakteristikos, iš pradžių patvirtintos ir patikrintos naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų) bei genocitinių variantų modulį, yra taikytinos „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkiniui (300 ciklų).

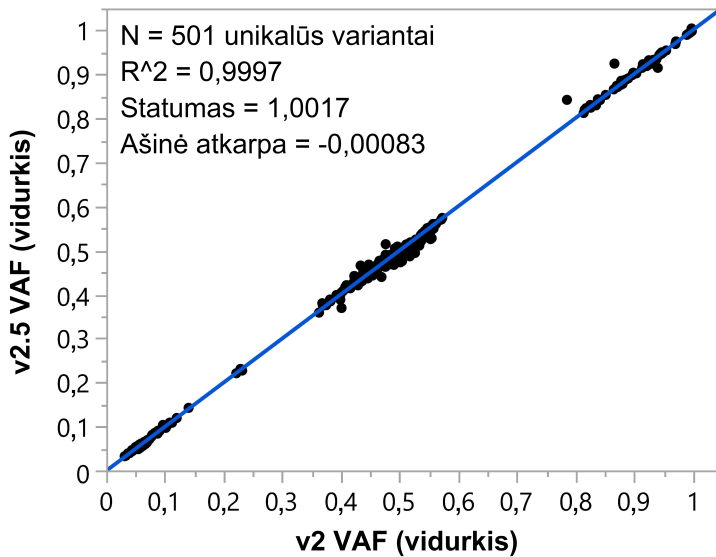
pav. 3 Genocitinių variantų modulio alelių dažnio (VAF) koreliacija tarp „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) ir „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų).



Somatinis

Vidutinės 501 unikalios varianto VAF vertės buvo įvertintos naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų) ir „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų) bei rezultatus, kuriuos sugeneravo somatinių variantų modulis. VAF vidurkiai buvo apskaičiuoti atlikus 11 sekoskaitos paleidimų su ver. 2.5 ir vieną sekoskaitos paleidimą su ver. 2. Kiekvieno unikalios varianto vidurkiui apskaičiuoti buvo naudojami mažiausia trys replikatai. pav. 4 parodyta VAF koreliacija tarp šių dviejų reagentų rinkinių. Remiantis abiejų reagentų rinkinių VAF koreliacija ir rezultatų panašumu, nustatyta, kad veikimo charakteristikos, patvirtintos ir patikrintos naudojant „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinį (300 ciklų) bei somatinių variantų modulį, yra taikytinos „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkiniui (300 ciklų).

pav. 4 Somatinių variantų modulio alelių dažnio (VAF) koreliacija tarp „NextSeq 550Dx“ ver. 2 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų) ir „NextSeq 550Dx“ ver. 2.5 didelio našumo reagentų rinkinio (300 ciklų).



Keitimo istorija

Dokumentas	Data	Keitimo aprašymas
Dokumento Nr. 200031448 v00	2023 m. birželis	<p>Pirmasis leidimas.</p> <p>Ankstesnis dokumentas 1000000030326, pakeistas šiuo.</p> <p>Šio naujo dokumento 1000000030326 v6 pakeitimai:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pridėtas turinys, palaikantis pasirenkamą „illumina DRAGEN Server“, skirtą „NextSeq 550Dx“. • Atnaujintas oro filtro dalies numeris. <p>Anksčiau atlikti dokumento 1000000030326 pakeitimai:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Atnaujinimai, atlikti siekiant ištaisyti netyčia iš šaltinio programinės įrangos pridėtą turinį. • Pridėta informacija „Įspėjimai ir atsargumo priemonės“, susijusi su pranešimu apie rimtus incidentus. • Pridėta informacija apie procedūros principų, kurioje nurodytas numatytas naudotojas. • Pašalinta nuoroda į didelio našumo reagentų rinkinį, 2 versija (300 ciklų). • Pridėta nuoroda į didelio našumo reagentų rinkinį, 2.5 versija (75 ciklai). • Pridėta lentelė „Keitimo istorija“. Atnaujintas įgaliotojo atstovo ES adresas.

Patentai ir prekės ženklai

Šis dokumentas ir jo turinys priklauso „Illumina, Inc.“ ir jos filialams („Illumina“), jis skirtas tik klientui naudoti pagal sutartį, kiek tai susiję su čia aprašyto(-ų) produkto(-ų) naudojimu, ir jokių kitų tikslų. Šis dokumentas ir jo turinys negali būti naudojami ar platinami jokių kitų tikslų ir (arba) kitaip negali būti pateikiami, atskleidžiami ar atkuriami kokiu nors būdu be išankstinio rašytinio „Illumina“ sutikimo. „Illumina“ šiuo dokumentu neperduoda jokios trečiosios šalies licencijos pagal jos patentą, prekės ženklą, autorių ar kitas teises.

Kvalifikuotas ir tinkamai išmokytas personalas turi griežtai ir aiškiai vadovautis šiame dokumente pateiktomis instrukcijomis, kad būtų užtikrintas tinkamas ir saugus šiame dokumente aprašyto(-ų) produkto(-ų) naudojimas. Prieš naudojant tokį(-ius) produktą(-us), visas šis dokumentas turi būti įdėmiai perskaitytas ir suprastas.

JEI NEBUS PERSKAITYTOS VISOS ČIA PATEIKTOS INSTRUKCIJOS IR JOMIS NEBUS VADOVAUJAMASI, GALIMAS PRODUKTO(-Ų) PAŽEIDIMAS, NAUDOTOJO BEI KITŲ ASMENŲ SUŽEIDIMAS IR ŽALA KITAI NUOSAVYBEI, BE TO, TAI PANAIKINA PRODUKTUI(-AMS) TAİKOMOS GARANTIJOS GALIOJIMĄ.

„ILLUMINA“ NEPRISIIMA JOKIOS ATSAKOMYBĖS, JEI ČIA APRAŠOMAS(-I) PRODUKTAS(-AI) (ĮSKAITANT DALIS IR PROGRAMINĘ ĮRANGĄ) NAUDOJAMAS(-I) NETINKAMAI.

© 2023 „Illumina, Inc.“. Visos teisės saugomos.

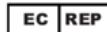
Visi prekių ženklai priklauso „Illumina, Inc.“ ar kitiems savininkams. Daugiau informacijos apie prekių ženklus žr.

www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinė informacija



„Illumina“, Inc.
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 JAV
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (ne Šiaurės Amerikoje)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Užsakovas Australijoje

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

Gaminio ženklavimas

Visą informaciją apie gaminių pakuočių ir etikečių simbolius rasite simbolių paaiškinimo lentelėje, pateiktoje svetainės support.illumina.com skirtuke „Documentation“ (dokumentacija).