

„NextSeq™ 550Dx“ prietaisas

NAUDOTI „IN VITRO“ DIAGNOSTIKAI
TIK EKSPORTUI

Katalogo Nr. 20005715

Numatytoji paskirtis

„NextSeq 550Dx“ prietaisas yra skirtas DNR bibliotekų sekoskaitai, kai jos naudojamos su *in vitro* diagnostikos tyrimais. „NextSeq 550Dx“ prietaisą reikia naudoti su konkrečiais registruotaisiais, sertifikuotaisiais 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. „NextSeq 550Dx“ naudoja bibliotekas, sukurtas iš DNR, kur mėginio indeksai ir užfiksuotos sekos pridamos prie amplifikuotų taikinių. Mėginių bibliotekos užfiksuojamos pratekamojoje kiuvetėje ir jų sekos nustatomos prietaise naudojant sekos nustatymą sintezės (SBS) chemijos būdu. Sekoskaitos sintezės metu (SBS) naudojamas ciklinio grįžtamojo blokavimo metodas siekiant aptikti fluorescenciškai pažymėtas pavienių nukleotidų bazes, kurios yra įtrauktos į augančias DNR grandines. Analizės realiuoju laiku (RTA) programinė įranga atlieka vaizdo analizę ir bazių priskyrimą bei kiekvienai kiekvieno sekoskaitos ciklo bazei priskiria kokybės balą. Pasibaigus pirminei analizei, prietaise galima vykdyti antrinę analizę bazių priskyrimams apdoroti. „NextSeq 550Dx“ naudoja skirtingus antrinės analizės modulius – tai priklauso nuo darbo eigos. Naudojant „Germline“ ar „Somatic“ 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.

Dvigubo paleidimo konfigūracija

Į „NextSeq 550Dx“ įtraukta dvigubo paleidimo konfigūracija, kad prietaisą būtų galima naudoti diagnostikos (Dx) arba tik moksliniams tyrimams skirtu (RUO) režimu. *In vitro* diagnostikos sekoskaitos tyrimai, įskaitant „Germline“ ir „Somatic“ variantų modulius, vykdomi diagnostikos režimu. Diagnostikos režimu galima naudoti tik IVD sekoskaitos reagentus. „NextSeq 550Dx“ prietaiso veikimo charakteristikos ir apribojimai nustatyti diagnostikos režimu naudojant „Germline“ ir „Somatic“ variantų modulius.

Procedūros apribojimai

- 1 Naudoti *in vitro* diagnostikai.
- 2 „Germline“ ir „Somatic“ variantų modulius naudojant su „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkiniu v2 (300 ciklų) ar „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkiniu v2.5 (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 didesnę 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 intarpų / iškritų.
- 4 Tyrimo programinė įranga gali nesulygiuoti amplikonų nuskaitymų, kurių turinys yra itin didelis, todėl sritis gali būti laikoma 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 intarpų / 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 kokioje 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:
 - ▶ 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.
 - ▶ Intarpų / 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 „Somatic“ 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 „Germline“ apribojimai
 - ▶ „NextSeq 550Dx“ prietaisas, naudojantis „Local Run Manager“ „Germline“ variantų modulį, skirtą „NextSeq 550Dx“, yra sukurtas kiekybiniais gonocitų linijos variantų priskyrimo rezultatams pateikti (pvz., homozigotiniam, heterozigotiniam, nemutantinio tipo).
 - ▶ Naudojant kartu su „Germline“ variantų moduliui, 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 pagal galus suporuotų 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 „Somatic“ apribojimai.
 - ▶ „NextSeq 550Dx“ prietaisas, naudojantis „Local Run Manager“ „Somatic“ variantų modulį, skirtą „NextSeq 550Dx“, yra skirtas somatinių variantų iškvietimo kiekybiniais rezultatams pateikti (pvz., somatinis variantas, kurio varianto dažnis yra $\geq 0,026$, o aptikimo riba yra 0,05).

- ▶ Naudojant kartu su „Somatic“ variantų moduliui, mažiausia reikalinga aprėptis vienam amplitonui, kad būtų gautas tikslaus varianto priskyrimas, yra 450x vienam oligonukleotidų telkiniui. Dėl to reikia 450 suderinamų DNR fragmentų oligonukleotidų telkiniui, o tai priylgsta 900 persidengiančių pagal galus suporuotų nuskaitymų. Mėginių skaičius ir bendras tikslių 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).
- ▶ „Somatic“ 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. Į ataskaitą įtraukta aptikimo riba yra pagrįsta santykinio varianto dažniu, nustatytu pagal visą DNR, gautą iš naviko ir normalaus audinio.

Produkto komponentai

- 1 „NextSeq 550Dx“ prietaisas (katalogo Nr. 20005715)
- 2 „NextSeq 550Dx“ prietaiso programinės įrangos komponentai, įskaitant nurodytus toliau.

Programa	Funkcija	Aprašas
„NextSeq 550Dx“ operacinė programinė įranga (NOS)	Valdo prietaiso veikimą	NOS programa valdo prietaiso veikimą sekoskaitos metu ir generuoja vaizdus, skirtus naudoti analizės realiuoju laiku (RTA) programinei įrangai.
Analizės realiuoju laiku (RTA) programinė įranga	Atlieka pirminę analizę	RTA programa kiekvienos išklotinės 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	„Local Run Manager“ programinė įranga yra į prietaisą integruotas sprendimas, skirtas naudotojams tvarkyti, atitinkamam analizės moduliui pasirinkti ir būsenai stebėti.
„Somatic Variant“ 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.
„Germline Variant“ 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.

Naudojimo sąlygos

Elementas	Specifikacija
Temperatūra	Laboratorijoje turi būti palaikoma 19–25 °C (22° C ± 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, parduodama 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 sekos nustatymo serijoms vykdyti

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

Prietaiso priežiūrai skirtos naudotojo pateikiamos eksploatacinės medžiagos

Eksploatacinė medžiaga	Tiekėjas	Paskirtis
NaOCl, 5 % (natrio hipochloritas)	„Sigma-Aldrich“, katalogo Nr. 239305 (arba laboratorinis atitikmuo)	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. 20022240	Oro, kurį prietaisas naudoja aušinti, valymas

Laboratorinio vandens gairės

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

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

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

DĖMESIO Pagal federalinius įstatymus šį prietaisą leidžiama parduoti ar užsakyti tik gydytojui ar kitam specialistui, kuriam išduota licencija naudoti ar užsakyti prietaiso naudojimo paslaugą pagal valstijos, kurioje jis (ji) verčiasi medicinos praktika, įstatymus.

- 1 Kai kuriuose reagentų, kuriuos „Illumina“ teikia naudoti su „NextSeq 550Dx“ prietaisu, komponentuose yra cheminių medžiagų, kurios gali būti pavojingos. Pavojus žmogui kyla įkvėpus, nurijus, patekus 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 lapuose (SDS) adresu support.illumina.com/sds.html.
- 2 Apie rimtus nelaimingus atsitikimus, susijusius su šia medžiaga, 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 imunodeficitu virusu (ŽIV), žmogaus hepatito B virusu (HBV) ir kitais krauju pernešamais patogeniniais agentais (bendros atsargumo priemonės).
- 4 Nesilaikant nurodytų procedūrų, rezultatai gali būti klaidingi arba gali gerokai pablogėti mėginių kokybė.
- 5 Laikykitės įprastų laboratorinių atsargumo priemonių. Nesiurbkite pipetės burna. Darbo vietoje nevalgykite, negerkite ir nerūkykite. Dirbdami su mėginiais ir rinkinių reagentais, mūvėkite vienkartinės pirštines bei dėvėkite laboratorinius chalatus. 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. Nesutampant mėginių ir plokštelės išdėstymo rezultatams, prarandama teigiamų mėginių identifikacija ir pateikiami neteisingi rezultatai.
- 9 Siekiant kompiuterį apsaugoti nuo virusų, naudotojui primygtinai rekomenduojama įdiegti savo 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 jis nukristų ar būtų netinkamai naudojamas.

Naudojimo instrukcijos

Toliau pateiktos naudojimo instrukcijos taikytinos „NextSeq 550Dx“ prietaise diagnostikos režimu paleidus „Germline“ ir „Somatic“ variantų modulius, naudojant „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų) arba „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2.5 (300 ciklų).

Serijos informacijos įvedimas

Išsamias instrukcijas žr. „NextSeq 550Dx“ prietaiso informaciniame vadove (dokumento Nr. 100000009513) ir atitinkamame „Local Run Manager“ modulio vadove.

Parametrų nustatymas

- 1 Prisijunkite prie „Local Run Manager“.
- 2 Pasirinkite **Create Run** (kurti seriją) ir **Somatic Variant** arba **Germline Variant**.
- 3 Įveskite vykdymo pavadinimą, pagal kurį vykdymas bus identifikuojamas nuo sekos nustatymo iki analizės. Naudokite raides, skaitmenis, tarpus, pabraukimo brūkšnius ar brūkšnelius.
- 4 **[Pasirinktinai]** Įveskite vykdymo aprašą, padedantį identifikuoti vykdymą. Naudokite raides, skaitmenis, tarpus, pabraukimo 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-ojo indeksų rinkinio.

- ▶ Indeksų rinkinio skaičiai nurodo skirtingus i5 ir i7 indeksų porų rinkinius. „Set 1“ (1 rinkinys) ir „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 sąraše nėra, pasirinkite panašiausią, bet mažesnę 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.

Serijos deklaracijos failų importavimas

- 1 Patikrinkite, ar deklaracijos, kurias norite importuoti, prieinamos pasiekiamoje tinklo vietoje arba USB atmintuke.
- 2 Pasirinkite **Import Manifests** (importuoti deklaracijas).
- 3 Raskite deklaracijos failą ir pasirinkite deklaracijas, kurias norite įtraukti.


PASTABA Kad deklaracijų failai būtų prieinami visoms serijoms, kurios vykdomos naudojant „Somatic Variant“ arba „Somatic Variant“ analizės modulį, deklaracijas įtraukite naudodami funkciją „Module Settings“ (modulio nuostatos). Norint naudotis šia funkcija, reikia turėti administratoriaus lygio teises. Daugiau informacijos žr. „NextSeq 550Dx“ prietaiso informaciniame vadove (dokumento Nr. 100000009513).

Mėginių priskyrimas vykdymui


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

- ▶ **Enter samples manually** (įvesti mėginius neautomatiškai) – naudokite tuščią lentelę ekrane „Create Run“ (kurti seriją).
- ▶ **Import samples** (importuoti mėginius) – suraskite išorinį kableliais atskirtų verčių (*.csv) formato failą. Ekrane „Create Run“ (kurti seriją) galima atsisiųsti šabloną.

Neautomatinis mėginių įvedimas

- 1 Įveskite unikalų mėginio pavadinimą („**Somatic Variant**“ analizės modulis) arba mėginio ID („**Germline Variant**“ analizės modulis).
Naudokite raides, skaitmenis, brūkšnelius arba pabraukimo brūkšnius.
- 2 **[Pasirinktinai]** Naudodami 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.
- 3 **[Pasirinktinai]** Lauke „Sample Description“ (mėginio aprašas) įveskite mėginio aprašą.
Naudokite raides, skaitmenis, brūkšnelius arba pabraukimo brūkšnius.
- 4 Išskleidžiamajame sąraše „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 sąraše nėra, būtina pasirinkti papildomiems šulinėliams skirtus indeksų adapterius.
- 5 Išskleidžiamajame sąraše „Index 2“ (2-asis indeksas) (i5) pasirinkite 2-ojo indekso adapterį.
- 6 Išskleidžiamajame sąraše „Manifest“ (deklaracija) pasirinkite deklaracijos failą.
„Pool A“ (A telkinys) esantiems mėginiams reikalingas kitas deklaracijos failas, nei naudojamas „Pool B“ (B telkinys) mėginiams.
- 7 Pasirinkite atitinkamą parinktį, jei norite peržiūrėti, išspausdinti ar išsaugoti plokštelės išdėstymą, kad juo būtų galima remtis rengiant 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.
- 8 Pasirinkite **Save Run** (išsaugoti vykdymą).

Mėginių importavimas

- 1 Pasirinkite **Import Samples** (importuoti mėginius) ir eikite į mėginio informacijos failo vietą. Galima importuoti dviejų rūšių failus.
 - Ekране „Create Run“ (kurti vykdymą) pasirinkite **Template** (šablonas), kad sukurtumėte naują plokštelės šabloną. Šablono faile pateikiamos tinkamos importuotinos stulpelių antraštės. Kiekviename stulpelyje įveskite vykdymo mėginių informaciją. Ištrinkite informaciją nenaudojamuose langeliuose ir išsaugokite failą.
 - Naudokite mėginio informacijos failą, kuris buvo eksportuotas iš „Germline Variant“ arba „Somatic Variant“ modulio, naudodami funkciją „Export“ (eksportuoti).
- 2 Norėdami pamatyti plokštelės išdėstymą, pasirinkite piktogramą  **Print** (spausdinti).
- 3 Pasirinkite **Print** (spausdinti), kad išspausdintumėte plokštelės išdėstymą, kuris bus naudojamas ruošiant bibliotekas.
- 4 Pasirinkite **Save Run** (išsaugoti vykdymą).

Reagentų kasetės paruošimas

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

- 1 Išimkite reagentų kasetę iš saugyklos, kurioje temperatūra yra nuo -25°C 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 papildomo laiko atšildyti.

- 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, kurioje palaikoma nuo 2 iki 8 °C temperatūra.
- 2 Pašalinkite pakavimo plėvelę nuo dėžutės ir padėkite kambario temperatūroje 30 minučių.

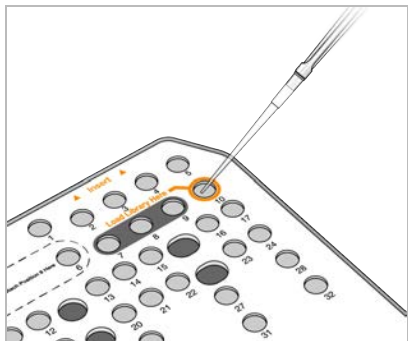
Bibliotekų parengimas nustatyti seką

Denatūruokite ir atskieskite bibliotekas iki įdėjimo tūrio – 1,3 ml. Praktikoje įdėjimo koncentracija gali skirtis pagal bibliotekos paruošimą ir kokybės įvertinimo metodus. Mėginio bibliotekų skiedimas priklauso nuo oligonukleotidų telkinių kompleksavimo. Nurodymus, kaip paruošti mėginio bibliotekas nustatyti seką, įskaitant bibliotekos skiedimą ir telkimą, žr. taikytino bibliotekos paruošimo rinkinio naudojimo instrukcijoje. „NextSeq 550Dx“ prietaise 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 švariu 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.

1 pav. Bibliotekų įdėjimas



Sekoskaitos serijos nustatymas

- 1 Prisijunkite prie „NextSeq 550Dx“ naudodami savo „Local Run Manager“ programinės įrangos slaptažodį.
- 2 Pagrindiniame NOS programinės įrangos ekrane pasirinkite **Sequence** (seka).
- 3 Sąrašė pasirinkite seriją, tada – **Next** (pirmyn).
Toliau tvarka atveriami serijos sąrankos ekranai: „Load Flow Cell“ (pratekamosios kiuvetės įdėjimas), „Load Buffer Cartridge“ (buferinio tirpalo kasetės įdėjimas), „Load Reagent Cartridge“ (reagentų kasetės įdėjimas) ir „Pre-run Check“ (patikra prieš seriją).
- 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 nusausinkite laboratoriniu pūkelių nepaliekančiu audiniu.
 - ▶ Įsitinkinkite, kad stiklinis pratekamosios kiuvetės paviršius yra švarus. Jei reikia, pakartokite valymo veiksmą.
 - ▶ Išimkite ankstesnėje serijoje panaudotą pratekamąją kiuvetę.
 - ▶ Sulygiuokite pratekamąją kiuvetę pagal sulygiavimo kaiščius ir padėkite ant platformos.
- 5 Pasirinkite **Load** (įdėti).
Durelės automatiškai uždaromos, ekrane rodomas pratekamosios kiuvetės ID ir patikrinami jutikliai.
- 6 Laikydami programinės įrangos raginimų, ištuštinkite panaudotų reagentų talpą, įdėkite „NextSeq 550Dx“ buferinio tirpalo kasetę ir „NextSeq 550Dx“ reagentų kasetę.
Įdėjus „NextSeq 550Dx“ buferinio tirpalo ir reagentų kasetes, programinė įranga nuskaityto bei įrašo RFID. Ekrane rodomi buferinio tirpalo ir reagentų kasetė ID bei patikrinami jutikliai.
- 7 Kai automatizuota patikra prieš seriją baigiama, pasirinkite **Start** (paleisti). (Nereikia, jei sukonfigūruotas automatinis paleidimas.)
- 8 Prasidėjus vykdymui atveriamas ekranas „Sequencing“ (sekos nustatymas). Šiame ekrane vaizdiškai pateikiamas dabartinis vykdymas, įskaitant intensyvumą ir kokybės įverčius.

Rezultatai

Integruotoji analizės realiuoju laiku (RTA) programinė įranga atlieka vaizdo analizę ir bazių priskyrimą bei kiekvienai kiekvieno sekoskaitos ciklo bazei priskiria kokybės balą. Pasibaigus pirminei analizei, pasirinktas „Local Run Manager“ modulis „NextSeq 550Dx“ prietaise antrinę analizę pradeda automatiškai. Čia aprašyti antrinės analizės procesai taikomi „Germline“ ir „Somatic“ variantų moduliams.

Išskirstymas

Išskirstymo funkcija kiekvieną indeksų nuskaitymo seką palygina su vykdymui priskirtomis indeksų sekomis. Atliekant šį veiksmą neatsižvelgiama į jokiais kokybės vertes.

Indeksų nuskaitymai identifikuojami atliekant toliau nurodytus veiksmus.

- ▶ Mėginiai sunumeruojami pradedant nuo 1 tokia tvarka, kokia jie išdėstyti vykdymui skirtame sąraše.
- ▶ Mėginys, kurio numeris yra 0, rezervuojamas spiečiams, kurie nebuvo priskirti mėginiui.
- ▶ Spiečiai mėginiui priskiriami, kai visiškai sutampa indeksų seka arba kai yra ne daugiau nei viena indeksų nuskaitymo neatitiktis.

FASTQ failų generavimas

Atlikus išskirstymą programinė įranga sugeneruoja tarpinės analizės failus FASTQ formatu (tekstiniu formatu, naudojamu sekoms apibūdinti). FASTQ failai apima kiekvieno mėginio nuskaitymus ir susijusius kokybės įverčius. Spiečiai, neperėję filtro, neįtraukiami.

Kiekviename FASTQ faile yra tik vieno mėginio nuskaitymai. To mėginio pavadinimas yra įtrauktas į FASTQ failo pavadinimą. „Germline“ ir „Somatic“ variantų moduluose sugeneruojami aštuoni vieno oligonukleotidų telkinio vieno mėginio FASTQ failai: keturi iš „Read 1“ (1 nuskaitymas) ir keturi iš „Read 2“ (2 nuskaitymas). Taigi iš viso sugeneruojama 8 ir 16 (atitinkamai „Germline“ ir „Somatic“) mėginiui skirtų FASTQ failų. FASTQ failai yra pagrindiniai įvesties duomenys, reikalingi prilygiavimo funkcijai.

Prilygiavimas

Prilygiavimo metu juostinis Smitho-Watermano algoritmas sulygiuoja kiekvieno mėginio sankaupas pagal ampliconų sekas, nurodytas deklaracijos faile.

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

Kiekvienas pagal galą suporuotas nuskaitymas įvertinamas pagal jo prilygiavimą su atitinkamomis to nuskaitymo zondo sekomis.

- ▶ „Read 1“ (1 nuskaitymas) įvertinamas pagal pasrovinių konkrečios srities oligonukleotidų (angl. „Downstream Locus-Specific Oligos“, DLSO) atvirkštinį komplementą.
- ▶ „Read 2“ (2 nuskaitymas) įvertinamas pagal priešrovinius konkrečios srities oligonukleotidus (angl. „Upstream Locus-Specific Oligos“, ULSO).
- ▶ Jei nuskaitymo pradžia sutampa su zondo seka (ne daugiau kaip vienas skirtumas), visas nuskaitymo ilgis lygiuojamas pagal tos sekos tikslinį ampliconą.
- ▶ Jei nuskaitymo pradžia sutampa su zondo seka (ne daugiau kaip trys skirtumai, t. y. nesutapimai arba poslinkiai dėl priekinių sekų intarpų / iškritų), visas nuskaitymo ilgis lygiuojamas pagal tos sekos tikslinį ampliconą.
- ▶ Dėl tyrimo cheminių savybių DLSO ir ULSO esantys intarpai / iškritos nestebimi.

Prilygiavimai išfiltruojami iš prilygiavimo rezultatų, remiantis neatitikties rodikliais arba dominančiame regione, arba visame amplicone, atsižvelgiant į amplicono ilgį. Prilygiavimo failuose filtruoti prilygiavimai įrašomi kaip nesulygiuoti ir jie 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 tabuliacijos žymėmis atskirto teksto (*.txt) ataskaitas, kuriose rodoma įvairi metrika, pvz., sekoskaitos 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 serijos, 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“ prietaiso veikimo charakteristikos buvo nustatytos naudojant „Germline“ ir „Somatic“ variantų modulius, „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ ir „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų) bei patvirtintos naudojant „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2.5 (300 ciklų). Tyrimai apėmė mėginių indeksavimą, mėginių pemašą, DNR įvestį, analitinį jautrį (tuščios vertės ribą / aptikimo ribą), tikslumą, metodų palyginimą ir atkuriamumą.

Analitiniai tyrimai, kurių metu naudojamas „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinys v2.5 (300 ciklų), buvo sukurti siekiant įvertinti tvirtinimus apie veikimą, anksčiau nustatytus naudojant „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų). Rezultatai rodo, kad reagentų rinkiniai (v2 ir v2.5) 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.

Naudojamos veikimo charakteristikų apibrėžtys ir skaičiavimai

- 1 Teigiama procentinė atitiktis (PPA) apskaičiuojama kaip padėčių, kurios referentiniu metodu klasifikuojamos kaip variantai, dalis, tiksliai pateikiama tyrime.
 - ▶ (variantų padėčių, kurios tiksliai pateikiamos tyrime, sk.) / (bendrasis variantų padėčių sk.)
Tyrime pateikiami variantų lokusai, atitinkantys referentinio metodo reikalavimus, yra teisingi teigiamieji (TP). Variantų padėtys, tyrime pateikiamos kaip referencijos priskyrimai arba skirtingi variantų priskyrimai, yra klaidingi neigiamieji (FN).
- 2 Neigiama procentinė atitiktis (NPA) apskaičiuojama kaip padėčių, kurios referentiniu metodu klasifikuojamos kaip nemutantinio tipo, dalis, tiksliai pateikiama tyrime.
 - ▶ (nemutantinio tipo padėčių, kurios tiksliai pateikiamos tyrime, sk.) / (bendrasis nemutantinio tipo padėčių sk.)
Tyrime pateikiamos nemutantinio tipo padėtys, atitinkančios referentinio metodo reikalavimus, yra teisingi neigiamieji (TN). Nemutantinio tipo padėtys, tyrime pateikiamos kaip variantai, yra klaidingi teigiamieji (FP).
- 3 Bendroji procentinė atitiktis (OPA) apskaičiuojama kaip lokusų, kurie tiksliai pateikiamos tyrime, dalis referentinio metodo atžvilgiu.
 - ▶ (variantų lokusų, kurie tiksliai pateikiami tyrime, sk.) + (nemutantinio tipo lokusų, kurie tiksliai pateikiami tyrime, sk.) / (bendrasis variantų lokusų sk.) / (bendrasis nemutantinio tipo lokusų sk.)
- 4 Skaičiuojant PPA, NPA ir OPA, neįtraukiami nepriskyrimai (variantų ar referentiniai lokusai, netenkinantys vieno ar kelių kokybės filtrų sąlygų).
- 5 Autosomų priskyrimo dažnis apskaičiuojamas bendrąjį filtrų sąlygas tenkinančių padėčių skaičių padalijus iš bendrojo 1–22 chromosomų nustatytos sekos padėčių skaičiaus; X ir Y chromosomos neįtraukiamos. Ši metrika neatsižvelgia į priskyrimų atitikimą referentiniam metodui.

„NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2 (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 „Germline“, tiek su „Somatic“ 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 unikalieji indeksuoti 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 unikalieji indeksuotų mėginių bibliotekų seka, siekiant patikrinti mažiausią palaikomą indeksų skaičių.

96 indeksų serijų metu kiekvieno iš 96 indeksų derinių SNV PPA buvo 98,7–100 %, intarpų ir iškritų PPA – 100 %, o NPA – 100 %. 8 indeksų serijų metu kiekvieno iš aštuonių indeksų derinių PPA (SNV, intarpai 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 (serijos metu) ir tarp sekoskaitos serijų (tarp 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 „Germline“ 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 ištirti 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 („Germline“)

Buvo nustatytas „NextSeq 550Dx“ prietaiso kraujo DNR įvesties intervalas, naudojamas ruošiant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ biblioteką naudojant „Germline“ variantų modulio darbo eigą. Šis intervalas buvo 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“ didelio našumo reagentų rinkinio v2 (300 ciklų) partiją.

Buvo ištirti 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 ištirti 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 1 lent; NPA pateikiama 2 lent. 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.

=1 lent. 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

=2 lent. 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 („Somatic“)

Buvo nustatytas „NextSeq 550Dx“ prietaiso formalinu fiksuotos, į parafiną įlietos DNR įvesties intervalas, naudojamas ruošiant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ biblioteką naudojant „Somatic“ 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 formalinu ir įlietos į parafiną, o paskui buvo išskirta DNR. GM12878 buvo atskiesta linija GM12877, kad 81 (55 SNV, 10 intarpų ir 16 iškritų) variantų alelių dažnio vertės būtų artimos 0,025, 0,05 arba 0,10. Be to, kiekviename mėginyje buvo 91 variantas, kurių dažnis buvo aukštesnis, iki 1,0 VAF. 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 Kit Dx – FFPE QC Kit“. 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 3 lent; NPA pateikiama 4 lent. Rekomenduojama variantų, kurių VAF vertė yra 0,05 arba didesnė, DNR įvestis yra $dCq \leq 4$, o 4,6 naudotina kaip apatinė riba siekiant atitikti veikimo charakteristikas.

=3 lent. Kiekvienos DNR įvesties PPA rezultatai pagal varianto tipą

Vidutinis dCq	Varianto tipas	Numatomi variantai	Numatomi nepris-kyrimai	Tikslinis skiedimo VAF					
				0,025		0,05		0,10	
				Variantų nepris-kyrimai	PPA (%)	Variantų nepris-kyrimai	PPA (%)	Variantų nepris-kyrimai	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

=4 lent. 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 „Somatic“ 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 ištytos per šešias paleidimo dienas iš eilės, naudojant vieną prietaisą ir vieną „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (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 neparimetrinę 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 (5 lent). Kokybiniam variantų aptikimui nustatyti „Somatic“ 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.

=5 lent. 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 (6 lent). Kadangi šios procentinės dalys buvo mažesnės už II tipo klaidos dažnį (5 %, 0,05), kaip LoD buvo apskaičiuota sujungtų variantų dažnių mediana (6 lent). 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.

=6 lent. 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, naudojamo su „NextSeq 550Dx“ prietaisu ir „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkiniu v2 (300 ciklų), variantų priskyrimo tikslumą. Naudojant reprezentatyvų tyrimą, skirtą įvairiems genams analizuoti, apimančį 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 pasiklovimo genomo sritys, nebent nurodyta kitaip.

=7 lent. „Germline“ atitikties suvestinė

Kriterijai	Iš viso stebėjimų ¹	Rezultatas pagal stebėjimą ²	Rezultatas pagal seriją ³
SNV 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.

8 lent. 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.

=8 lent. „Germline“ atiktis 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.

9 lent. 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.

=9 lent. „Germline“ atitiktis pagal mėginį ir varianto tipą

>Mėginys	SNV			Intarpai			Iškritis		
	>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
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 (intarpų / iškritų) priskyrimu. Bendra suvestinė pateikiama 10 lent. Iš viso buvo 71 intarpas / iškrita, kurių dydis intarpų atveju buvo 1–24 bp, o iškritų atveju – 1–25 bp.

=10 lent. „Germline“ intarpų / iškritų aptikimo suvestinė

Varianto 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 vienkartinį pasikartojančių nukleotidų (pvz., PolyA, PolyT), dinukleotidų ir trinukleotidų. Duomenys buvo kaupiami apie kiekvieną amplikoną (11 lent.) 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 %.

=11 lent. „Germline“ amplikonų lygio tikslumas

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklojimo 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

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.
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
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

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.
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
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

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.
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
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

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.
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
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

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.
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
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 12 lent.

=12 lent. NA12878 mėginio „Germline“ atitikties NIST duomenų bazei

Mėginys	Amplikonų sk.	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 „Germline“ 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)
- ▶ Iškritus ilgiai ≤ 25 (visos priskirtos bazės 2457 nustatytos sekos amplikonuose su tinkamai priskirtais 25 ištrintais nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 0 %)

„Somatic“

Naudojant čia aprašytą tyrimą buvo įvertintas „Somatic“ variantų modulio, naudojamo „NextSeq 550Dx“ prietaise su „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkiniu v2 (300 ciklų), variantų priskyrimo tikslumas.

Tai buvo atliekama naudojant reprezentatyvų tyrimą, skirtą įvairiems genams analizuoti, apimančį 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.

=13 lent. „Somatic“ atitikties suvestinė

Kriterijai	Iš viso stebėjimų ¹	Rezultatas pagal stebėjimą ²	Rezultatas pagal seriją ³
SNV 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.

14 lent. 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 iškritus) sujungiami. Kadangi, taikant referentinį metodą, rezultatai gaunami tik apie vieno nukleotido variantus ir tarpus / iškritus, dėl NPA skaičiavimo ne variantų bazių rezultatai palyginami su žmogaus genomo referentinės sekos hg19 versija.

=14 lent. „Somatic“ atiktis 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
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

15 lent. 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 padėties neįtraukiamos.

=15 lent. „Somatic“ atiktis pagal mėginį ir varianto tipą

Mėginys	SNV			Intarpai			Iškritus		
	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

Mėginys	SNV			Intarpai			Iškritos		
	Numatoma	TP	FN	Numatoma	TP	FN	Numatoma	TP	FN
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 (intarpų / iškritų) priskyrimu (16 lent). Iš viso buvo 71 intarpas / iškrita, kurių dydis intarpų atveju buvo 1–24 bp, o iškritų atveju – 1–25 bp.

=16 lent. „Somatic“ intarpų / iškritų aptikimo suvestinė

Varianto 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 vienkartinų pasikartojančių nukleotidų (pvz., PolyA, PolyT), dinukleotidų ir trinukleotidų. Duomenys buvo kaupiami apie kiekvieną amplikoną (17 lent.) 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 %.

=17 lent. „Somatic“ amplikonų lygio tikslumas

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklojimo srityse	Amplikonų genomo turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepris-kyrimai	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

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklojimo srityse	Amplikonų genomo turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepris-kyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), intarpas / iškrita	0,27	34534	0	620	98,2
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

Amplikonas	Chromosoma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklojimo srityse	Amplikonų genomo turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepris-kyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
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
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

Amplikonas	Chromo- soma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklojimo srityse	Amplikonų genomo turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepris- kyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
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
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

Amplikonas	Chromo- soma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklovimo srityse	Amplikonų genomo turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepris- kyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
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
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

Amplikonas	Chromo- soma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklovimo srityse	Amplikonų genomo turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepris- kyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
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
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

Amplikonas	Chromo- soma	Amplikono pradžia	Amplikono pabaiga	Analizuoto fragmento dydis	Bazės didelio pasiklojimo srityse	Amplikonų genomo turinys	GC turinys	Teisingi priskyrimai	Neteisingi priskyrimai	Nepris- kyrimai	Teisingų priskyrimų proc.
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
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	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 GM12878 sekoskaitos rezultatai buvo palyginti su didelio pasikliovimo lygio NA12878 genotipu, kurį nustatė Nacionaliniai standartų ir technologijų institutai (NIST) (2.19 v.). Iš 150 amplikonų 92 amplikonai buvo didelio pasikliovimo 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 18 lent.

=18 lent. GM12878 mėginio „Somatic“ atitiktis NIST duomenų bazei

Mėginys	Amplikonų sk.	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 „Somatic“ tyrimo duomenimis, „NextSeq 550Dx“ prietaisas gali nuosekliai atlikti toliau nurodytas sekas.

- ▶ GC turinys $\geq 19\%$ (visos priskirtos bazės 378 nustatytos sekos amplikonuose: 19 % GC turinio priskirta teisingai, o nepriskyrimo dažnis – 2,6 %)
- ▶ GC turinys $\leq 87\%$ (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 %)
- ▶ Iškritus ilgiai ≤ 25 (visos priskirtos bazės 1134 nustatytos sekos amplikonuose su tinkamai priskirtais 25 ištrintais nukleotidais, o nepriskyrimo dažnis – 0,7 %)

Tikslumas

„NextSeq 550Dx“ prietaiso tikslumas buvo nustatytas tiriant 13 unikalių „Platinum Genome“ mėginių, naudojant tris prietaisus, 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 „Germline“ tikslumo tyrimo atveju. Tikslumą 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 (19 lent.). Bendrasis stebėjimų, naudotų analizuojant kiekvieną prietaiso, operatoriaus ar reagentų partijos komponento kintamumą, skaičius SNV, intarpų ir iškritų atveju buvo, atitinkamai, 699, 176 ir 235.

=19 lent. „NextSeq 550Dx“ prietaiso tikslumo rezultatai (standartinis nuokrypis)

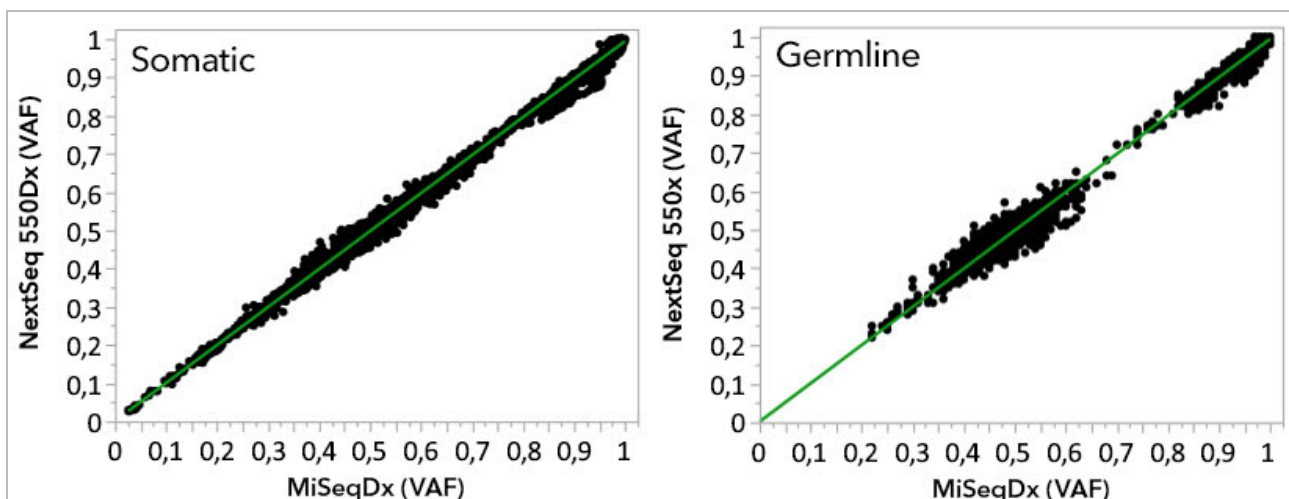
Komponentas	Varianto tipas	Komponentų SD		Bendrasis SD	
		Didž.	Mediana	Didž.	Mediana
Partija	SNV	0,0076	0,0002	0,0833	0,0154
	Intarpas	0,0104	0,0000	0,0410	0,0157
	Iškrita	0,0046	0,0005	0,0560	0,0187

Komponentas	Varianto tipas	Komponentų SD		Bendrasis SD	
		Didž.	Mediana	Didž.	Mediana
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)

Konservuoto kraujo ir FFPE mėginiai buvo įvertinti „NextSeq 550Dx“ prietaise bei „MiSeqDx“ prietaise, naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ „Germline“ ir „Somatic“ darbo eigas. Kraujo ir FFPE mėginių variantų dažnio atitiktis buvo įvertinta naudojant kelis reprezentatyvius tyrimus. 2 pav. parodyta VAF koreliacija tarp šių dviejų prietaisų atlikus vieną reprezentatyvų tyrimą, o 20 lent. koreliacija apibendrinama pagal tyrimų skydelį. Remiantis didele koreliacija tarp „MiSeqDx“ prietaiso ir „NextSeq 550Dx“ prietaiso, 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.

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



=20 lent. Metodų palyginimo rezultatai naudojant unikalios 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 „Germline“ variantų modulio ribotumu.

²2 pav. parodytų VAF diagramų nustatymo koeficientas.

Atkuriamumas

„NextSeq 550Dx“ prietaiso atkuriamumas buvo įvertintas naudojant „Platinum Genome“ mėginius ir reprezentatyvų tyrimą, skirtą įvairiems genams analizuoti, apimantį 12 588 bazes iš 23 skirtingų chromosomų, kai naudojama 150 amplikonų. „Germline“ tyrimus sudarė septyni 13 mėginių replikatai; „Somatic“ tyrimus sudarė šeši septynių 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“ didelio našumo reagentų rinkinio v2 (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 18 kiekvienos „Germline“ ir „Somatic“ darbo eigos serijų.

Genocitų linija

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

=21 lent. „Germline“ 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

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

=22 lent. „Germline“ 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

„Germline“ 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 „Germline“ mėginius su heterozigotiniais variantais buvo nustatyta, ar savasis 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. 23 lent. rezultatai apibendrinami pagal varianto tipą.

„Germline“ 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 „Germline“ mėginius su heterozigotiniais variantais buvo nustatyta, ar savasis 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. 23 lent. rezultatai apibendrinami pagal varianto tipą.

=23 lent. Heterozigotinių variantų „Germline“ Cx vertės

Varianto tipas	Ribinė vertė – 0,2 VAF	Ribinė vertė – 0,7 VAF
	$\geq 99,999\%$	$\leq 0,001\%$
SNV	94/94	94/94
Intarpai	24/24	24/24
Iškritos	35/35	35/35
Iš viso	153	153

Somatic

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

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

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

=24 lent. „Somatic“ 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

=25 lent. „Somatic“ 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

=26 lent. „Somatic“ 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

„Somatic“ variantai, kurių VAF lygis $< 0,01$, į ataskaitą įtraukiami kaip neigiami (nemutantinio tipo) priskyrimai. Numatomų neigiamų „Somatic“ 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 $\geq 0,026$). 27 lent. apibendrinami neigiamų „Somatic“ vietų užfiksuoti, bendrieji ir procentiniai nepriskyrimo dažnio bei teisingų nemutantinio tipo priskyrimų dažnio rezultatai ir pateikiami apatinis bei viršutinis 95 % pasiklivimo lygis (LCL / UCL), apskaičiuotas naudojant „Wilson Score“ metodą.

=27 lent. „Somatic“ priskyrimų stebėjimai siekiant užfiksuoti numatomus neigiamus rezultatus

Varianto tipas	Nepriskyrimas			Teisingas priskyrimas						
	Užfiksuota	Iš viso	Procentas	Dviprasmis	Neteisingas	Teisingas	Iš viso	Procentas	95 % LCL	95 % UCL
Nemutantinio tipo	36 326	8 909 676	0,408	2254	121	8 870 975	8 873 350	99,97	99,972	99,974

Buvo įvertinti to paties varianto „Somatic“ 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 28 lent.

=28 lent. „Somatic“ C95 suvestinė

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

„NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2.5 (300 ciklų) veiksmingumas

Apžvalga

„NextSeq 550Dx“ prietaisas suderinamas su dviem reagentų rinkiniais: „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkiniu v2 (300 ciklų) ir „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkiniu v2.5 (300 ciklų). Siekiant pademonstruoti, kad „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinys v2.5 (300 ciklų) gali atitikti patvirtintus ir patikrintus „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2 (300 ciklų) analitinio veiksmingumo reikalavimus, buvo atlikta „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2.5 (300 ciklų) tyrimų. Naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ buvo parengtos dvi bibliotekos, viena – naudojant „Germline“ darbo eigą, o kita – „Somatic“ darbo eigą. Kiekvienos darbo eigos bibliotekos buvo išbandytos naudojant tris „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2.5 (300 ciklų) partijas ir tris „NextSeq 550Dx“ prietaisus. Be to, bandant kiekvieną darbo eigą, buvo įtraukta viena serija naudojant „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų).

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

Patikra naudojant „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų) pademonstravo, kad „NextSeq 550Dx“ prietaisas gali aptikti variantus esant 0,05 VAF, o II tipo klaidos dažnis – $\leq 0,05$, ir kad 0,026 VAF ribinės vertės, kurią naudoja „Somatic“ variantų modulis (tikroji LoB), I tipo klaidos rodiklis yra $\leq 0,01$. 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“ didelio našumo reagentų rinkinį v2.5 (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“ didelio našumo reagentų rinkinį v2.5 (300 ciklų). Aukščiau ir žemiau 0,026 VAF ribinės vertės esančių priskyrimų dalis tada buvo palyginta su patvirtinimais, nustatytais naudojant „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (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“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų), siekiant nustatyti variantus / geno koordinatas, skirtus LoB / LoD įvertinti naudojant „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2.5 (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“ didelio našumo reagentų rinkinio v2 (300 ciklų) rezultatais. LoB analizei buvo iširta 51 atitinkama geno koordinatė.

Siekiant įvertinti „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2.5 (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 29 lent. LoD variantų priskyrimų, kurių VAF yra didesnis už 0,026 arba šiai vertei lygus, dalis nurodyta 30 lent.

=29 lent. Nemutantinio tipo padėčių priskyrimų, nesiekiančių 0,026, dalis (LoB patvirtinimų įvertinimas)

Varianto tipas	Įvertintos padėtys	Iš viso stebėjimų	VAF matavimų sk. $\geq 2,6\%$	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

=30 lent. LoD variantų priskyrimų, kai VAF $\geq 0,026$, dalis (LoD patvirtinimų įvertinimas)

Varianto tipas	Įvertintos padėtys	Iš viso stebėjimų	VAF matavimų sk. < 2,6 %	VAF matavimų sk. $\geq 2,6$ %	Dalis $\geq 2,6$ %	Dalis – 95 % Pasiklivimo 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 „Germline“ variantų modulis ir „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinys v2.5 (300 ciklų). Reprezentatyvaus tyrimo metu buvo ištirta dvylika unikalių „Platinum Genome“ mėginių. Naudojant tris „NextSeq 550Dx“ prietaisus ir tris „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinius v2.5 (300 ciklų), iš viso buvo atlikta 11 serijų.

SNV, tarpų 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“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų). Rezultatų suvestinė pateikta 31 lent.

=31 lent. „Germline“ 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 PPA	1056	98,7	98,7	>99,9	>99,9
Intarpų PPA	1056	100	100	100	98,9
Iškritų PPA	1056	95,2	95,2	>99,9	100
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“ didelio našumo reagentų rinkinį v2.5).

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

⁴Mažiausia vertė, kai kiekvienos serijos duomenys analizuojami bendrai.

Somatic

Atlikus toliau nurodytą tyrimą buvo įvertintas „Somatic“ variantų modulis, naudojamo „NextSeq 550Dx“ prietaise su „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkiniu v2.5 (300 ciklų), variantų priskyrimo tikslumas. Atliekant reprezentatyvų tyrimą, buvo ištirta 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“ didelio našumo reagentų rinkinio v2.5 (300 ciklų) partijas, iš viso buvo atlikta 11 serijų.

SNV, tarpų 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“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų). Rezultatų suvestinė pateikta 32 lent.

=32 lent. „Somatic“ 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 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“ didelio našumo reagentų rinkinį v2.5).

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

⁴Mažiausia vertė, kai kiekvienos serijos duomenys analizuojami bendrai.

Tikslumas

Genocitų linija

„NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2.5 (300 ciklų), naudojamo su „Germline“ variantų moduliui, tikslumas 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“ didelio našumo reagentų rinkinio v2.5 (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 „Germline“ 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“ reagentų rinkinį v2.5 (300 ciklų) variantas, kurio Cx vertė mažiausia, 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“ reagentų rinkinį v2.5 (300 ciklų) variantas, kurio Cx vertė didžiausia, buvo < 1,5 %, o tai rodo, kad ≤ 1,5 % heterozigotinių variantų būtų vadinami homozigotiniais. 33 lent. rezultatai apibendrinami pagal varianto tipą. Palyginimo tikslu pateikiamos Cx vertės iš vienos sekoskaitos serijos, atliktos naudojant „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų).

=33 lent. Heterozigotinių variantų „Germline“ 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.

Somatic

„NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2.5 (300 ciklų), naudojamo su „Somatic“ variantų moduliu, tikslumas buvo įvertintas naudojant „Platinum Genome“ FFPE mėginius ir reprezentatyvų tyrimą. Tyrimo metu buvo paruošta viena biblioteka naudojant „TruSeq Custom Amplicon Kit Dx“ ir iširti du mėginiai, kurių buvo apdorota po aštuonis replikatus. Bibliotekų seka buvo nustatyta naudojant tris „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2.5 (300 ciklų) partijas ir tris „NextSeq 550Dx“ prietaisus – iš viso atliktos devynios sekoskaitos serijos.

Naudojant „Somatic“ variantus, kurių numatomas VAF lygis $\leq 0,10$ VAF (N = 131 unikalus variantas), buvo įvertintas prietaiso kintamumas prie „Somatic“ variantų modulio VAF ribinės vertės (somaticiniai 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 „Somatic“ variantų modulio VAF ribinę vertę, yra 95 %. Didžiausios C95 vertės pagal varianto tipą pateikiamos 34 lent. Palyginimo tikslu pateikiami C95 rezultatai iš vienos sekoskaitos serijos, atliktos naudojant „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų).

=34 lent. „Somatic“ C95 suvestinė

Varianto tipas	Įvertintų variantų sk.	C95 (v2.5) 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 bendrąjį standartinį nuokrypį atlikus nuokrypio komponentų analizę.

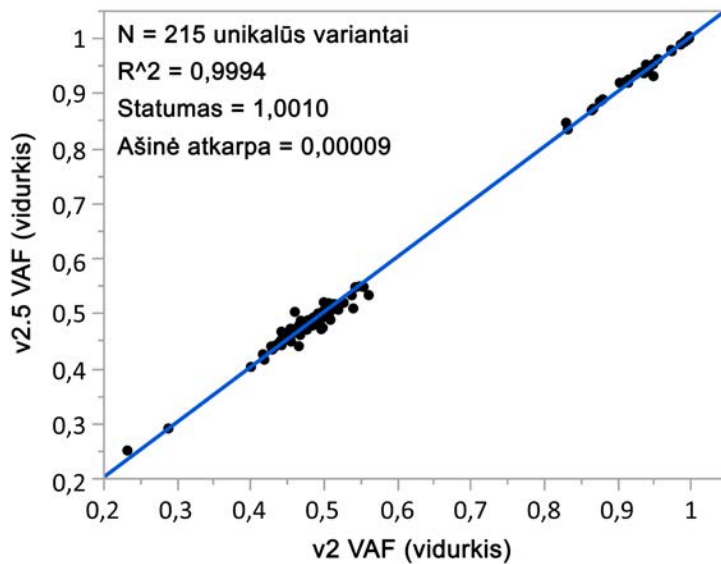
²C95 vertės pagal standartinius mėginių nuokrypius.

Metodų palyginimas (reagentų rinkinys)

Genocitų linija

Vidutinės 215 unikalių variantų VAF vertės buvo įvertintos naudojant „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų) ir „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2.5 (300 ciklų) bei rezultatus, kuriuos sugeneravo „Germline“ variantų modulis. VAF vidurkiai buvo apskaičiuoti atlikus 11 sekoskaitos serijų (v2.5) ir vieną sekoskaitos seriją (v2). Kiekvieno varianto vidurkiui apskaičiuoti buvo naudojami mažiausia aštuoni replikatai. 3 pav. 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“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų) bei „Germline“ variantų modulį, yra taikytinos „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkiniui v2.5 (300 ciklų).

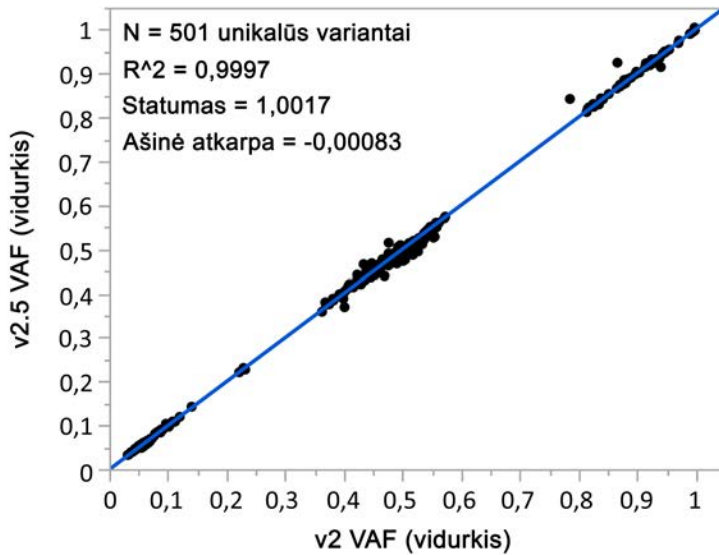
3 pav. „Germline“ variantų modulis variantų alelių dažnio (VAF) koreliacija tarp „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2 (300 ciklų) ir „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2.5 (300 ciklų).



Somatic

Vidutinės 501 unikalaus varianto VAF vertės buvo įvertintos naudojant „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų) ir „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinį v2.5 (300 ciklų) bei rezultatus, kuriuos sugeneravo „Somatic“ variantų modulis. VAF vidurkiai buvo apskaičiuoti atlikus 11 sekoskaitos serijų (v2.5) ir vieną sekoskaitos seriją (v2). Kiekvieno unikalaus varianto vidurkiui apskaičiuoti buvo naudojami mažiausia trys replikatai. 4 pav. 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“ didelio našumo reagentų rinkinį v2 (300 ciklų) bei „Somatic“ variantų modulį, yra taikytinos „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkiniui v2.5 (300 ciklų).

4 pav. „Somatic“ variantų moduly variantų alelių dažnio (VAF) koreliacija tarp „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2 (300 ciklų) ir „NextSeq 550Dx“ didelio našumo reagentų rinkinio v2.5 (300 ciklų).



Keitimo istorija

Dokumentas	Data	Keitimo aprašas
Dokumento Nr. 1000000030326, 06 v.	2022 m. gegužės mėn.	Atnaujinimai, atlikti siekiant ištaisyti turinį, netyčia pridėtą iš šaltinio programinės įrangos.
Dokumento Nr. 1000000030326, 05 v.	2021 m. lapkričio mėn.	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).
Dokumento Nr. 1000000030326, 04 v.	2021 m. rugpjūčio mėn.	Pridėta lentelė „Keitimo istorija“. Atnaujintas įgaliotojo atstovo ES adresai.

Patentai ir prekių 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 teises, bendras teises nei panašių teisių.

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 šio dokumento turinys turi būti išsamiai perskaitytas ir suprastas.

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

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

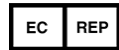
© 2022 m. „Illumina, Inc.“. Visos teisės saugomos.

Visi prekių ženklai priklauso „Illumina, Inc.“ ar kitiems savininkams. Informacijos apie konkrečius prekių ženklus ieškokite adresu www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktinė informacija



„Illumina“
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
Nyderlandai

Užsakovas Australijoje

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

Gaminio ženklavimas

Visą informaciją apie simbolius, kurių gali būti ant gaminių pakuočių ir etikečių, rasite jūsų rinkinio simbolių legendoje, pateiktoje adresu support.illumina.com.