

# Sada reagensií NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů)

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO

Katalogové č. 20028871

## Účel použití

Sada reagensií Illumina NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) je sada reagensií a spotřebních materiálů určených pro sekvenování knihoven vzorků při provádění validovaných rozborů. Tato sada je určena k použití s analytickým softwarem a přístrojem NextSeq 550Dx.

## Principy postupu

Sada reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) je speciální sada reagensií a spotřebních materiálů určená k jednorázovému použití při sekvenování v přístroji NextSeq 550Dx. Jako vstup tato sada reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) používá knihovny vytvořené z DNA, kdy se indexy vzorků a zachycené sekvence připojují k amplifikovaným cílům. Knihovny vzorků se zachytí v průtokové kyvetě a jsou přístrojem sekvenovány pomocí technologie syntézy sekvenováním (SBS). Technologie SBS využívá metodu reverzibilního terminátoru k detekci fluorescenčně značených jednotlivých nukleotidových bází tak, jak se začleňují do rostoucích řetězců DNA. Počet knihoven vzorků závisí na multiplexaci podporované upstream metodou přípravy knihovny.

V příložené dokumentaci k přístroji *NextSeq 550Dx* je uveden návod na provádění sekvenace na přístroji NextSeq 550Dx.

Výkonnostní charakteristiky a omezení postupu pro sadu reagensií NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) byly stanoveny pomocí modulů Germline Variant (Varianty zárodečné linie) a Somatic Variant (Somatické varianty) softwaru Local Run Manager.

## Omezení postupu

- 1 Určeno k diagnostice *in vitro*.
- 2 Assay Software neřadí čtení s indely (inzerce, delecemi nebo kombinacemi), jejichž délka obsahu je >25 bázových párů (bp). Proto indely o délce >25 bp nejsou pro Assay Software zjistitelné.
- 3 Assay Software nemusí řadit čtení amplikonů s extrémním obsahem, což má za následek, že daná oblast se vykáže jako divoký typ. Takovýto extrémní obsah zahrnuje:
  - ▶ Čtení obsahující více než tři indely
  - ▶ Čtení o délce minimálně 30 bp s obsahem jednonukleotidové varianty (SNV) >4 % celkové cílové délky amplikonu (kromě oblastí sondy)
  - ▶ Čtení o délce <30 bp s obsahem SNV >10 % celkové délky amplikonu (včetně oblastí sondy)
- 4 Velké varianty, včetně vícenukleotidových variant (MNV) a velkých indelů, mohou být ve výstupním souboru VCF vykázány jako samostatné menší varianty.
- 5 Varianty delecí mohou být při přemostění dvou překrývajících amplikonů filtrovány nebo opomenuty, je-li délka delece větší než překryv mezi překrývajícími amplikony, nebo se mu rovná.

- 6 Systém nedokáže detekovat indely, pokud sousedí přímo s primerem a není zde žádný překrývající amplicon. U oblastí s překrývajícími amplicony rozbor nedokáže detekovat delece, pokud je oblast překrytí menší než velikost delece, která se má detekovat. Pokud například oblast překrytí dvou sousedících ampliconů zahrnuje dvě báze, rozbor nedokáže detekovat žádné delece včetně těchto dvou bází. Delece jedné báze na kterékoliv z těchto bází zjištěna být může.
- 7 Podobně jako u jakéhokoliv pracovního postupu přípravy knihovny na bázi hybridizace mohou vlastní polymorfismy, mutace, inserce či delece ve vazebných oblastech oligonukleotidů ovlivnit alely, na něž sonda cílí, a tedy i signály uskutečněné v průběhu sekvenování. Příklad:
  - ▶ Varianta ve fázi s variantou v oblasti primeru nemusí být amplifikována, což má za následek falešně negativní výsledek.
  - ▶ Varianty v oblasti primeru by mohly zabránit amplifikaci referenční alely, což by vedlo k nesprávnému signálu homozygotní varianty.
  - ▶ Varianty indelů v oblasti primeru mohou způsobit falešně pozitivní volání na konci čtení přilehlého k primeru.
- 8 Pokud se indely vyskytnou poblíž konce jednoho čtení a během seřazení se jemně připnou, lze je kvůli vychýlení vláken filtrovat.
- 9 Malé MNV se nepotvrdí a jsou vykázané pouze v modulu pro analýzu somatických variant.
- 10 Delece se vykážou ve VCF na souřadnici předcházející báze v souladu s formátem VCF. Proto se v případech přílehlých variant musí zvážit, než se vykáže, že signál individuální báze je homozygotní reference.
- 11 Omezení specifická pro germinální postup:
  - ▶ Přístroj NextSeq 550Dx používající modul Germline Variant softwaru Local Run Manager pro NextSeq 550Dx je určen k poskytování kvalitativních výsledků volání germinálních variant (např. homozygotních, heterozygotních, divokého typu).
  - ▶ Při použití s modulem pro analýzu germinálních variant je pro přesné volání variant potřeba minimální pokrytí na amplicon 150x. V důsledku toho je potřeba 150 podpůrných fragmentů DNA, což odpovídá 300 překrývajícím se pair-end čtením. Počet vzorků a celkový cílený počet bází ovlivňuje pokrytí. Pokrytí může být ovlivněno obsahem GC a jiným genomickým obsahem.
  - ▶ Zda bude varianta identifikována jako homozygotní nebo heterozygotní, může být ovlivněno variabilitou počtu kopií.
  - ▶ Varianty v určitém opakujícím se kontextu se vyfiltrují do souborů VCF. Pro filtrování variant v případech, kdy se celá nebo částečná sekvence varianty objevuje v referenčním genomu přílehlým k pozici varianty opakovaně, se používá filtr opakování R<sub>M</sub>xN. V případě signálu varianty zárodečné linie vyžaduje filtrace varianty minimálně devět opakování v referenci, přičemž se zohlední pouze opakování o délce do 5 bp (R<sub>5</sub>x9).
  - ▶ Vyskytuje-li se v jednom lokusu indel a SNV, může to vést k tomu, že se vykáže pouze jedna varianta.
- 12 Specifická omezení týkající se somatických variant:
  - ▶ Přístroj NextSeq 550Dx používající modul Somatic Variant softwaru Local Run Manager pro NextSeq 550Dx je navržen tak, aby poskytoval kvalitativní výsledky signálu somatických variant (např. přítomnost somatické varianty s četností varianty  $\geq 0,026$  s limitem detekce 0,05).
  - ▶ Při použití s modulem pro analýzu somatických variant je pro přesné volání variant potřeba minimální pokrytí na amplicon 450x na oligonukleotidový fond. Na jeden fond oligonukleotidů je tedy zapotřebí 450 podpůrných fragmentů DNA, což odpovídá 900 překrývajícím se pair-end čtením. Počet vzorků a celkový cílený počet bází ovlivňuje pokrytí. Pokrytí může být ovlivněno obsahem GC a jiným genomickým obsahem.
  - ▶ U volání somatických variant je pro filtrování varianty potřeba alespoň šest opakování v referenci, přičemž se berou v úvahu pouze opakování o délce max. 3 bp (R<sub>3</sub>x6).
  - ▶ Modul pro analýzu somatických variant nedokáže rozlišit mezi germinálními a somatickými variantami. Modul je určen k detekování variant v celé řadě frekvencí variant, ale frekvenci variant nelze použít k rozlišení somatických variant od germinálních variant.
  - ▶ Detekci variant ovlivňuje normální tkáň ve vzorku. Vykázaná mez detekce je založená na frekvenci variant vzhledem k celkové DNA izolované z nádoru a z normální tkáně.

## Komponenty sady reagensů

Každá komponenta sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) se dodává v samostatné krabici. Komponenty ihned uskladněte při určených teplotách, aby byla zajištěna jejich správná funkce. Níže je uveden seznam komponent sady reagensů.

Tabulka 1 Komponenty sady reagensů

Komponenta	Množství	Objem plnění	Popis	Skladování*
Zásobník s reagensy NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklů)	Po jedné	Různé	Reagencie pro tvorbu klastrů a sekvenování	-25 až -15 °C
Zásobník s pufrům NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklů)	Po jedné	Různé	Pufrovaný a promývací roztok	15 až 30 °C
Zásobník s průtokovou kytetou NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklů)	Po jedné	Není k dispozici	Skleněná průtoková kyveta pro paired-end sekvenování k jednorázovému použití	2 až 8 °C
Sada s příslušenstvím NextSeq 550Dx Accessory Box (300 cyklů)	1 zkušavka	12 ml	Pufr pro diluci knihovny	-25 až -15 °C

\*Zásobník s průtokovou kytetou NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklů) se přepravuje při teplotě okolního prostředí.

## Číslo šarží

Sada reagensů je označena jedním číslem šarže, které se nazývá číslo šarže sady reagensů. Číslo šarže sady reagensů je vytištěno na každé krabici v sadě reagensů. Komponenty sady reagensů, jež jsou v krabíčkách uloženy, jsou označeny vytištěnými čísly šarže konkrétních komponent, která se od čísla šarže sady reagensů liší. Spotřební materiál pro sekvenování skladujte v původních krabíčkách, dokud nebude použit, aby se zachovalo spojení mezi sadou a šarží. Údaje o katalogových číslech a číslech šarží jsou uvedeny v analytickém certifikátu.

## Skladování a manipulace

- 1 Pokojová teplota je definována jako 15 až 30 °C.
- 2 Komponenty sady reagensů jsou stabilní, pokud jsou uskladněny při uvedených teplotách skladování, do data expirace uvedeného na štítku.
- 3 Sada s příslušenstvím NextSeq 550Dx a zásobník s reagensy NextSeq 550Dx jsou stabilní maximálně po jednom rozmrazení na pokojovou teplotu před uvedeným datem expirace. Zásobník s reagensy je stabilní po dobu 6 hodin po rozmrazení ve vodní lázni pokojové teploty. Alternativně lze zásobník s reagensy rozmrazit při teplotě 2 až 8 °C max. 5 dní před použitím.
- 4 Změny fyzického vzhledu reagensů mohou znamenat poškození materiálů. Dojde-li ke změně fyzického vzhledu po smísení, například ke zjevným změnám barvy reagensů nebo výskytu zákalu typického pro mikrobiální kontaminaci, reagenzie nepoužívejte.

## Požadované vybavení a materiály, prodávané samostatně

- ▶ NextSeq 550Dx Instrument, katalogové č. 20005715

## Varování a preventivní opatření



### UPOZORNĚNÍ

Podle federálních zákonů se prodej tohoto zdravotnického prostředku omezuje na prodej lékařem nebo jiným držitelem povolení k používání tohoto zdravotnického prostředku či vystavení poukazu na tento prostředek v daném státě nebo na prodej na základě jimi vystaveného poukazu.

- 1 Sada reagensí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů) obsahuje potencionálně nebezpečné chemikálie. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagensy nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi.
- 2 Informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete na bezpečnostních listech (SDS) na stránce [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).
- 3 Neprodleně nahlaseť veškeré závažné události související s tímto produktem společnosti Illumina a příslušným orgánům členských států, ve kterých působí uživatel a pacient.
- 4 Nedodržení uvedených postupů může vést k chybným výsledkům nebo významnému snížení kvality vzorku.
- 5 Dodržujte běžná laboratorní preventivní opatření. Nepipetujte ústy. Ve vyhrazených pracovních prostorech nejezte, nepijte ani nekuřte. Při manipulaci se vzorky a reagensy rozboru používejte jednorázové rukavice a laboratorní pláště. Po manipulaci se vzorky a reagensy rozboru si důkladně umyjte ruce.
- 6 Dodržujte postupy správné laboratorní praxe a hygieny, aby nedošlo ke kontaminaci reagensí, nástrojů a genomických vzorků DNA produkty PCR. Kontaminace PCR může vést k nepřesným a nespolehlivým výsledkům.
- 7 Aby se zabránilo kontaminaci, zajistěte, aby vybavení v pre-amplifikačních a post-amplifikačních prostorách (např. pipety, špičky pipet, vortexová třepačka a odstředivka) bylo dedikované.

## Návod k použití

Viz příložená dokumentace k přístroji *NextSeq 550Dx* a příslušné referenční příručky.

## Výkonnostní charakteristiky

Viz příložená dokumentace k přístroji *NextSeq 550Dx*.

## Historie revizí

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 1000000073349 v03	Listopad 2021	Byla přidána část Varování a preventivní opatření týkající se hlášení závažných událostí. Byla přidána tabulka historie revizí.

## Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah je vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. a jejích přidružených společností (dále jen „Illumina“). Slouží výlučně zákazníkovi ke smluvním účelům v souvislosti s použitím zde popsanych produktů a k žádnému jinému účelu. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen za žádným jiným účelem ani jinak sdělován, zveřejňován či rozmnožován bez předchozího písemného souhlasu společnosti Illumina. Společnost Illumina nepředává tímto dokumentem žádnou licenci na svůj patent, ochrannou známku, autorské právo či práva na základě zvykového práva ani žádná podobná práva třetích stran.

Pokyny v tomto dokumentu musí být důsledně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a řádně proškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsanych produktů. Veškerý obsah tohoto dokumentu musíte před použitím takových produktů beze zbytku přečíst a pochopit.

NEDODRŽENÍ POŽADAVKU NA PŘEČTENÍ CELÉHO TEXTU A NA DŮSLEDNÉ DODRŽOVÁNÍ ZDE UVEDENÝCH POKYNŮ MŮŽE VÉST K POŠKOZENÍ PRODUKTŮ, PORANĚNÍ OSOB, AŤ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A POUVEDE KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.

SPOLEČNOST ILLUMINA NA SEBE NEBERE ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽITÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ DÍLŮ TĚCHTO PRODUKTŮ NEBO SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejich příslušných vlastníků. Informace o konkrétních ochranných známkách naleznete na adrese [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Kontaktní údaje



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Kalifornie 92122 U.S.A.

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)

[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)



Illumina Netherlands B.V.

Steenoven 19

5626 DK Eindhoven

Nizozemsko

### Australský sponzor

Illumina Australia Pty Ltd

Nursing Association Building

Level 3, 535 Elizabeth Street

Melbourne, VIC 3000

Austrálie

## Štítky na produktech

Úplné vysvětlení symbolů, které se mohou objevit na balení a označení produktů, naleznete v přehledu symbolů pro vaši sadu na adrese [support.illumina.com](http://support.illumina.com).