

## Pakkausseloste

DIAGNOSTISEEN IN VITRO -KÄYTTÖÖN.

## Aiottu käyttötarkoitus

TruSight™ Whole Genome on kvalitatiivinen *in vitro* -diagnostinen laite, joka on tarkoitettu koko genomin sekvensointiin ja yksittäisten nukleotidivarianttien, insertioiden/deleetioiden, kopionumerovarianttien, homotsygositeetin ajojen, lyhyiden tandem-toistuvien laajennusten ja verestä ekstrahoitujen ihmisen genomi-DNA:n mitokondriaalisten variaatioiden havaitsemiseen.

TruSight Whole Genome sisältää TruSight Whole Genome Dx Library Prep UD-indeksit ja TruSight Whole Genome Analysis Application ohjelmiston. Laite on tarkoitettu käytettäväksi yhteensopivissa alavirran ituradan sovelluksissa *in vitro* -diagnostiikkamäärittysten kehittämiseksi sekä pätevän laboratoriohenkilöstön ja määrittysten kehittäjien toimesta.

TruSight Whole Genome on tarkoitettu käytettäväksi NovaSeq™ 6000Dx Instrument -laitteen kanssa.

## Yhteenveto ja selitys

TruSight Whole Genome on seuraavan sukupolven sekvensointimäärittys, joka käyttää tagmentointipohjaista PCR-vapaata kirjaston valmistelua alkaen perifeerisestä ihmisen kokoverestä ekstrahoidusta genomisesta DNA:sta (gDNA) ja sekvensoinnista ja ensisijaisesta analyysistä Illumina®:ssä NovaSeq 6000Dx Instrument.

Toissijainen analyysi suoritetaan TruSight Whole Genome Analysis Application-ohjelmistolla mukana toimitetulla ja vaaditulla Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx:lla, ja se sisältää monipuolisuuden poiston, kohdistuksen GrCh38/hg38-ihmisviitegenomiin ja varianttipuhelut sekä laadunvalvonnan (QC) mittausmäärittysten annotaation ja soveltamisen [Taulukko 1](#):ssa analyttisen suorituskyvyn varmistamiseksi. Määrittysten tuotokset sisältävät ajon ja näytteen laadunvalvontaraportit sekä genomivarianttien kutsuformaattitiedostot (VCF), joita käytetään yhteensopivan alavirran tertiääriseen analyysi- ja raportointiohjelmiston kanssa.

TruSight Whole Genome arvioi laajasti genomivariantteja ihmisen genomin koodaus- ja ei-koodausalueilla. Varianttiarviointi sisältää pienten varianttien, kopioiden lukumäärän varianttien (CNV), homotsygositeetin (ROH) ajojen ja lyhyiden toistolaajennusten (STR) havaitsemisen. TruSight Whole Genome Havaitsee lisäksi SMN1 c.840C -alleelin (NM\_000344.3:c.840C>T) puuttumisen, mikä voi viitata SMN1-geenin poistoon tai SMN1/SMN2-geenin muuntumiseen.<sup>1,2</sup> SMN1 c.840C -alleelin bialleelihävikki aiheuttaa noin 95 % spinaalisen lihastrofian (SMA) tapauksista.<sup>3</sup>

[Taulukko 2](#) antaa tietoja TruSight Whole Genome-validoiduista varianttityypeistä.

Taulukko 1 TruSight Whole Genome Laadun metriikan määrittelyt

Tulostyyppi	Mittari	Tekniset tiedot
Sekvensointiajon laadunvalvonta	Yhteensä % $\geq$ Q30	$\geq 85,0$
FASTQ-laadunvalvonta	Saanto näytettä kohden (bps)	$\geq 90\,000\,000\,000$
Näytekirjaston laadunvalvonta	Keskimääräinen autosomaalinen kattavuus	$\geq 35,0$
	Prosenttiosuus autosomeista, joiden kattavuus on yli 20X	$\geq 93,94$
	Normalisoitu kattavuus 60–79 %:n GC-astioissa	$0,82 \leq x \leq 1,13$
	Normalisoitu kattavuus 20–39 %:n GC-astioissa	$0,97 \leq x \leq 1,06$
	Keskimääräinen mitokondriokattavuus	$\geq 500,0$
	Q30-emästen prosenttiosuus	$\geq 85,0$
	Arvioitu näytteen saastuminen	$\leq 0,005$

Taulukko 2 Havaitut variantit, jotka on validoitu TruSight Whole Genome kanssa

Varianttityyppi	Validoitu variantin tunnistus
Pienet variantit	Yksittäiset nukleotidivariantit (SNV), lyhyet asennukset/poistot (1–31 bp)
Kopioiden lukumäärävariantit (CNV)	$\geq 10$ kt:n voitot ja häviöt
Homotsygositeetin juoksu (ROH)	$\geq 500$ kt
Mitokondriaaliset SNV:t	% heteroplasmia, jos $\geq 4,75$ %
Lyhyen tandem-toiston (STR) laajennukset	Kohdistetut lokukset (AFF2, AR, ATN1, ATXN1, ATXN10, ATXN2, ATXN3, ATXN7, ATXN8OS, C9ORF72, CACNA1A, CBL, CNBP, CSTB, DIP2B, DMPK, FMR1, FXN, GLS, HTT, JPH3, NIPA1, NOP56, NOTCH2NL, PABPN1, PHOX2B, PPP2R2B ja TBP)
SMN1-variantti	NM_000344.3:c.840C/T

## Menetelmän periaatteet

TruSight Whole Genome on tarkoitettu PCR-vapaiden kirjastojen valmisteluun ihmisen koko genomien sekvensointitietojen tuottamiseksi. Määrittely alkaa valmistelemalla kirjastoja kvantifioidusta genomisesta DNA:sta, joka on poimittu perifeerisestä ihmisen kokoverestä, sisältää NovaSeq 6000Dx Instrument-laitteen sekvensoinnin ja analyysin TruSight Whole Genome Analysis Application-laitteella ja päättyy varianttien tunnistukseen ja annotaatioon.

TruSight Whole Genome -analyysi koostuu seuraavista vaiheista:

- **Eräsuunnittelu ja ajon luominen** – On erittäin suositeltavaa suunnitella erä ja suorittaa se ennen kirjaston valmistelun aloittamista. Kirjaston valmisteluerässä voi olla enintään 24 näytekirjastoa. Näytteiden lukumäärän perusteella voidaan käyttää erilaisia virtauskennokokoonpanoja (6-punos S2:ssa ja 16-punos S4:ssä). Kirjastoputken tunnus, näytteiden nimet ja vastaava indeksointi tallennetaan ajon suunnittelun ja ajon luomisen aikana. Lisätietoja suorituksen luomisesta on kohdassa TruSight Whole Genome Analysis Application -opas (asiakirjanro 200049931). Seuraa suunniteltua erää kirjaston valmistelutyönkulun suorittamisen aikana.
- **Protokollan valmistelu** – Jotkin reagenssit on jäädytetty ja ne on tuotava huoneenlämpöön. Lyhyen työnkulun vuoksi on mahdollista suorittaa valmistelu ja aloittaa sekvensointi samana päivänä. Tämän vuoksi suunniteltujen ajojen sekvensointitarvikkeet voidaan myös sulattaa tässä vaiheessa. Kvantifioidut genomi-DNA-näytteet sulatetaan ja laimennetaan optimoitua DNA-tuloa varten.
- **Kirjaston valmistelu**
  - **Merkintägenominen DNA** – Käyttää Bead-Linked Transposomes PCR-vapaana (BLT-PF) DNA-syötteen merkitsemiseen. Tagmentoinnin aikana gDNA on pirstaleinen, merkitty sovittimilla ja immobilisoitu BLT-PF magneettihelmien pinnalle.
  - **Tagmentoinnin jälkeinen puhdistus** – Puhdistaa sovittimella merkityn DNA:n BLT-PF:n päällä ja poistaa pysäytyspuskurin valmistautukseen ligaatti-indekseihin.
  - **Ligaatti-indeksit** – Lisää kirjastoihin ainutlaatuisia kaksoisindeksejä multipleksoinnin mahdollistamiseksi. Suorittaa aukon laajennuksen ja eluoi yksijuosteiset DNA-kirjastot helmistä.
  - **Koon valinta- ja puhdistuskirjastot** – Helmien puhdistustoimenpide, jossa käytetään kaksipuolista koon valintaa, poistaa fragmentit, jotka ovat liian pieniä ja suuria kohdistaakseen fragmentin keskipituuden noin 450 bp, alue ~360–550 bp.
  - **Pool- ja Denature-kirjastot** – BLT-PF-järjestelmän itsenormalisoitua ominaisuus mahdollistaa yhdistämisen tilavuuden mukaan ilman qPCR:ää tai muuta normalisointia. Kunkin kirjaston määritetty tilavuus on yhdistetty kunkin ajon suunnitelman mukaan ja 0.2N NaOH:lla denaturoitu (laimennettu HP3). Sen jälkeen denaturoitu yhdistelmä siirretään NovaSeq 6000Dx kirjastoputkeen suunniteltua ajoa vastaavalla tunnuksella.
- **Sekvensointi ja analyysi** – S2- ja/tai S4-kokoonpanoissa olevat tarvikkeet ladataan -laitteeseen NovaSeq 6000Dx Instrument, mukaan lukien siihen liittyvä NovaSeq 6000Dx kirjastoputki (-putket), jossa on yhdistetyt kirjastot. Ladattaessa kirjaston putken tunnus skannataan ja, jos se syötetään ajon suunnittelun aikana, sitä käytetään vastaavan suunnitellun ajon valitsemiseen. Muussa tapauksessa siihen liittyvä suunniteltu ajo on valittava manuaalisesti.

Sekvensointi ja ensisijainen analyysi — Normalisoidut, rikastetut kirjastot poolataan ja klusteroidaan virtauskyvetiin ja sen jälkeen sekvensoidaan synteetikemialla (SBS) NovaSeq 6000Dx:ssa. SBS-kemiassa käytetään palautuvan terminaattorin menetelmää fluoresoivasti merkittyjen yksittäisten nukleotidipohjien toteamiseen, kun ne sisällytetään kasvaviin DNA-säikeisiin.

Real-Time Analysis (RTA) on ohjelmisto, joka suorittaa kuva-analyysin ja emäksen tunnistamisen ja antaa laatupesteytyksen kullekin emästunnistukselle. Ensisijaiset analyysitiedot siirretään automaattisesti Illumina DRAGEN-palvelimelle.

Purkaminen ja DRAGEN analyysi suoritetaan automaattisesti TruSight Whole Genome Analysis Application-ohjelmistolla. Osana tätä analyysiä kukin ajo ja näytekirjasto tarkistetaan validiteetin osalta käyttämällä [Laadunvalvonta sivulla 32](#) -kohdassa kuvattuja analyysimittareita, ja tulokset annetaan konsolidoiduissa ja yksittäisissä näyteraporteissa. Kelvollisille näytekirjastoille luodaan merkintöjä annotoituja genomien Variant Call Format (VCF) -tiedostoja. Lisätietoja analyysin työnkulusta on kohdassa TruSight Whole Genome Analysis Application -opas (asiakirjanro 200049931).

## Menetelmän rajoitukset

- *In vitro* -diagnostiseen käyttöön.
- TruSight Whole Genome on yhteensopiva ihmisen perifeerisestä kokoverestä johdetun genomisen DNA:n kanssa.
- Analyysi ei sisällä reagensseja DNA:n uuttamista tai kvantifointia varten. Analyyttisen testauksen tulokset, mukaan lukien [Häiritsevät aineet sivulla 36](#), on saatu kokoverestä käyttämällä edustavia DNA:n uuttopakkauksia ja DNA:n kvantifointipakkauksia. Kaikki diagnostiset testit, jotka on kehitetty käytettäväksi TruSight Whole Genome:n kanssa, edellyttävät kaikkien suorituskyvynäkökohtien täydellistä validointia valittujen DNA:n uutto- ja DNA-quantifointipakettien kanssa.
- Analyysi on määritetty ja testattu seuraavassa taulukossa esitettyjen näytteen pleksisuus- ja indeksisarjojen osalta.

Kirjaston valmisteluerän koko	Pleksisyys	Ajon määritykset	Indeksointi
6, 12, 18 tai 24 näytettä	6 pleksiä	1–4 S2-ajoa	S2 asetus 1–4
16 näytettä	16 pleksiä	1 S4 ajo	S4 sarja 1 tai 2
22 näytettä	16 pleksiä + 6 pleksiä	1 S4-ajo + 1 S2-ajo	S4-sarja 1 tai 2, S2-sarja 1–4 (ei käytössä S4:ssä)

- Analyysi ei valvo positiivista näytteen seuranta. Vaikka ohjelmiston raportoimaa ploidian laadunvalvontayhteenvetoa voidaan valinnaisesti käyttää näytteiden vaihtojen tunnistamiseen, se ei tunnista miehiä, jotka on vaihdettu miehiin, eikä naisia, jotka on vaihdettu naisiin.
- Määritys antaa vain validoinnin enintään genomien VCF-tiedostojen tulostukseen. Kaikki diagnostiset testit, jotka on kehitetty käytettäväksi TruSight Whole Genome:n kanssa, edellyttävät kaikkien suorituskyvyn näkökohtien täydellistä validointia valittujen jatkokäyttösovellusten kanssa.
- Analyysi ei raportoiv varianttintunnistuksia näytteille, jotka eivät läpäise laadunvalvontaa.
- Analyysi määrittää korkean luotettavuustason vain SNV:ille ja 1-5 bp:n lisäyksille/poistoille johtuen tiukoista kriteereistä, joita käytetään määrittämään genomien konteksti korkeaksi luottamukseksi tietyille varianttityypille [Pienten varianttien luottamustason määrittäminen sivulla 38](#).

- Analyysi on suunniteltu arvioimaan CNV:t koko raportoitavassa genomissa genomiyhteydestä riippumatta, ja se sulkee pois alueet, joilla on viitegenomin rajoituksia heijastavia ominaisuuksia, kuten sentromeerit, telomeerit ja populaatiossa esiintyvät yleiset CNV:t.
- Analyysin suorituskykyä ei arvioitu alle 10 kt:n kopiomäärävarianteille.
- Analyysi ei raportoi translokaatioita, inversioita tai tasapainotettuja uudelleenjärjestelyjä.
- Mitakondriaalisen DNA:n (mtDNA) insertioiden tai poistojen osalta analyysin suorituskykyä ei arvioitu.
- Analyysi raportoi tulokset vain taulukossa [Taulukko 2](#) luetelluille STR-lokuksille. Kun todelliset STR-laajennuspituudet ylittävät noin 135 bp, havaittu pituus on usein todellisen pituuden aliarvio lyhyiden lukemien teknisten rajoitusten vuoksi, ja tämä vaikutus on vieläkin voimakkaampi FMR1:n osalta. Kun todellinen STR-pituus ylittää fragmentin mediaanipituuden (~330 bp), STR-pituusarvio tasaantuu.
- Analyysi ei ilmoita SMN1- tai SMN2-kopionumeroa.
- Analyysi ei esitä väitteitä havaittujen varianttien patogeenisuudesta.

## Tuotteen osat

TruSight Whole Genome koostuu seuraavista:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (luettelonumero 20093209) ja
- TruSight Whole Genome Analysis Application (luettelonumero 20106190, koulutetun Illumina henkilökunnan asentama)

## Reagenssit

### Mukana tulevat reagenssit

#### TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, osanumero 20072256

Reagenssin nimi	Määrä	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF)	1	460 µl	Streptavidin Magnetic Beads, jotka on yhdistetty transposomien kanssa puskuroidussa vesiliuoksessa.	-25...-15 °C
Extension-Ligation Mix (ELM)	1	1,6 ml	Ligaasi, DNA Polymerase ja dNTP:t puskurivesiliuoksessa.	-25...-15 °C

Reagenssin nimi	Määrä	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
2N NaOH (HP3)	1	400 µl	2 N natriumhydroksidiliuos (NaOH).	-25...-15 °C
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	290 µl	Magnesiumsuolaa ja dimetyyliformamidia sisältävä puskuroitu vesiliuos.	-25...-15 °C

### TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, osanumero 20072257

Reagenssin nimi	Määrä	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	41 ml	Puhdistusainetta ja suolaa sisältävä puskuroitu vesiliuos	15–30 °C
Resuspension Buffer (RSB)	1	20 ml	Pushkuroitu vesiliuos.	15–30 °C
Cleanup Beads (CB)	1	10 ml	Kiinteän faasin paramagneettiset rakeet puskuroidussa vesiliuoksessa.	15–30 °C
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	1,4 ml	Puhdistusaineliuos vedessä.	15–30 °C
Neutralization Buffer (NB)	1	450 µl	Tris-HCl-liuos.	15–30 °C

### TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, osanumero 20072258

Reagenssin nimi	Määrä	Täyttötilavuus	Aktiiviset ainesosat	Säilytyslämpötila
UDI PCR-Free (32 Indexes)	1	37 µl	Ainutlaatuiset kaksoisindeksisovittimet (UD), jotka on järjestetty levyyn.	-25...-15 °C

## Tarvittavat tarvikkeet, joita ei toimiteta

- Etanoli, 100 % (200 proof-yksikköä), molekyylibiologialaatuinen
- Sertifioitu RNase/DNase-free water
- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 sykliä) (luettelonumero 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 sykliä) (luettelonumero 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (luettelonumero 20062292)

- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (luettelonumero 20062293)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (luettelonumero 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube, 24 kpl (luettelonumero 20062291)

## Säilytys ja käsittely

- Huoneenlämpötilan määritelmänä on 15–30 °C.
- Jos jokin TruSight Whole Genome Dx Library Prep-komponenttien pakkauksista tai sisällöstä on vahingoittunut tai vaarantunut, ota yhteyttä Illumina asiakaspalveluun.
- Reagenssit ovat stabiileja pakkauksen merkinnöissä ilmoitettuun viimeiseen käyttöpäivään asti, kun niitä säilytetään ilmoitetuissa olosuhteissa. Katso säilytysolosuhteet [Mukana tulevat reagenssit sivulla 5](#). Säilytä analyysikomponentit niiden määritetyssä lämpötilassa, äläkä käytä vanhentuneita reagensseja. Älä vaihda eri pakkauserien analyysikomponentteja keskenään. Sarjaerät on merkitty laatikon etiketteihin.
- Reagenssien fyysisen ulkoasun muutos voi olla osoitus materiaalien huononemisesta. Jos fyysisen ulkoasun muutoksia (kuten reagenssin värin muutoksia tai sameutta) ilmenee, älä käytä reagensseja. Jos ST2:n kohdalla havaitaan saostumista, lämmitä 37 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia ja vorteksoi sitten, kunnes saostumat liukenevat.
- TruSight Whole Genome Dx Library Prep:n stabiilisuutta on arvioitu ja sen toimivuus on osoitettu jopa neljän käyttökerran ajan, kun pakastetut putket on pakastettu käyttökertojen välillä.

## Välineet ja materiaalit

### Tarvittavat laitteet, jotka eivät kuulu toimitukseen

Tarkista laitteiston kalibroinnin tila ennen määrittämisen aloittamista.

Laitteet	Toimittaja
Vortexer pystyy 3 000 rpm:n kierrosnopeuteen, tasainen pohja tai kuppi	Yleinen laboratoriotoimittaja
Mikronäyteinkubaattori kalibroitu $\pm 2$ °C:n lämpötilan tarkkuuden varmistamiseksi	SciGene, luettelonumero 1057-30-O (tai vastaava)
Mikronäyteinkubaattori 96-kuoppaisten MIDI-levyjen insertillä	Illumina, luettelonumero BD-60-601
Mikrosentrifugi	Yleinen laboratoriotoimittaja
96-kuoppainen mikroleveysentrifugi	Yleinen laboratoriotoimittaja

Laitteet	Toimittaja
Levyjen ravistin seuraavilla tiedoilla: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Voidaan ravistaa nopeudella 1 800 kierr./min</li> <li>• Sekoituskehän vakio 2 mm</li> <li>• Sekoitustarkkuus ± 25 rpm</li> </ul>	VWR, tuotenro # 1808-0506 (tai vastaava)
Tiivistyskiila tai -tela	Yleinen laboratoriotuottaja
Magneettinen jalusta, jolla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Suunniteltu paramagneettisten helmien saostamiseen/erotukseen</li> <li>• Magneetit jalustan sivuilla, ei pohjassa</li> <li>• 96-kuoppaisille MIDI-levyille</li> </ul>	Thermo Fisher Scientific, luettelo # AM10027 (tai vastaava)
NovaSeq 6000Dx Instrument	illumina, luettelonumero # 20068232
Tarkkuuspipetit (yksikanavaiset): <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 µl</li> <li>• 20 µl</li> <li>• 200 µl</li> <li>• 1 000 µl</li> </ul>	Yleinen laboratoriotuottaja
Tarkkuuspipetit (8-kanavaiset): <ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 µl</li> <li>• 200 µl</li> </ul>	
Varmista, että pipetit kalibroidaan säännöllisesti ja että ne ovat tarkkoja 5 %:n sisällä ilmoitetusta tilavuudesta	
Pipettiapu	Yleinen laboratoriotuottaja

## Tarvittavat materiaalit, jotka eivät kuulu toimitukseen

Varmista, että käytössäsi on kaikki vaaditut materiaalit ennen protokollan aloittamista.

Protokolla on optimoitu ja validoitu luettelon tuotteiden avulla. Vertailukelpoista suorituskykyä ei taata vaihtoehtoisia materiaaleja käytettäessä.

Materiaalit	Toimittaja
5 ml:n serologisia pipettejä	Yleinen laboratoriotuottaja
10 ml:n serologisia pipettejä	Yleinen laboratoriotuottaja



Materiaalit	Toimittaja
96-kuoppalevyjen liimapintaiset sulkukannet, joilla on seuraavat ominaisuudet: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Irrotettavaa, optisesti kirkasta polyesteriä</li> <li>• Vahva liimapinta, joka kestää useita lämpötilanvaihteluja -40 °C–110 °C</li> <li>• DNAasiton/RNAasiton</li> </ul>	Yleinen laboratoriotoimittaja
Mikrosentrifugiputket, nukleaasivapaat (1,5, 1,7 tai 2,0 ml, ellei määritetty 0,5 ml:ksi)	Yleinen laboratoriotoimittaja
Nukleaasivapaat reagenssisäiliöt, 50 ml tai vastaavat (PVC, kertakäyttökaukalo)	Yleinen laboratoriotoimittaja
15 ml:n kartioputket	Yleinen laboratoriotoimittaja
50 ml:n kartioputket	Yleinen laboratoriotoimittaja
20 µl:n aerosolinkestävät pipettikärjet	Yleinen laboratoriotoimittaja
200 µl:n aerosolinkestävät pipettikärjet	Yleinen laboratoriotoimittaja
1 000 µl:n aerosolinkestävät pipettikärjet	Yleinen laboratoriotoimittaja
96-kuoppaiset säilytyslevyt, 0,8 ml (MIDI-levy)	Thermo Fisher Scientific, osanumero AB-0859 (tai vastaava)
96-kuoppaiset PCR-levyt, 0,2 ml (polypropeeni, joka ei sisällä RNAasia/DNAasia, vähän sitoutuva)	Yleinen laboratoriotoimittaja
Jääastia ja jää	Ei sovellu
Kvantifioidut genomi-DNA-näytteet	Ei sovellu

## Näytteiden ottaminen, kuljettaminen ja säilyttäminen



### HUOMIO

Kaikkia näytteitä on käsiteltävä mahdollisesti tartuntavaarallisina aineina.

- Noudata ihmisverinäytteitä kerättäessä, kuljettaessa, varastoitaessa ja käsiteltäessä turvallisuustoimenpiteitä, mukaan lukien henkilönsuojainten käyttö.
- Kokoveren kuljetuksessa on noudatettava kaikkia maakohtaisia, osavaltiokohtaisia ja paikallisia sovellettavia säädöksiä etiologisten aineiden kuljetuksesta.
- Kerää 2–5 ml perifeeristä kokoverta EDTA-putkiin ja säilytä 2–8 °C:ssa enintään viisi viikkoa ennen ekstraktiota.

- Määrittystuloksissa ei havaittu haitallisia vaikutuksia kokoverinäytteillä, joiden bilirubiini-, kolesteroli-, triglyseridi-, EDTA- tai hemoglobiiniarvot olivat kohonneita. Kts. kohta Häiritsevät aineet.
- TruSight Whole Genome on yhteensopiva kaupallisesti saatavilla olevien uuttosarjojen ja -protokollien kanssa, jotka soveltuvat käytettäväksi seuraavan sukupolven sekvensoinnissa (NGS). Katso [DNA-uuttomenetelmän arviointi sivulla 35](#).
- TruSight Whole Genome on yhteensopiva DNA:n kanssa, joka on eluoitu Tris-puskuroidussa liuoksessa, joka sisältää  $\leq 10$  mM EDTA:ta, kuten 10 mM Trisiä, 1 mM EDTA:ta, pH 8,0 (TE).
- DNA:n eluutiota ja varastointia TE:ssä suositellaan. Vältä säilytystä vedessä, jotta laite pysyy vakaana.

## DNA-syötesuositukset

- Kvantifioi kokoverestä ekstrahoitu genominen DNA ennen TruSight Whole Genome-määrittymisen aloittamista millä tahansa fluorometrisellä kvantifointimenetelmällä, jossa käytetään nukleinihappoa sitovia väriaineita. On suositeltavaa, että tietyille kirjaston valmisteluerälle ja sekvensointiajolle tarkoitettujen näytteiden gDNA kvantifoidaan yhdessä, jotta erien välinen vaihtelevuus eliminoidaan mahdollisuuksien mukaan, tai että käytetään prosessin kontrolleja, joilla varmistetaan  $\leq 25$  %:n välinen vaihtelevuus DNA:n kvantifiointierien välillä.
- Vältä pienten näytetilavuuksien pipetointia ( $< 2 \mu\text{l}$ ), jotta DNA:n kvantifiointi ja syöttö olisivat tarkkoja.
- TruSight Whole Genome Dx Library Prep vaatii riittävän määrän DNA:ta BLT-PF-helmien kyllästämiseksi kirjaston saantojen tehokkaaseen itsenormalisoitumiseen ja optimaaliseen suorituskykyyn. Eri kvantifointimenetelmien tulosten vaihtelun vuoksi seuraavassa taulukossa annetaan suositellut DNA-syötteet kolmelle kvantifointimenetelmälle määrittymisen optimaalisen suorituskyvyn varmistamiseksi. Muiden kvantifointimenetelmien käyttö voi edellyttää optimointia. Katso [DNA:n syöttöherkkyys sivulla 36](#).

Quant-menetelmä (kvantifiointi)	Kohde-DNA-tulo (ng)	DNA-varaston vähimmäispitoisuus
Quant-iT PicoGreen dsDNA -määrittämisspakkaukset	280	11,2 ng/ $\mu\text{l}$
Qubit dsDNA (BR) Assay Kit -laaja-aluealimääräspakkaukset	280	11,2 ng/ $\mu\text{l}$
AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit -kvantifiointipakkaukset	350	14 ng/ $\mu\text{l}$

## Pätevyyssuositukset

Käyttäjän pätevyys ja analyysin onnistunut toteuttaminen voidaan arvioida suorittamalla koko työnkulku kerran käyttöohjeiden mukaisesti. Tämä työnkulku voidaan suorittaa joko yhdellä 6 näytteen kirjastoalimistelmällä ja sekvensointiajolla S2-virtausolulla tai yhdellä 16 näytteen kirjastoalimistelmällä ja sekvensointiajolla S4-

virtaussolulla. Onnistuminen osoitetaan läpäisemällä ajon ja kirjaston laadunvalvonnan metriikat, jotka TruSight Whole Genome Analysis Application ohjelmisto on tallentanut yhdistetyn raportin tuotokseen. Katso kohta TruSight Whole Genome Analysis Application -opas (asiakirjanro 200049931).

Illumina suosittelee sellaisten perifeerisestä kokoverestä ekstrahoitujen genomi-DNA-näytteiden sisällyttämistä, jotka täyttävät DNA-varaston pitoisuuden ja tilavuuden kvalifiointikriteerit, jotta voidaan osoittaa määrityksen onnistunut integrointi alkupään laboratorioprosesseihin, kuten näytteenottoon ja säilytykseen, sekä DNA:n ekstraktio- ja kvantifiointitoimenpiteisiin. Kaupallisesti saatavilla olevia genomisen DNA:n viitenäytteitä, jotka on saatu yhdeltä luovuttajalta, kuten NA24385/HG002 (National Institute of Standards and Technology Genome in a Bottle Consortium), voidaan myös käyttää.

Jos ongelmia ilmenee, katso suositellut toimenpiteet [Vianmääritys sivulla 69](#)-osiosta ja ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen.

## Varoitukset ja varotoimet

- **Jotkin tämän määrityksen osat sisältävät mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengityksen, nielemisen sekä iho- ja silmäkosketuksen kautta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Katso käyttöturvallisuustiedotteet (SDS) verkkosivustolta [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).**
- Kaikista tähän tuotteeseen liittyvistä vakavista vaaratilanteista on välittömästi ilmoitettava Illuminalle ja toimivaltaisille viranomaisille siinä valtiossa, missä käyttäjä ja potilas ovat.
- Kaikkia näytteitä on käsiteltävä tartuntavaarallisina aineina.
- Noudata normaaleja laboratoriotyön varotoimia. Älä pipetoi suun avulla. Älä syö, juo tai tupakoi työhön varatuilla alueilla. Käytä kertakäyttöisiä hansikkaita ja laboratoriotakkeja, kun käsittelet näytteitä tai määritysreagensseja. Pese kädet huolellisesti näytteiden ja määritysreagenssien käsittelyn jälkeen.
- Tämä määritys sisältää polyeteeniglykolia. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengityksen, nielemisen sekä iho- ja silmäkosketuksen kautta.
- Tämä määritys sisältää natriumhydroksidia. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengityksen, nielemisen sekä iho- ja silmäkosketuksen kautta.
- Kirjaston valmistelumenettelyt edellyttävät RNAasista/DNAasista-puhdasta ympäristöä. Dekontaminoi työalueet perusteellisesti RNAasia/DNAasia-estävällä puhdistusaineella.
- Käytä nukleasivapaita mikrosentrifugiputkia, levyjä, pipettikärkiä ja säiliöitä.
- Käytä kalibroituja laitteita koko määrityksessä. Varmista, että kalibroit laitteet tässä protokollassa määritettyjen nopeuksien, lämpötilojen ja määrien mukaan.
- Käytä tarkkuuspipettejä reagenssien ja näytteiden tarkan lisäämisen varmistamiseksi. Kalibroi säännöllisesti valmistajan ohjeiden mukaan.
- Varmista, että käytät määritykseen vaadittuja laitteita ja asetat ohjelmat ohjeiden mukaisesti.

- PCR-laitteen ja mikronäyteinkubaattorin ilmoitetut lämpötilat osoittavat reaktiolämpötilan, ei välttämättä laitteeseen asetettua lämpötilaa.
- Älä vaihda eri TruSight Whole Genome Dx Library Prep pakkauserien komponentteja keskenään. Sarjaerät on merkitty laatikon etiketteihin.
- On noudatettava asianmukaisia laboratorikäytäntöjä, jotta nukleaasit ja PCR-tuotteet eivät kontaminoisi reagensseja, instrumentteja, näytteitä ja kirjastoja. Nukleaasin ja PCR-tuotteen kontaminaatio voi aiheuttaa epätarkkoja ja epäluotettavia tuloksia.
- Määrityksen optimaalinen suorituskyky ja säilytys edellyttää asianmukaista levytyyppiä. Muista noudattaa kohdassa [Käyttöohjeet sivulla 15](#) olevia levynsiirto-ohjeita.
- Jos levyn tiivisteitä ei aseteta tai poisteta huolellisesti, seurauksena voi olla ristikontaminaatio tai näytteen menetys (katso kohta [Kirjaston valmistelulevyjen käsittely sivulla 13](#)).
- Jos annettuja ohjeita ei noudateta, tuloksena voivat olla virheelliset tulokset tai kirjaston laadun merkittävä heikentyminen.
- Määrityksen komponentteja on säilytettävä määritetyssä lämpötilassa.
- Älä säilytä reagensseja huurtumattomassa säilytysyksikössä.
- Älä käytä väärin säilytettyjä reagensseja.
- Sarjan komponentteja ei saa käyttää sarjan etiketissä mainitun viimeisen käyttöpäivämäärän jälkeen.
- Valmistele 0.2N NaOH (laimennettu HP3) tuore erä käyttöpäivänä ja hävitä jäljellä oleva määrä käytön jälkeen.
- Valmistele tuore 80-prosenttinen etanoli RNase/DNase-vapaalla vedellä käyttöpäivänä. Etanoli voi absorboida vettä ilmasta, mikä voi vaikuttaa tuloksiin. Hävitä 80-prosenttinen etanoliliuos käytön jälkeen voimassa olevien määräysten mukaisesti. Käytä molekyylibiologisen luokan etanolia.

## Menetelmää koskevia huomautuksia

### Vinkkejä ja tekniikoita

#### Ristikontaminaation välttäminen

- Kun lisätään tai siirretään näytteitä, vaihda kärkiä *jokaisen näytteen* välillä.
- Kun lisäät adaptereita tai alukkeita monikanavapipetillä, vaihda kärjet *jokaisen kuopan* välillä.
- Sulje ja avaa levyt varovasti työpöydällä näytteiden ristikontaminaation estämiseksi.
- Kontaminoitumisen välttämiseksi jokainen indeksikuoppa on kertakäyttöinen.
- Käytä merkittyjä kaukalon tilavuuksia äläkä kaada lopun kaukalon tilavuutta takaisin vakioputkiin, sillä se voi aiheuttaa kontaminaatiota. Työnkulun tueksi on riittävästi tilaa.
- Älä yhdistä eri valmistelujen kirjastoja.

## Pipetoinnin tarkkuus

Noudata seuraavia ohjeita, kun käytät monikanavaisia pipettejä:

- Varmista, että tulppakärjet ovat hyvin paikalleen istuvia ja sopivat monikanavaisen pipetin merkille ja mallille.
- Kiinnitä kärjet etenevällä pyörintäliikkeellä varmistaaksesi, että kaikki kärjet kiinnittyvät yhtä hyvin.
- Aspiroi niin, että kaikissa kärjissä on yhtä paljon nestettä.
- Pipetoi viskoosiset liuokset (BLT-PF,CB,ELM,TWB2) hitaasti.
- Tarkista annostelun jälkeen, että nestettä on annosteltu joka kärjestä.

## Vaahtoutumisen välttäminen

- Pipetoi hitaasti ja sekoita kääntämällä ylösalaisin. Älä vorteksoi ELM ja TWB2.

## Indeksilevyjen käsittely

- Puhkaise foliotiiviste vain käytettäville indekseille.
- Käsittele levyä reunoittain ja vältä koskettamasta foliotiivistettä millään muulla kuin puhtailla pipetin kärjillä.
- Älä käytä uudelleen lävistettyjä kuoppia.
- Hävitä käyttämätön määrä (~30 µl) käytön jälkeen etulevyn lävistetyistä kuopista ja aseta tiiviste lävistetyille kuopille ristikontaminaation välttämiseksi.
- Älä aseta tiivistettä käyttämättömien kuoppien päälle, sillä se häiritsee lävistystä.

## Kirjaston valmistelulevyjen käsittely

- Sulje levy aina ennen varastointia, ravistamista, inkuboimista tai sentrifugointia.
- Peitä levy kiinnittämällä liimapintainen kansi tiukasti levyyn tiivistyskiilalla tai -telalla.
- Varmista, että reunat ja kuopat on suljettu täysin ristikontaminaatoriskin ja haihtumisriskin vähentämiseksi.
- Peitä aina levyt uudella levyn liimapintaisella sulkukannella. Älä käytä sulkukansia uudelleen.
- Aseta levy tasaiselle alustalle ennen tiivisteiden varovaista poistamista.
- Jos muuta ei ole määritetty, vaiheet voidaan suorittaa levyn ollessa magneetin päällä tai pois magneetista.

## Levyn siirrot

- Kun tilavuuksia siirretään levyjen välillä, siirrä määritetty tilavuus levyn kustakin kuopasta kohdelevyn vastaavaan kuoppaan.

## Kaukalot

- Reagenssikaukaloita voidaan käyttää tarvittaessa. Noudata seuraavia ohjeita:
  - Valmistele kaukalo CB:llä vorteksoinnin jälkeen. CB:ää ei tarvitse palauttaa putkeen ja pyöristää ennen toista helmien lisäysvaihetta.
  - Etiketoi kaukalot TWB2 ja RSB sekaannusten välttämiseksi.
  - Hävitä reagenssit tarvittaessa tai työnkulun lopussa.
- Käytä suositeltua tilavuutta. Suositeltuihin tilavuuksiin sisältyy 1 ml ylijäämää kaukalon kuollutta tilavuutta varten.

- RSB ja TWB2 on pakattu vastaaviin putkiin. Lue jokainen etiketti huolellisesti ennen käyttöä.

## Sentrifugointi

- Sentrifugoi vain kaivon pohjalla olevien nesteiden tai helmien konsolidointimenetelmän osoitetuissa vaiheissa, jotta näytettä ei menetetä.

## Helmien käsittely

- Ei saa pakastaa Cleanup Beads (CB).
- Helmiä pestessä:
  - Käytä Magnetic Stand-96:ta kaikille MIDI-levyille.
  - Annostele nestettä siten, että kuopan sivulle ei jää helmiä.
  - Pidä levy magneettisessa jalustassa.
- Lisää aina reagensseja kuopan keskelle tai pohjaan koskematta helmipellettiin. Älä lisää reagensseja kuopan yläosaan.
- Pipetoi helmisuspensiot hitaasti.
- Sekoita helmiä vorteksoimalla, kunnes ne ovat jakautuneet hyvin. Nesteen värin on oltava homogeeninen. Vorteksoi protokollassa määritetyllä tavalla varmistaaksesi, että helmet resuspendoidaan uudelleen käytön aikana.
- Jos helmet eivät suspendoidu uudelleen, ravista uudelleen.
- Jos rakeet aspiroidaan pipettien kärkiin, annostele ne takaisin magneettisella jalustalla olevalle levyille ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
- Säilytä pystyasennossa varmistaaksesi, että helmet ovat upotettuina puskurisiin, kun ne palautetaan säilytykseen käytön jälkeen.

## Kontrollit

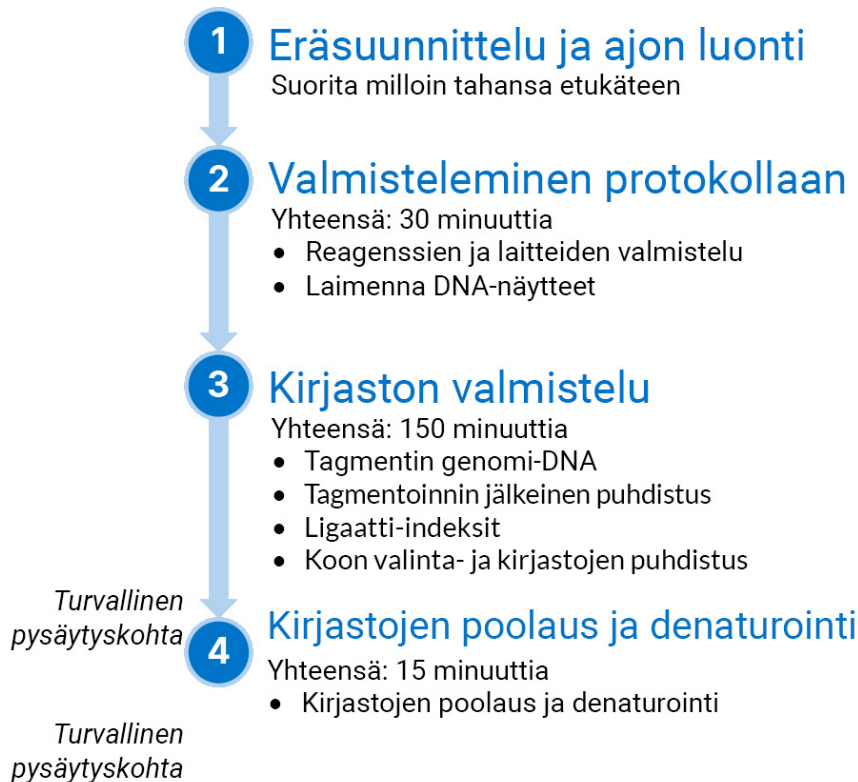
TruSight Whole Genome käyttää TruSight Whole Genome Analysis Application -ohjelmistoon sisäänrakennettuja analyttisiä kontrolleja tietojen kvalifointiin eikä edellytä ulkoisten eräkontrollien käyttöä. Katso lisätietoja mittaustiedoista kohdasta [Laadunvalvonta sivulla 32](#).

# Käyttöohjeet

## TruSight Whole Genome Dx Library Prep -työnkulku

Seuraava kaavio kuvaa TruSight Whole Genome Dx Library Prep -työnkulku. Turvalliset pysähdyskohdat on merkitty vaiheiden väliin.

Jos se pysähtyy, palauta alkuperäisissä putkissa jäljellä olevat [Mukana tulevat reagenssit sivulla 5](#). Jos jatkat, siirry protokollan seuraavaan osaan valmisteltujen reagenssien kanssa.



## Eräsuunnittelu ja ajon luonti

Suunnittele erän näytekirjastojen määrä sekä sekvensointiajojen indeksointi ja yhdistäminen.

TruSight Whole Genome on arvioitu ja suorituskyky osoitettu neljän S2-virtauskennon indeksisarjan ([Kuva 1, Taulukko 4](#)) ja kahden S4-virtauskennon indeksisarjan ([Kuva 2, Taulukko 5](#)) osalta. Ohjelmisto valvoo määritettyjen indeksijoukkojen käyttöä. Älä sekoita ja sovita yhteen määritettyjen indeksisarjojen välillä.

Näiden suositusten ulkopuolista sekvensointia ei tueta.

S2-indeksi ja S4-indeksijoukko tukevat yhdessä 6, 12, 16, 18, 22 ja 24 näytteen kirjaston valmistelueräkokoja. Käytä yhteensopivat indeksisarjat, jotka on lueteltu kohdassa kunkin kirjaston valmistelueräkoon [Taulukko 3](#) osalta.



## HUOMIO

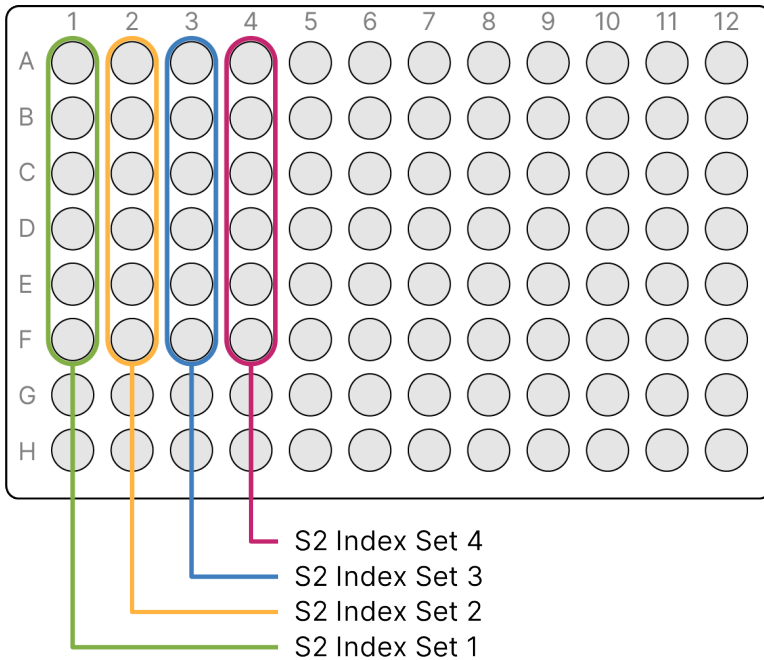
Järjestä näytteet levylle käyttäen suuntausta, joka vastaa suunniteltua indeksointia, eli rivejä A–H 16 pleksille tai rivejä A–F 6 pleksille. Lisää indeksejä monikanavaisella pipetillä, jotta kuoppaa ei ohiteta tai yhteen näytteeseen ei lisätä kahta indeksisarjaa, mikä voi aiheuttaa tuloksia tai vääriä tuloksia.

Taulukko 3 Indeksijoukon asetukset kirjaston valmistelueraalle

Kirjaston valmistelueraan koko	Indeksijoukko	Virtauskennon kokoonpanot
6 näytettä	S2-indeksijoukko 1, 2, 3 tai 4 (valitse mikä tahansa 1 sarja)	S2 x 1
12 näytettä	S2-indeksijoukko 1, 2, 3 tai 4 (valitse mitkä tahansa 2 sarjaa)	S2 x 2
18 näytettä	S2-indeksijoukko 1, 2, 3 tai 4 (valitse mitkä tahansa 3 sarjaa)	S2 x 3
24 näytettä	S2-indeksijoukko 1, 2, 3 ja 4	S2 x 4
16 näytettä	S4-indeksijoukko 1 tai 2	S4 x 1
22 näytettä	S4-indeksijoukko 1 + S2-indeksijoukko 3 tai 4 S4-indeksijoukko 2 + S2-indeksijoukko 1 tai 2	S4 x 1 ja S2 x 1



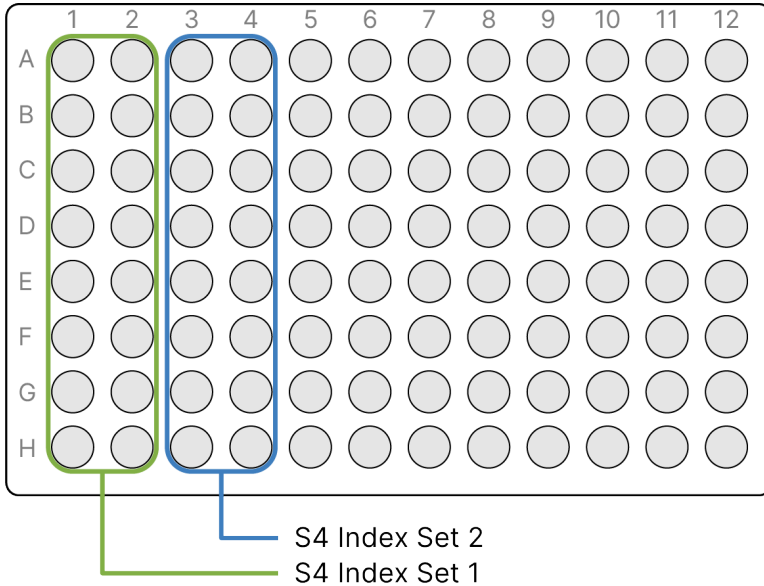
Kuva 1 Indeksilevyn asettelu, jossa näkyy neljä indeksijoukkoa S2-virtaussolujen sekvensointia varten



Taulukko 4 S2-indeksijoukot S2-virtauskennolle

	S2-indeksijoukko 1 (vihreä)	S2-indeksijoukko 2 (keltainen)	S2-indeksijoukko 3 (sininen)	S2-indeksijoukko 4 (magenta)
	1	2	3	4
<b>A</b>	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
<b>B</b>	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
<b>C</b>	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
<b>D</b>	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
<b>E</b>	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
<b>F</b>	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094

Kuva 2 Indeksilevyn asettelu, jossa näkyy neljä indeksijoukkoa S4-virtauskennojen sekvensointia varten



Taulukko 5 S4-indeksijoukot S4-virtauskennoille

	S4-indeksijoukko 1 (vihreä)		S4-indeksijoukko 2 (sininen)	
	1	2	3	4
<b>A</b>	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
<b>B</b>	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
<b>C</b>	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
<b>D</b>	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
<b>E</b>	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
<b>F</b>	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094
<b>G</b>	UDP0043	UDP0071	UDP0087	UDP0095
<b>H</b>	UDP0044	UDP0072	UDP0088	UDP0096

Kirjaa yksilöllinen erän nimi ja näytetiedot, mukaan lukien näytetunnus, siihen liittyvä indeksilevyn kuoppatunnus (katso [Liite A sivulla 85](#)), kirjastolevy, kirjastolevyn kuoppatunnus ja kirjastoputken tunnus (jos tiedossa). Nämä tiedot syötetään ajon luomisen aikana.

Ohjeita siitä, miten sovellusta käytetään ajon luomiseen, on kohdassa TruSight Whole Genome Analysis Application -opas (asiakirjanro 200049931). Kirjaa tarvikkeiden lataamisen aikana käytettävä ajonimi.



### HUOMIO

Varmista, että kirjaston valmistelun aikana käytetyt indeksit ja niihin liittyvät näytteet vastaavat niitä, jotka on tallennettu ja joita käytetään Create Run (Ajon luomiseen). Poikkeamat voivat aiheuttaa virheellisten tulosten raportoinnin tai ilman tuloksia.

## Valmisteleminen protokollaan

### Reagenssien ja laitteiden valmistelu

Jos suunnittelet sekvenssointia samana päivänä, sulata sekvenssointitarvikkeet etukäteen. Katso yksityiskohtaiset ohjeet kohdasta NovaSeq 6000Dx Instrument tekninen dokumentaatio (asiakirjanro 200010105).

1. Esilämmitä mikronäyteinkubaattori yhdessä MIDI-levyinsertin kanssa 47 °C:n lämpötilaan.
2. Ota seuraavat reagenssit laatikosta ja sulata ne seuraavasti.

Taulukko 6 Säilytys -25 °C ... -15 °C

Reagenssi	Laatikon nimi	Sulatusohjeet
BLT-PF	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
ELM	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia. Pidä sitä sitten jäällä, kunnes sitä tarvitaan.
HP3	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
TB1	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
UD-indeksit	TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual – ainutlaatuiset kaksoisindeksit	Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.

Taulukko 7 Säilytys 15 °C ... 30 °C

Reagenssi	Laatikon nimi	Sulatusohjeet
CB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Käytä huoneenlämpötilassa.
RSB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Käytä huoneenlämpötilassa.
ST2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Käytä huoneenlämpötilassa.
TWB2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Käytä huoneenlämpötilassa.
NB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Käytä huoneenlämpötilassa.

**HUOMIO**

Tämä reagenssisarja sisältää mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengityksen, nielemisen sekä iho- ja silmäkosketuksen kautta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta osoitteessa [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

**Valmistele DNA-näytteet**

Valmistele seuraavat tarvikkeet.

- Kvantifioidut gDNA-näytteet:
  - a. Tuo huoneenlämpöön.
  - b. Kerää pisarat sentrifugoimalla putki nopeasti.
  - c. Sekoita vorteksoimalla tai pipetoimalla ja sentrifugoi sen jälkeen lyhyen aikaa.
- RSB- Sekoita vorteksoimalla tai kääntämällä ylösalaisin. Säilytä huoneenlämpötilassa.
  - RSB ja TWB2 on pakattu vastaaviin putkiin. Lue jokainen etiketti huolellisesti ennen käyttöä.

**Toimenpide**

Laske laimennettujen DNA-näytteiden valmisteluun tarvittavat tilavuudet riippuen DNA:n syötöstä, joka vaihtelee käytetyn DNA:n kvantifointimenetelmän mukaan. Alla on kaavat kolmelle testatulle DNA-kvantifointimenetelmälle. Katso lisätietoja DNA [DNA-syötesuosituks](#)et sivulla 10 ja [Liite B](#) sivulla 88.

Laskelmissa oletetaan, että pipetointitilavuus on vähintään 2,0 µl ja että se sisältää 10 %:n ylityksen. Pyöritys on tehtävä viimeisissä vaiheissa laskennan jälkeen käyttäen tarvittavaa määrää desimaaleja tarkan pipetoinnin varmistamiseksi.

**Vaihtoehto 1: 280 ng DNA-syöttö Quant- ja Qubit-laaja-alueen kvantitointimenetelmille**

Näytteen DNA-ainekonsentraatio on vähintään 11,2 ng/µl. Näytteet < 11,2 ng/µl epäonnistuvat todennäköisemmin kirjaston laadunvalvonnassa sekvensoinnin jälkeen. DNA-varaston pitoisuudesta riippuen suorita laskutoimitukset jollakin seuraavista yhtälöistä.

1. Kun DNA-ainekonsentraatio on 11,2–154,0 ng/µl, laske DNA-ainekonsentraation tilavuus ja RSB tarvittava käyttämällä 27,5 µl:n (25 µl + 10 %:n ylitys) laimennettua DNA:ta vakiona:
  - a. Laske DNA-varaston tilavuus:

$$\begin{aligned}
 \text{DNA-varaston tilavuus}(\mu\text{l}) &= \frac{(\text{tulon DNA-kohde (ng)} + 10\% \text{ ylijäämä})}{\text{DNA-varaston pitoisuus (ng}/\mu\text{l})} \\
 &= 280 \text{ ng} \times 1.1 / \text{DNA-varaston pitoisuus (ng}/\mu\text{l}) \\
 &= 308 \text{ ng} / \text{DNA-varaston pitoisuus (ng}/\mu\text{l})
 \end{aligned}$$

b. Laske RSB-varaston tilavuus:

$$\begin{aligned}
 \text{RSB-tilavuus}(\mu\text{l}) &= \text{laimennetun DNA : n kokonaistilavuus}(\mu\text{l}) - \text{laskettu DNA - kantatilavuus}(\mu\text{l}) \\
 &= 27.5(\mu\text{l}) - \text{laskettu DNA- kantatilavuus}(\mu\text{l})
 \end{aligned}$$

c. Tarkista laskelmat: Vahvista laskettu DNA-varastotilavuus ( $\mu\text{l}$ ) + laskettu tilavuus RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 27,5  $\mu\text{l}$ , laimennetun DNA:n kokonaistilavuus (vakio, 25  $\mu\text{l}$  + 10 %:n ylitys).

2. Vaihtoehtoisesti, kun DNA-kantapitoisuus on > 154,0 ng/ $\mu\text{l}$ , laske laimennetun DNA:n kokonaistilavuus ja RSB tarvittava käyttämällä DNA-kantatilavuutta 2,0  $\mu\text{l}$  ja kohdelaimennettua DNA-kantapitoisuutta 11,2 ng/ $\mu\text{l}$  vakioina.

a. Laske laimennetun DNA:n kokonaistilavuus:

$$\begin{aligned}
 \text{Laimennetun DNA : n kokonaistilavuus}(\mu\text{l}) &= \frac{\text{DNA-varaston pitoisuus (ng}/\mu\text{l}) \times \text{DNA-varaston tilavuuden}(\mu\text{l})}{\text{Laimennetun DNA-varaston pitoisuus}} \\
 &= \text{DNA-varaston pitoisuus (ng}/\mu\text{l}) \times 2.0 \mu\text{l} / 11.2 \text{ ng}/\mu\text{l}
 \end{aligned}$$

b. Laske RSB-tilavuus:

$$\begin{aligned}
 \text{RSB-tilavuus}(\mu\text{l}) &= \text{Laimennetun DNA : n laskettu kokonaistilavuus}(\mu\text{l}) - \text{DNA : n varastotilavuus}(\mu\text{l}) \\
 &= \text{Laimennetun DNA : n laskettu kokonaistilavuus}(\mu\text{l}) - 2.0 \mu\text{l}
 \end{aligned}$$

c. Tarkista laskelmat: Vahvista laskettu laimennetun DNA:n kokonaistilavuus ( $\mu\text{l}$ ) - laskettu tilavuus RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 2,0  $\mu\text{l}$ , DNA:n varastotilavuus (vakio).

Siirry alla olevaan vaiheeseen 3.

## Vaihtoehto 2: 350 ng DNA-tulo Accuclear Ultra High Sensitivity Quantitation Method -menetelmää varten

Näytteen DNA-ainekonsentraatio on 14,0 ng/ $\mu\text{l}$ . Näytteet < 14,0 ng/ $\mu\text{l}$  epäonnistuvat todennäköisemmin kirjaston laadunvalvonnassa sekvensoinnin jälkeen. DNA-varaston pitoisuudesta riippuen suorita laskutoimitukset jollakin seuraavista yhtälöistä.

1. Kun DNA-ainekonsentraatio on 14,0–192,5 ng/ $\mu\text{l}$ , laske DNA-ainekonsentraation tilavuus ja RSB tarvittava käyttämällä 27,5  $\mu\text{l}$ :n (25  $\mu\text{l}$  + 10 %:n ylitys) laimennettua DNA:ta vakiona:

a. Laske DNA-varaston tilavuus:

$$\begin{aligned}
 \text{DNA-varaston tilavuus}(\mu\text{l}) &= \frac{(\text{tulon DNA-kohde (ng)} + 10\% \text{ ylijäämä})}{\text{DNA-varaston pitoisuus (ng}/\mu\text{l})} \\
 &= 350 \text{ ng} \times 1.1 / \text{DNA-varaston pitoisuus (ng}/\mu\text{l}) \\
 &= 385 \text{ ng} / \text{DNA-varaston pitoisuus (ng}/\mu\text{l})
 \end{aligned}$$

- b. Laske RSB-varaston tilavuus:

$$\begin{aligned} \text{RSB tilavuus } (\mu\text{l}) &= \text{laimennetun DNA : n kokonaistilavuus; } (\mu\text{l}) - \text{laskettu DNA- kantatilavuus } (\mu\text{l}) \\ &= 27.5 (\mu\text{l}) - \text{laskettu DNA- kantatilavuus } (\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- c. Tarkista laskelmat: Vahvista laskettu DNA-varastotilavuus ( $\mu\text{l}$ ) + laskettu tilavuus RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 27,5  $\mu\text{l}$ , laimennetun DNA:n kokonaistilavuus (vakio, 25  $\mu\text{l}$  + 10 %:n ylitys).

2. Vaihtoehtoisesti, kun DNA-kantapitoisuus on > 192,5 ng/ $\mu\text{l}$ , laske laimennetun DNA:n kokonaistilavuus ja RSB tarvitaan käyttämällä DNA-kantatilavuutta 2,0  $\mu\text{l}$  vakiona.

- a. Laske laimennetun DNA:n kokonaistilavuus:

$$\text{Laimennetun DNA : n kokonaistilavuus } (\mu\text{l}) = \frac{\text{DNA-ainespitoisuus (ng/\mu l)} \times 2.0 \mu\text{l}}{14.0 \text{ ng/\mu l}}$$

- b. Laske RSB-tilavuus:

$$\begin{aligned} \text{RSB-tilavuus } (\mu\text{l}) &= \text{Laimennetun DNA : n kokonaistilavuus } (\mu\text{l}) - \text{DNA : n varastotilavuus } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Kokonaistilavuus } (\mu\text{l}) - 2.0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Tarkista laskelmat: Vahvista laskettu laimennetun DNA:n kokonaistilavuus ( $\mu\text{l}$ ) - laskettu tilavuus RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 2,0  $\mu\text{l}$ , DNA:n varastotilavuus (vakio).

- Merkitse jokaiseen laimennettuun näytteeseen uusi 0,5 ml:n mikrosentrifugiputki.
- Lisää yllä RSB laskettu tilavuus vastaavaan putkeen kutakin laimennettua näytettä kohden.
- Lisää edellä laskettu määrä DNA-varastoa kunkin laimennetun näytteen vastaavaan putkeen.
- Pulssita vortex ja sentrifugoi sitten nopeasti.

## Kirjaston valmistelu

Valmistele reagenssit etukäteen tämän osan valmisteluvaiheiden mukaisesti.

Ellei pysähtymispistettä ole määritetty, jatka välittömästi seuraavaan vaiheeseen.

### Valmisteleminen

Valmistele seuraavat tarvikkeet:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free) – Sekoita vorteksoimalla. Jos käytät useita putkia, sekoita vorteksoimalla yhdistä sen jälkeen.
- TB1 (Tagmentation Buffer 1):
  - a. Sekoita vorteksoimalla.
  - b. Sentrifugoi lyhyesti.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
  - a. Tarkista saostumien varalta. Jos havaitaan saostumia, lämmitä 37 °C:n lämpötilassa 10 minuuttia ja vorteksoi sitten, kunnes saostumat liukenevat.

- b. Sekoita vorteksoimalla ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- ELM (Extension-Ligation Mix):
  - a. Käännä sekoittamista varten. Älä vorteksoi.
  - b. Säilytä jäässä käyttöön asti.
- HP3 (2N NaOH):
  - a. Vorteksoi ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - b. Säilytä huoneenlämpötilassa.
- NB (Neutralization Buffer):
  - a. Vorteksoi ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - b. Säilytä huoneenlämpötilassa.
- CB (Cleanup Beads):
  - a. Vorteksoi 1 minuutti.
  - b. Käännä ylösalaisin 2–5 kertaa ja vorteksoi huolellisesti suspendoidaksesi uudelleen.
- Indeksiaadapterit (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
  - a. Vorteksoi ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
  - b. Säilytä huoneenlämpötilassa.
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
  - a. Merkitse putken korkki TWB2.
  - b. Sekoita kääntämällä perusteellisesti ylösalaisin.
- Yhdistä seuraavat tilavuudet merkinnällä 0.2N NaOH varustettuun mikrosentrifugiputkeen valmistellaksesi 0.2N NaOH suunnitellun eräkoon mukaisesti. Sekoita vorteksoimalla.

**HUOMAUTUS** Jos aiot yhdistää ja denaturoida kirjastot samana päivänä, valmistele lisää 0.2N NaOH:tä. Katso [Valmisteleminen sivulla 29](#).

Reagenssi	6 näytettä (µl)	12 näytettä (µl)	16 näytettä (µl)	18 näytettä (µl)	22 näytettä (µl)	24 näytettä (µl)
HP3	30	60	80	90	110	120
RSB	270	540	720	810	990	1 080

- Yhdistä seuraavat tilavuudet 15 ml:n kartiomaiseen putkeen 80-prosenttisen EtOH:n valmistamiseksi suunnitellun eräkoon mukaisesti. Sisältää kaukalon käyttöön liittyvän tilavuuden ylityksen. Sekoita vorteksoimalla.

Reagenssi	6 näytettä (ml)	12 näytettä (ml)	16 näytettä (ml)	18 näytettä (ml)	22 näytettä (ml)	24 näytettä (ml)
100-prosenttinen etanoli, puhdas (200 Proof)	4	8	8	12	12	12
Nukleasivapaa vesi	1	2	2	3	3	3



## HUOMIO

Tämä reagenssisarja sisältää mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengityksen, nielemisen sekä iho- ja silmäkosketuksen kautta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta osoitteessa [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Tagmentin genomi-DNA

Tässä vaiheessa käytössä on Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) DNA:n tagmentointiin. Se on prosessi, jossa DNA fragmentoidaan ja merkitään sovitinsekvenssitunnisteilla.

### Tarvikkeet

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

### Toimenpide

1. Varmista, että mikronäyteinkubaattori yhdessä MIDI-levyinsertin kanssa lämmitetään 47 °C:n lämpötilaan.
2. Merkitse uuteen 96-kaivoiseen MIDI-levyyn merkintä LP1 (Library Plate 1).
3. Määritä ja kirjaa näytekaivon tunnuksat laimennettujen DNA-näytteiden ja reagenssien merkitsemistä varten.
4. Siirrä 25 µl laimennettua näyte-DNA:ta kuhunkin kaivoon.
5. Lisää 10 µl TB1 -reagenssia kuhunkin kaivoon.
6. Vorteksoi BLT-PF voimakkaasti 1 minuutin ajan resuspendointia varten. Älä sentrifugoi. Toista tarvittaessa.
7. Lisää 15 µl:n BLT-PF -reagenssia kuhunkin kaivoon.
8. Sulje ja ravista LP1:tä nopeudella 1 800 rpm 1 minuutin ajan.



9. Inkuboi LP1:tä esilämmitetyssä mikronäyteinkubaattorissa 47 °C:ssa 8 minuutin ajan.

**HUOMAUTUS** Levyn tiivisteeseen on odotettavissa kevyen kondensaation muodostumista. Älä sentrifugoi.

10. Poista tiiviste ja lisää 10 µl ST2 jokaiseen kaivoon.

11. Sulje ja ravista LP1:tä nopeudella 1 800 rpm 1 minuutin ajan ja siirry sitten seuraavaan osaan.

## Tagmentoinnin jälkeinen puhdistus

Seuraavat vaiheet pesevät sitoutumattoman DNA:n pois ja suorittavat puskurinvaihdon valmistautuakseen seuraavaan vaiheeseen.

### Tarvikkeet

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Kaukalo

### Tietoa reagensseista

- Pipetoi TWB2 hitaasti vaahtoamisen minimoimiseksi.
- RSB ja TWB2 on pakattu vastaaviin putkiin. Lue jokainen etiketti huolellisesti ennen käyttöä.

### Toimenpide

1. Poista sinetti, aseta LP1 magneettijalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
2. Valmistele TWB2 kaukalo tilavuuksilla seuraavan taulukon mukaisesti ja merkitse kaukalo selvästi tunnuksella TWB2. Tilavuuksiin sisältyy 1 ml ylijäämää kaukalon kuollutta tilavuutta varten. Säilytä kaukalo myöhempiä vaiheita varten.

Reagenssi	6 näytettä (µl)	12 näytettä (µl)	16 näytettä (µl)	18 näytettä (µl)	22 näytettä (µl)	24 näytettä (µl)
TWB2	3 700	6 400	8 200	9 100	10 900	11 800

3. Kun LP1 on magneettijalustalla, poista ja hävitä supernatantti jokaisesta kuopasta monikanavapipetillä, joka on asetettu 60 µl:aan, häiritsemättä helmipellettiä.
4. Lisää monikanavaisella pipetillä 150 µl TWB2 jokaiseen kuoppaan.
5. Sulje ja ravista LP1:tä nopeudella 1 800 rpm 1 minuutin ajan.
6. Poista sinetti, aseta LP1 magneettijalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
7. Palauta BLT-PF pakastimeen inkuboinnin ajaksi ja siirry sitten seuraavaan vaiheeseen.

### Ligaatti-indeksit

Tässä osiossa käyttäjät sitovat ainutlaatuiset kaksoisindeksisovittimet kuhunkin näytteeseen [Eräsuunnittelu ja ajon luonti sivulla 15](#) aikana suunnitellun indeksoinnin mukaisesti.

## Tarvikkeet

- ELM (Extension-Ligation Mix)
- Indeksiaadapterit (UDI PCR-Free (32 Indexes))
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2) kaukalo
- 0.2N NaOH (Laimennettu HP3)

## Tietoa reagensseista

- Indeksilevyn kuoppia ei voi käyttää uudelleen.
- Aspiroi ja annostele ELM hitaasti liuoksen viskositeetin vuoksi.
- RSB ja TWB2 on pakattu vastaaviin putkiin. Lue jokainen etiketti huolellisesti ennen käyttöä.

## Toimenpide

1. Pidä LP1 magneettialustalla ja suorita seuraavat vaiheet:
  - a. Poista ja hävitä supernatantti jokaisesta kuopasta 150 µl:n monikanavapipetillä.
  - b. Käytä 20 µl:n pipettiä poistaaksesi ja hävittääksesi jäännökset TWB2 kustakin kuopasta häiritsemättä helmipellettiä.
  - c. Lisää 45 µl ELM -reagenssia kuhunkin kuoppaan.
  - d. Lävistä indeksisovitinlevyn foliotiiviste kullekin suunnitellulle indeksikaivolle monikanavaisella P200-pipetillä ja uusilla pipetin kärjillä. Kontaminoitumisen välttämiseksi käytä jokaiseen kuoppaan uutta pipetinkärkeä.
  - e. Lisää 5 µl indeksisovittimia vastaaviin LP1:n näytekaivoihin eräsuunnittelun aikana monikanavaisella P-10- tai P-20-pipetillä valittujen indeksien mukaisesti.
2. Sulje ja ravista LP1:tä nopeudella 1 800 rpm 1 minuutin ajan.
3. Inkuboi LP1:tä esilämmitetyssä mikronäyteinkubaattorissa 47 °C:ssa 8 minuutin ajan.

**HUOMAUTUS** Levyn tiivisteeseen on odotettavissa kevyen kondensaation muodostumista. Älä sentrifugoi.

4. Palauta ELM jäädytettyyn säilytystilaan inkuboinnin aikana.
5. Poista sinetti, aseta LP1 magneettialustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
6. Kun LP1 on magneettialustalla, käytä monikanavapipettiä, joka on asetettu 50 µl:aan, poista ja hävitä supernatantti jokaisesta kuopasta häiritsemättä helmipellettiä.
7. Pese rakeet seuraavasti.
  - a. Lisää 150 µl TWB2 helmiin kussakin kuopassa monikanavaisella pipetillä.
  - b. Sulje ja ravista LP1:tä nopeudella 1 800 rpm 1 minuutin ajan.
  - c. Poista sinetti, aseta LP1 magneettialustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).

- d. Kun LP1 on magneettijalustalla, poista ja hävitä supernatantti jokaisesta kuopasta monikanavapipetillä, joka on asetettu 150 µl:aan, häiritsemättä helmipellettiä.
8. Pese rakeet **toisen** kerran.
9. Kun LP1 on magneettijalustalla, käytä monikanavapipettiä, joka on asetettu 20 µl:aan, poista ja hävitä jäännös TWB2 jokaisesta kuopasta häiritsemättä helmipellettiä.
10. Lisää 45 µl aiemmin valmistettua 0.2N NaOH kuhunkin kuoppaan.
11. Sulje ja ravista LP1:tä nopeudella 1 800 rpm 1 minuutin ajan ja siirry sitten seuraavaan osaan.

## Koon valinta- ja kirjastojen puhdistus

Tässä vaiheessa käytetään kaksipuolista kirjastojen koon valintaa. Ensimmäisessä vaiheessa Cleanup Beads ne lisätään eluoituihin kirjastoihin ja BLT-PFhelmiin. Sitten eluoidun yksijuosteisen kirjaston sisältävä supernatantti siirretään uuteen levyyn, kun taas liian suuret fragmentit jäävät jälkeen. Toisessa vaiheessa Cleanup Beads lisätään siirrettyihin kirjastoihin ja liian pienet fragmentit poistetaan. Sitten kirjastot eluoidaan ja siirretään lopulliselle kirjastolevyille (FLP).

## Tarvikkeet

- 96 kuopan MIDI-levy
- Kaukalot (3)
- PCR-levy
- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Vasta valmistettu 80-prosenttinen etanoli (80 % EtOH)

## Valmisteleminen

1. Vorteksoi CB ja käännä sitten, kunnes täysin suspendoitu uudelleen.
2. Valmistele CB kaukalo tilavuuksilla seuraavan taulukon mukaisesti ja merkitse kaukalo tunnuksella CB. Tilavuudet riittävät molempiin lisäysvaiheisiin ja sisältävät 1 ml ylijäämää kaukalossa kuollutta tilavuutta varten. CB lisäysvaiheiden välillä ei tarvitse sekoittaa. Helmet pysyvät hajautettuina toimenpiteen ajan.

Reagenssi	6 näytettä (µl)	12 näytettä (µl)	16 näytettä (µl)	18 näytettä (µl)	22 näytettä (µl)	24 näytettä (µl)
CB	1 480	1 960	2 280	2 440	2 760	2 920

## Toimenpide

1. Poista tiiviste ja lisää 40 µl CB:ää LP1 MIDI -levyn kaivoihin, joissa on BLT-PF ja 0.2N NaOH.
2. Sulje ja ravista LP1:tä nopeudella 1 800 rpm 1 minuutin ajan.
3. Inkuboi LP1:tä pois magneettijalustalta huoneenlämmössä 2 minuutin ajan.

4. Poista sinetti, aseta LP1 magneettijalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (5 minuuttia).
5. Merkitse uusi 96-kuoppainen LP2 MIDI -levyn inkuboidessa.
6. *Siirrä* 80 µl supernatanttia LP1:stä magneettijalustassa vastaaviin LP2:n kuoppiin monikanavaisella pipetillä.
7. Lisää 40 µl CB:tä kuhunkin LP2 MIDI -levyn kuoppaan.
8. Sulje ja ravista LP2:ta nopeudella 1 800 rpm, 1 minuutin ajan.
9. Hävitä LP1 MIDI -levy.
10. Inkuboi LP2:ta pois magneettijalustalta huoneenlämmössä 2 minuutin ajan.
11. Poista sinetti, aseta LP2 magneettijalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (5 minuuttia).
12. Kun LP2 on magneettijalustalla, poista ja hävitä supernatantti jokaisesta kuopasta monikanavapipetillä, joka on asetettu 120 µl:aan, helmipellettiin koskematta.
13. Kaada aiemmin valmistettua 80-prosenttista EtOH:ta merkittyyn kaukaloon ja pese helmet LP2:lla magneetilla seuraavasti.
  - a. Lisää 180 µl 80 % EtOH:ta monikanavaisella pipetillä.
  - b. Odota 30 sekuntia.
  - c. Poista ja hävitä kaikki supernatantti kustakin näytekuopasta 180 µl:aan asetetulla monikanavapipetillä helmipellettiin koskematta.
14. Pese rakeet **toisen** kerran.
15. Kun LP2 on magneettijalustalla, käytä monikanavapipettiä, joka on asetettu 20 µl:aan, poista ja hävitä EtOH-jäännös jokaisesta kuopasta helmipellettiin koskematta.
16. Suorita ilmakeivaus pitämällä LP2 magneettijalustalla 4 minuutin ajan.
17. Hävitä käyttämätön 80-prosenttinen EtOH ja kaukalo.
18. Valmistele RSB kaukalo tilavuuksilla seuraavan taulukon mukaisesti ja merkitse kaukalo tunnuksella RSB. Tilavuuksiin sisältyy 1 ml ylijäämää kaukalon kuollutta tilavuutta varten.

Reagenssi	6 näytettä (µl)	12 näytettä (µl)	16 näytettä (µl)	18 näytettä (µl)	22 näytettä (µl)	24 näytettä (µl)
RSB	1 390	1 780	2 040	2 170	2 430	2 560

19. Lisää 65 µl RSB:tä kunkin kuopan helmiin.
20. Sulje ja ravista LP2:ta nopeudella 1 800 rpm, 1 minuutin ajan.
21. Inkuboi LP2:ta huoneenlämmössä 2 minuuttia.
22. Poista sinetti, aseta LP2 magneettijalustalle ja odota, kunnes neste on kirkasta (2 minuuttia).
23. Merkitse uusi PCR-levy FLP (Final Library Plate) ja erän nimi, jota käytetään ajon luomisessa.
24. *Siirrä* 60 µl supernatanttia LP2:sta (kun magneettijalustassa) vastaaviin FLP:n kuoppiin monikanavaisella pipetillä.



### HUOMIO

Supernatantti sisältää lopullisen kirjaston, ja sitä käytetään poolin ja denaturointivaiheen aikana. Ei saa hävittää.

25. Hävitä kaikki kaukalot ja kaukaloissa olevat reagenssit.

26. Hävitä LP2 MIDI -levy.

### TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, sulje lopullinen kirjastolevy (FLP) Microseal B:llä ja säilytä -25 °C – -15 °C:ssa enintään 14 päivää.

## Kirjastojen poolaus ja denaturointi

Tässä osiossa käyttäjät luovat [Eräsuunnittelu ja ajon luonti sivulla 15](#) suunniteltuja pooleja sekä suorittavat laimennuksen ja denaturoinnin.

### Tarvikkeet

- HP3 (2N NaOH) tai 0.2N NaOH, jos valmiste on valmistettu samana päivänä, vorteksoi ja sentrifugoi sitten hetkellisesti.
- NB (Neutralization Buffer) – Vorteksoi ja sentrifugoi sitten lyhyesti.
- RSB (Resuspension Buffer) – Sekoita vorteksoimalla tai kääntämällä ylösalaisin.
- Mikrosentrifugiputket (1 reagenssin valmisteluun ja 1 jokaiseen suunniteltuun kirjastopooliin)
- NovaSeq 6000Dx Kirjastoputki (osanro 20062290 tai osanro 20062291) (1 putki jokaiselle suunnitellulle kirjastopoolille)

### Valmisteleminen

1. Valmistele 0.2N NaOH yhdistämällä seuraavat tilavuudet mikrosentrifugiputkessa. Merkitse putki 0.2N NaOH. Jos ylimääräinen 0.2N NaOH valmistettiin kirjaston valmistelun aikana ja protokolla suoritetaan samana päivänä, ohita tämä vaihe.

Pienten pipetointivirheiden välttämiseksi valmistetaan ylimääräinen tilavuus.

Reagenssi	Kunin S2-virtauskennon tilavuus (µl)	Kunin S4-virtauskennon tilavuus (µl)
HP3	5	10
RSB	45	90

2. Vorteksoi ja sentrifugoi sitten lyhyesti.

### Toimenpide

1. Jos FLP-levy säilytettiin pakastettuna, valmistele se seuraavasti. Muussa tapauksessa siirry vaiheeseen [2](#). FLP-levy:
  - a. Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
  - b. Sentrifugoi kiihtyvyydellä 1 000 × g 1 minuutin ajan.
  - c. Irrota sinetti FLP:stä.
  - d. Pipetoidaan 5–10 kertaa monikanavapipetillä, joka on säädetty 30 µl:aan.

- e. Suljetaan ja sentrifugoidaan  $1\ 000 \times g$ :n voimakkuudella 1 minuutin ajan.
2. Valitse yksi seuraavista vaihtoehdoista yhdistääksesi, denaturoidaksesi ja laimentaaksesi kirjastot kullekin 6 tai 16 sekvensointia varten suunnitellulle näytteelle.

**Vaihtoehto 1** Jakso 6 -kirjastot S2-virtauskennossa.

- a. Merkitse jokaiseen kirjastopooliin uusi mikrosentrifugiputki poolin nimellä, esimerkiksi poolatut kirjastot (PL) 1, 2, 3 jne.
- b. Poista sinetti ja siirrä 25 µl jokaista DNA-kirjastoa, joka on viivakooditettu tietystä S2-indeksisarjasta FLP-levystä PL-putkeen kullekin vastaavalle suunnitellulle ajolle [Eräsuunnittelu ja ajon luonti sivulla 15](#) aikana suunniteltujen sekvensointipoolien mukaisesti. Yhdistä esimerkiksi S2-indeksisarjalla 1 valmistellut kirjastot PL-putkeen.
- c. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi FLP -levyyn ja palauta säilytykseen.
- d. Lisää 37 µl 0.2N NaOH jokaiseen PL-putkeen.
- e. Sekoita jokainen PL-putki vorteksoimalla. Sentrifugoi lyhyesti.
- f. Inkuboi kutakin PL-putkea huoneenlämmössä 8 minuuttia.
- g. Lisää 38 µl NB jokaiseen PL-putkeen.
- h. Sekoita jokainen PL-putki vorteksoimalla. Sentrifugoi lyhyesti.
- i. Siirrä 225 µl denaturoitua, laimennettua kirjastoa puhtaaseen NovaSeq 6000Dx kirjastoputkeen.



**HUOMIO**

Jos aiemmin on määritetty, NovaSeq 6000Dx kirjaston putken tunnusta käytetään suunnitellun ajon tunnistamiseen ja liittämiseen. Varmista, että kirjaston putkitunnus, johon yhdistelmä siirretään, on sama kirjaston putkitunnus, joka on määritetty Luo suoritusera -kohdassa, tai että näytetulosten välillä voi olla virheellinen yhteys. Jos kirjaston putken ID on määritetty suunnitellussa ajossa, varmista, että käytetään oikeaa putkea. Jos sitä ei ole aiemmin määritetty, kirjaa käytetty kirjastoputken tunnus ja muuta suunniteltua ajoa. Muussa tapauksessa siihen liittyvä suunniteltu ajo(t) on valittava manuaalisesti, kun lataat laitetta ajon nimellä.

**Vaihtoehto 2** Sekvensoi 16 kirjastoa S4-virtauskennossa.

- a. Merkitse uusi mikrosentrifugiputki poolin nimellä, esimerkiksi poolatut kirjastot (PL) 1, 2, 3 jne.
- b. Poista sinetti ja siirrä 18 µl jokaista DNA-kirjastoa FLP-levystä PL-putkeen [Eräsuunnittelu ja ajon luonti sivulla 15](#) aikana suunnitellun sekvensointipoolin mukaisesti. Yhdistä esimerkiksi kirjastot, joissa käytetään S4-indeksisarjaa 1, PL-putkeen.
- c. Kiinnitä liimapintainen levyn sulkukansi FLP -levyyn ja palauta säilytykseen.
- d. Lisää 22 µl RSB PL-putkeen.
- e. Lisää 77 µl 0.2N NaOH PL-putkeen.
- f. Sekoita PL-putki vorteksoimalla. Sentrifugoi lyhyesti.
- g. Inkuboi PL-putkea huoneenlämmössä 8 minuuttia.
- h. Lisää 78 µl NB puskuria PL-putkeen.
- i. Sekoita PL-putki vorteksoimalla. Sentrifugoi lyhyesti.

- j. Siirrä 465 µl denaturoitua, laimennettua kirjastoa puhtaaseen NovaSeq 6000Dx kirjastoputkeen.



### HUOMIO

Jos aiemmin on määritetty, NovaSeq 6000Dx kirjaston putken tunnusta käytetään suunnitellun ajon tunnistamiseen ja liittämiseen. Varmista, että kirjaston putkitunnus, johon yhdistelmä siirretään, on sama kirjaston putkitunnus, joka on määritetty Luo suoritusera -kohdassa, tai että näytetulosten välillä voi olla virheellinen yhteys. Jos kirjaston putken ID on määritetty suunnitellussa ajossa, varmista, että käytetään oikeaa putkea. Jos sitä ei ole aiemmin määritetty, kirjaa käytetty kirjastoputken tunnus ja muuta suunniteltua ajoa. Muussa tapauksessa siihen liittyvä suunniteltu ajo(t) on valittava manuaalisesti, kun lataat laitetta ajon nimellä.

3. Jatka suoraan sekvensointiin, jos aiot aloittaa ajon samana päivänä.

### TURVALLINEN PYSÄYTYSKOHTA

Jos pysäytät, aseta NovaSeq 6000Dx kirjastoputkeen korkki ja aseta se säilytykseen -25 °C ...-15 °C:seen enintään 30 vuorokaudeksi.

## Sekvensoinnin valmisteleminen

1. Noudata NovaSeq 6000Dx Instrument tekninen dokumentaatio (asiakirjanro 200010105) -dokumentaation valmisteluohjeita muiden pakkauksen tarvikkeiden kohdalla.
2. Jos yhdistetyn kirjaston sisältävä NovaSeq 6000Dx kirjastoputki tallennettiin jäädytettynä, valmistele seuraavasti. Jos jatkat suoraan edellisestä osiosta, siirry kohtaan 3.
  - a. Sulata huoneenlämpötilassa 30 minuuttia.
  - b. Poista korkki ja sekoita pipetillä varovasti viisi kertaa käyttäen P1000-pipettiä, joka on asetettu 300 µl:aan S4-virtaussolukirjaston poolin tapauksessa, tai P200-pipettiä, joka on asetettu 145 µl:aan S2-virtaussolukirjaston poolin tapauksessa.
  - c. Sulje NovaSeq 6000Dx kirjastoputki ja ravista mahdolliset pisarat pohjalle käsin. Älä vorteksoi tai sentrifugoi.
3. Lataa tarvikkeet. Katso lisätietoja kohdasta NovaSeq 6000Dx Instrument tekninen dokumentaatio (asiakirjanro 200010105).

## Tulosten tulkinta

TruSight Whole Genome on suunniteltu sekvensoimaan ihmisen koko genomi. Muunnelmia raportoidaan näytteistä, jotka läpäisevät analyttiset laatukontrollit (QC) käytettäväksi alavirran tertiäärinen analyysin ituradan sovelluksissa.

- Sekvensointi-, FASTQ- tai näytteen laatutulosta pidetään pätevänä vain, jos laatumittari täyttää tai ylittää määritellyn spesifikaation. Jos laatumetriikka on alle määritellyn spesifikaation, suorituskyky ilmoitetaan EPÄONNISTUNEEKSI ja näyte on toistettava. Lisätietoja näytteen validiteetin määrittämiseen käytettävistä laatumittareista on kohdassa [Laadunvalvonta sivulla 32](#).

- Näytteiden, jotka läpäisevät kaikki laatuksennykset, odotetaan tarjoavan tarkkuustutkimuksessa kuvatun varianttipuhelun suorituskyvyn (katso [Tarkkuus sivulla 42](#)).
- Pienten varianttien merkintöjä on tehty suurella, keskitason tai alhaisella varmuudella kunkin varianttityypin odotetun suorituskyvyn perusteella (katso kohta [Pienten varianttien luottamustason määrittäminen sivulla 38](#)).
- Laboratorion on validoitava kaikkien varianttietojen tulkinta käyttämällä annettuja analyysitulostiedostoja. Jos haluat lisätietoja tulostiedostoista, katso TruSight Whole Genome Analysis Application -opas (asiakirjanro 200049931).

## Laadunvalvonta

Ajon sekvensointi ja näytteen validiteetti määritetään automaattisesti analyttisillä kontrolleilla, ja ne raportoidaan TruSight Whole Genome Analysis Application -laitteella (katso lisätietoja laadunvalvontamittareista kohdasta [Taulukko 8](#)). TruSight Whole Genome ei edellytä ulkoisten positiivisten kontrollien käyttöä.

- QC-tulokset raportoidaan yhdistetyssä raportissa, kaikkien ajon näytteiden osalta ja yksittäisissä laadunvalvontaraporteissa. Ohjelmisto lähettää raportit analyysikansioon. Katso analyysikansion ja ajokansion sijainnit TruSight Whole Genome Analysis Application -opas (asiakirjanro 200049931) -oppaasta.
- Sekvensointiajon laadunvalvontamäärityksen epäonnistuminen mitätöi sekvensointiajon ja pysäyttää lisäanalyysin.
- Minkä tahansa FASTQ-näytteen tai kirjaston määrityksen epäonnistuminen mitätöi näytekirjaston ja estää siihen liittyvien CRAM- tai VCF-tiedostojen tuotoksen.
- Toteuta laadunvalvonnan lisätoimenpiteitä voimassa olevien paikallisten määräysten tai akkreditointivaatimusten mukaisesti.

Lisätietoja kirjastojen sekvensointiajojen tai testien toistamisesta on kohdassa [Vianmääritys sivulla 69](#).

Taulukko 8 TruSight Whole Genome Laadunvalvonnan mittausmääritysten kuvaukset

	Mittari	Tekniset tiedot	Kuvaus
Sekvensointiajon laadunvalvonta	Yhteensä % $\geq$ Q30	$\geq$ 85	Emästen laadun mittaaminen ajotasolla. Vähimmäismääritys on asetettu, koska liian alhaiset %Q30 ajot eivät läpäise Q30-emäksiä näytekirjaston laadunvalvonnassa.



	Mittari	Tekniset tiedot	Kuvaus
FASTQ-laadunvalvonta	Saanto näytettä kohden (bps)	$\geq 90\,000\,000\,000$	Minimi on asetettu vastaamaan noin 26-kertaista keskimääräistä autosomaalista peittoa kolminkertaisiin näytteisiin (triage samples), jotka eivät läpäise kirjaston laadunvalvontaa analyysiajan lyhentämiseksi.
Näytekirjaston laadunvalvonta	Keskimääräinen autosomaalinen kattavuus	$\geq 35$	Autosomien keskimääräinen kattavuus. Minimimääritys on asetettu analyttisen suorituskyvyn varmistamiseksi.
	Prosenttiosuus autosomeista, joiden kattavuus on yli 20X	$\geq 93,94$	Kattavuuden yhdenmukaisuuden mittaaminen, joka havaitsee ongelmat, jotka eivät välttämättä liity GC-poikkeamaan. Minimimääritys on asetettu analyttisen suorituskyvyn varmistamiseksi.
	Normalisoitu kattavuus 60–79 %:n GC-astioissa	$0,82 \leq x \leq 1,13$	Kattavuuden yhdenmukaisuuden mittaaminen, joka havaitsee GC-poikkeaman, erityisesti kattavuuden menetyksen genomien alueilla, joilla on suurempi %GC ja pienempi %AT-peruskoostumus. Minimi- ja maksimimääritys on asetettu analyttisen suorituskyvyn varmistamiseksi.
	Normalisoitu kattavuus 20–39 %:n GC-astioissa	$0,97 \leq x \leq 1,06$	Kattavuuden yhdenmukaisuuden mittaaminen, joka havaitsee GC-poikkeaman, erityisesti kattavuuden menetyksen genomien alueilla, joilla on pienempi %GC ja suurempi %AT-peruskoostumus. Minimi- ja maksimimääritys on asetettu analyttisen suorituskyvyn varmistamiseksi.

Mittari	Tekniset tiedot	Kuvaus
Keskimääräinen mitokondriokattavuus	$\geq 500$	Mitokondriokromosomien kattavuus. Minimimääritys on asetettu varmistamaan mitokondriaalisen SNV:n havaitsemisraja.
Q30-emästen prosenttiosuus	$\geq 85$	Emästen laadun mittaaminen. Minimimääritys on asetettu analyttisen suorituskyvyn varmistamiseksi.
Arvioitu näytteen saastuminen	$\leq 0,005$	Havaitsee muiden näytteiden saastuttavat lukemat. Maksimimääritys on asetettu varmistamaan mitokondriaalisen SNV:n havaitsemisraja (varianttityyppi, jolla on suurin herkkyys kontaminaatiolle).

## Suorituskykyominaisuudet

Seuraavat validointitutkimukset tehtiin [Käyttöohjeet sivulla 15](#) kuvattua TruSight Whole Genome työnkulkua käyttäen, ja ne suunniteltiin varmistamaan määrityksen kestävyys yleisiä variaatiolähteitä vastaan ja antamaan suosituksia yhdenmukaisesta suorituskyvystä. Näissä tutkimuksissa käytettiin kohdassa [Taulukko 8](#) kuvattuja analyttisen laadunvalvonnan mittausmäärityksiä onnistuneen määrityksen suorituskyvyn vertailukohtana ja analyttisen variantin soittosuorituskyvyn määrityksen edellytyksenä.

## Ristikontaminaatio

Ristikontaminaatiotutkimuksessa arvioitiin virheellistä indeksilukujen havaitsemista, joka johtui näytekirjaston valmistuksen aikana tapahtuneesta kuoppien välisestä kontaminaatiosta ja peräkkäisten sekvensointijaksojen välisestä kontaminaatiosta. Ristikontaminaation arviointiin käytettiin 24 verinäytettä. Kaksi operaattoria valmisti yhteensä 24 kirjastoa käyttäen S2-konfiguraation indeksisarjoja 1–4, ja yhdistetyt kirjastot sekvensoitiin indeksisarjan mukaisessa järjestyksessä yhdellä NovaSeq 6000Dx Instrument:llä. Kaksi operaattoria valmisti 16 kirjastoa käyttäen S4-konfiguraation indeksisarjoja 1 ja 2 kahdessa toistossa, ja yhdistetyt kirjastot, joissa oli vaihtuvat indeksisarjat, sekvensoitiin samalla NovaSeq 6000Dx:llä.

Ristikontaminaation arvioimiseksi oikeita indeksilukemia verrattiin viereisten kaivojen indeksilukemiin kaivojen kontaminaation osalta ja aikaisempaa sekvensointiajtoa ajosta ajoon-kontaminaation osalta. Ajon aikaisen kontaminaation määrä oli  $\leq 0,003178$  % S2:lla ja  $\leq 0,002487$  % S4:llä. Näytteiden välisen kontaminaation

arvioimiseksi käytettiin näytekirjaston laadunvarmistusmetriikkaa arvioidun näytekontaminaation osalta. Näytteistä näytteisiin -kontaminaation määrä oli 0,001, joka on analyysiohjelmiston ilmoittama pienin arvo. Nämä tulokset osoittavat, että kirjaston valmistelu- ja sekvensointityönkulkujen kontaminaatoriski on pieni.

## Käytön aikainen ja välivaiheen vakaus

Kirjaston valmistelureagenssien stabiilius arvioitiin pakkauksen käytön aikana, mukaan lukien useita pakastus-sulatustapahtumia ja avoimen putken stabiilius.

Pakastus-sulatussyklin testauksessa pakastetut komponentit altistettiin viidelle pakastus-sulatustapahtumalle yhden purkamistapahtuman ja neljän pakkauksen käytön tapahtuman tukemiseksi. Käytönaikaisen vakauden vuoksi kuuden näytekirjaston valmisteluun tarvittava määrä poistettiin jokaisen kolmen pakastus-sulatusjakson aikana tilavuuden tyhjentymisen simuloimiseksi käytön aikana, ja komponentteja säilytettiin vielä 31 päivää ennen testausta. Kun kuudesta verenluovuttajasta ekstrahoitua gDNA:ta testattiin, kaikki tiedot läpäisivät analyysin analyttisen kontrollin mittarit. Nämä tulokset osoittavat, että jäädytettyjä kirjaston valmistelureagensseja voidaan käyttää enintään neljän pakastus-sulatusjakson ja 30 päivän käytönaikaisen stabiiliteetin kanssa.

Yksittäisten kirjastojen sekä yhdistettyjen ja denaturoitujen kirjastojen keskitason vakaus arvioitiin. Kaikki tiedot läpäisivät määrityksen analyttisen kontrollin mittarit, jotka osoittavat yksittäisten kirjastojen enintään 14 päivän stabiiliuden ja yhdistettyjen ja denaturoitujen kirjastojen enintään 30 päivän stabiiliuden varastoituna pakastettuina (-25 °C ... -15 °C) turvallisissa pysäytyspisteissä kuvatulla tavalla.

## Verinäytteen otto ja säilytys

Verinäytteenottoputkien yhteensopivuus ja näytteiden säilytys tutkittiin käyttämällä neljää luovuttajaa ja verta, jotka oli otettu kolmen eri toimittajan EDTA-näytteenottoputkiin. Genominen DNA (gDNA) ekstrahoitui kummastakin saapumisen yhteydessä ajan nollaksi ja sitten uudelleen sen jälkeen, kun verta säilytettiin 16, 33 ja 43 päivän ajan 2–8 °C:n lämpötilassa. Uutettu gDNA säilytettiin jäädytettynä (-25 °C – -15 °C) eluutiopuskurissa (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) ja kvantifioitiin ja käytettiin sitten kirjaston valmisteluun ja sekvensointiin. Kaikki tiedot läpäisivät analyysin analyttisen kontrollin mittarit, jotka osoittavat määrityksen yhteensopivuuden kolmen eri EDTA-verinäyteputken ja enintään viiden viikon säilytyksen aikana 2–8 °C:ssa.

## DNA-uuttomenetelmän arviointi

Kolme kaupallisesti saatavilla olevaa ekstraktiopakkausta arvioitiin analyysin suorituskyvyn osalta. Kahdessa sarjassa käytettiin magneettihelmiä, toisessa kiinteän faasin ja selluloosapohjaisen sitoutumisen kanssa ja toisessa ilman sitä, ja yhdessä sarjassa käytettiin silikamembraaniin perustuvaa nukleinihappojen puhdistusmenetelmää, jossa käytettiin linkouspylväitä ([Taulukko 9](#)).

Arvioinnin teki kaksi käyttäjää, joilla oli yksi ekstraktioreagenssierä menetelmää kohden ja kokoverinäyte EDTA-putkiin neljältä oletettavasti terveeltä luovuttajalta. Jokainen verinäyte ekstrahoitui neljä eri kertaa valmistajan ohjeiden mukaisesti ei-peräkkäisinä päivinä yhteensä 16 havaintoa pakkausta kohden. Uutettua gDNA:ta käytettiin kirjastojen valmisteluun sekvensointia ja analysointia varten.

Kaikki havainnot (16/16) kustakin ekstraktiomenetelmästä läpäisivät analyysin analyttisen valvonnan metriikat. Näytteen gDNA-ekstraktiomenetelmän valinta ei vaikuttanut määrityksen suorituskykyyn. Analyttisessä tarkkuus- ja toistettavuustutkimuksissa käytettiin gDNA:ta, joka ekstrahoitettiin pakkauksen 3 kanssa (silikasuodattimen pylvään eristys ja linkouspylväät).

Taulukko 9 TruSight Whole Genome:n Suorituskyvyn osalta testatut uuttomenetelmät

Pakkaus	Eristysmenetelmä
1	Magneettihelmien poisto kiinteällä, käännettävällä immobilisaatiolla (SPRI)
2	Magneettihelmien uutto kiinteällä faasi- ja selluloosapohjaisella sidoksella
3	Silikasuodattimen pylvään eristys ja linkouspylväät

## DNA:n syöttöherkkyys

Näytekohtaiseen testaukseen suositeltu gDNA-syöttö on 280 ng tai 350 ng riippuen DNA:n kvantifiointimenetelmistä, jotka on lueteltu [DNA-syötesuosituksiet sivulla 10](#).

Suorituskyvyn määrittämiseksi useilla gDNA-syöttöpitoisuuksilla analyysissä käytetty DNA:n määrä testattiin tasoilla, jotka olivat  $\pm 28,6$  % suositellusta syötöstä. Tulokset osoittivat, että  $-25$  % suositellusta gDNA-syötöstä on analyysin alaraja. Määrittäminen toimii asianmukaisesti, kun gDNA-syöttö on enintään  $+28,6$  % suositellusta syötöstä.

Kolmen erillisen kvantifiointimenetelmän luonnehdinta osoitti, että eri menetelmillä on erilaiset vaihtelevuustasot ja ne voivat tuottaa erilaisia tuloksia. Jos käytetään muuta kuin [DNA-syötesuosituksiet sivulla 10](#) lueteltua menetelmää, kohde-gDNA-syöttö on ehkä optimoitava. On suositeltavaa, että tiettyyn kirjaston valmisteluun ja sekvensointiajoneuvon tarkoitettujen näytteiden gDNA kvantifioidaan yhdessä, jotta erien välinen vaihtelu voidaan poistaa mahdollisuuksien mukaan, tai että käytetään prosessin kontroleja, joilla varmistetaan  $\leq 25$  %:n gDNA:n kvantifiointierien välinen vaihtelu.

## Häiritsevät aineet

Tässä tutkimuksessa arvioitiin suorituskykyä sekä endogeenisten että eksogeenisten aineiden kanssa, jotka liittyvät ihmisen vereen ja verinäyteputkiin. Bilirubiini, hemoglobiini ja triglyseridit valittiin arviointia varten vastaavasti icteric-, hemolyzed- ja lipemic-näytteiden simulointiin. Biotiini ja EDTA valittiin arvioitavaksi, koska veri- ja verinäytteenotto-putkissa (BCT) oli läsnä ja koska sillä oli mahdollinen vaikutus analyysikemiaan. Aineet terästettiin luovuttajan verinäytteisiin ennen uuttamista joko suoraan tai liuottamisen jälkeen liuottimessa. Seuraavassa taulukossa esitetään kunkin aineen testikonsentraatio ja lisäyksen yksityiskohdat.

Taulukko 10 TruSight Whole Genome suorituskykyä haittaavat aineet

Aine	Testipitoisuus	Liuotin, jota käytetään piikkiliuoksessa	% piikkiliuosta lisätty vereen
Bilirubiini (konjugoitumaton)	40 mg/dl (0,4 mg/ml) <sup>1</sup>	DMSO	4 %

Aine	Testipitoisuus	Liutin, jota käytetään piikkiliuoksessa	% piikkiliuosta lisätty vereen
Hemoglobiini	1 000 mg/dl (10 mg/ml) <sup>1</sup>	Ei sovellu – liuennut vereen	Ei sovellu – liuennut vereen
Triglyseridit	1 500 mg/dl (15 mg/ml) <sup>1</sup>	100 % etanoli	4 %
Biotiini	0,00351 mg/ml <sup>2</sup>	Vesi	4 %
EDTA	5,4 mg/ml <sup>3</sup>	Vesi	3 %

<sup>1</sup> Pitoisuudet valittiin suurimmiksi havaituiksi pitoisuuksiksi ”Kliinisen kemian häiriöttestausta koskevien täydentävien taulukoiden, CLSI EP37-ED1:2018” mukaisesti.

<sup>2</sup> Pitoisuus valittiin kolminkertaiseksi terapeuttisen hoidon enimmäislääkepitoisuudeksi, joka on esitetty taulukossa ”Täydentävät taulukot kliinisen kemian häiriöttestausta varten, CLSI EP37-ED1:2018”.

<sup>3</sup> Pitoisuus valittiin EDTA-pitoisuuden perusteella, joka vaihtelee enintään 1,8 mg/ml:n verinäyteputkissa, ja simuloimaan lyhyttä täyttötapahtumaa, jossa verinäyte oli 33 % nimellisestä BCT-tilavuudesta, mikä johti 3x suurempaan EDTA-pitoisuuteen veressä, joka vastaa 5,4 mg/ml:ää.

Testauksessa käytettiin verta neljästä luovuttajasta. Kunkin haittaavan aineen osalta kunkin luovuttajan kokoverierä terästettiin häiritsevällä aineella ja jaettiin sitten neljän gDNA-ekstraktion rinnakkaisnäytteen kesken. Kontrolli käsiteltiin samalla tavalla ilman aineiden lisäämistä. Parilliset testi- ja kontrolliehdot käsiteltiin jokaiselle luovuttajalle saman uuttotapahtuman aikana, ja ekstrahoitu gDNA käsiteltiin sitten yhdessä kirjaston valmistelu- ja sekvensointitapahtumassa. Analyysin suorituskyvyllä ei ollut vaikutusta eikä näyttöä häiriöistä vasteena millekään testatuista aineista.

## Näytteen indeksoinnin ekvivalenssi

TruSight Whole Genome tarjoaa neljä 6-plex-indeksisarjaa S2-ajoille tai kaksi 16-plex-indeksisarjaa S4-sekvensointiajokokoonpanoille. Määrityksen osoitettiin tarjoavan vastaavan suorituskyvyn, kun kirjastot sekvensoidaan joko NovaSeq 6000Dx S2- tai S4-sekvensointiajokokoonpanoissa. Lisäksi sekä S2- että S4-ajokokoonpanojen osoitettiin saavuttavan > 95 % näytekirjastoista, joiden peitto oli vähintään 35,0x, kun niitä testattiin määrätyillä indeksisarjoilla. Näin ollen S2- ja S4-virtaussolujen sekvensointiin käytettäviä erilaisia indeksijoukkoja ja yhdistämistä voidaan käyttää keskenään, jotta saadaan skaalautuvuus näytteen läpimenon vaihteluiden mukaan ja laboratorioprosessien joustavuus.

## Analyyttinen suorituskyky

Alkukarakterisointitutkimukset tehtiin pienten varianttien luotettavuustason kynnsarvojen, mitokondriaalisten SNV:iden havaitsemisrajan ja STR-laajennusten tarkan havaitsemisen kokokynnysten määrittämiseksi TruSight Whole Genome-työnkulkua käytettäessä. Näytteet, jotka edustivat TruSight Whole Genome:llä arvioituja muunnosluokkia, otettiin mukaan analyttisen tarkkuuden ja toistettavuuden arviointiin, mukaan lukien laboratorion sisäinen tarkkuus ja ulkoinen uusittavuus. Analyttinen suorituskyky raportoidaan

sekvensointiajoista ja näytteistä, jotka läpäisivät kaikki laatuksentrollit, lukuun ottamatta keinotekoisia sekoitusnäytteitä, joita käytettiin mitokondriaalisten SNV:iden arvioimiseksi havaitsemisrajalla tai lähellä sitä, ja jotka eivät läpäisseet kontaminaatiomittaria. Kunkin tutkimuksen tulokset on kuvattu alla olevissa kohdissa.

## Alkuperäiset luonnehdintatutkimukset

### Pienten varianttien luottamustason määrittäminen

Tässä tutkimuksessa logistinen regressiomalli koulutettiin erittäin toistettaviin ja huonosti toistettaviin varianttikohtiin 96 rinnakkaisnäytteestä NA12878:sta korkean, keskitason ja matalan luotettavuustason kynnsarvojen määrittämiseksi.

Korkeat luotettavuusperusteet tietyille varianttityypille ovat niitä, joissa ennustettu laboratorion sisäinen toistettavuus täyttää tai ylittää 99 % tietyllä pisteytyskynnyksellä ja prosenttimäärä ei-N-emäksistä, joka täyttää kyseisen kriteerin, ylittää 30 %. Jos pienellä varianttityypillä ei ole näitä kriteereitä vastaavaa pistekynnystä, kyseisellä varianttityypillä ei ole korkeaa luotettavuustasoa. Keskitason luotettavuusperustat ovat sellaisia, joissa ennustettu laboratorion sisäinen uusittavuus on 95 prosenttia tai enemmän tietyllä pistekynnyksellä ja muunnostyypillä. Alhaisen luotettavuuden emäkset ovat emäkset, joissa ennustettu laboratorion sisäinen uusittavuus on alle 95 prosenttia tietyllä pistekynnyksellä ja muunnostyypillä. Tietyn varianttityypin varianttikutsut, joilla on korkea tai keskitasoinen luottamustaso, sisältävät suurimman osan N:ää sisältämättömistä %:n emäksistä (ts. lukuun ottamatta aukkoja) (ks. taulukko 6), ja ne ovat erittäin suorituskykyisiä, kun niitä arvioitiin pienten varianttitodellisuusjoukkojen perusteella ja laajoissa laboratorion sisäisen tarkkuuden arvioinneissa, jotka koskivat NA12878:aa replikaattia.

Varianttityyppi	Luottamustaso	% ei-N-emäksiä
SNV	Korkea	89,14 %
	Keskitaso	3,30 %
	Matala	7,56 %
Lyhyet poistot (1–5 bp)	Korkea	90,88 %
	Keskitaso	2,45 %
	Matala	6,67 %
Keskitason poistot (6–15 bp)	Keskitaso	86,94 %
	Matala	13,06 %
Pitkät poistot (≥ 16 bp)	Keskitaso	85,42 %
	Matala	14,58 %
Lyhyet lisäykset (1–5 bp)	Korkea	88,94 %
	Keskitaso	4,61 %
	Matala	6,45 %

Varianttityyppi	Luottamustaso	% ei-N-emäksiä
Keskitason lisäykset (6–15 bp)	Keskitaso	89,37 %
	Matala	10,63 %
Pitkät lisäykset ( $\geq 16$ bp)	Keskitaso	48,92 %
	Matala	50,63 %

## Mitokondriaalisen SNV:n tyhjyysrajan / havaitsemisrajan määrittäminen

Mitokondriaalisten SNV:iden osalta tehtiin tyhjyysrajan (LoB) ja havaitsemisrajan (LoD) tutkimuksia. Mitokondrio-SNV-tutkimuksessa LoB arvioitiin käyttämällä lukuksia, joilla ei tiedetty olevan varianttia (esim. viitetunnistus). LoD määritellään mtDNA SNV -variantin alleelitiheydeksi, jolla kyseisen variantin havaitsemisaste on 95 %.

LoB:n ja LoD:n määrittämiseksi heteroplasmisen mtSNV:n havaitsemiseksi kahden eri verenluovuttajan perusteellisesti luonnehditut gDNA-näytteet sekoitettiin titraustutkimuksessa viiteen laimennustasoon 20 rinnakkaisnäytteellä laimennustasoa kohti. Laimennustasot suunniteltiin mtSNV-variantin prosentiosuuksien (1,2–6 % VAF) kohdentamiseen mitokondriaalisen heteroplasmian eri tasojen jäljittelemiseksi. Sekoitettujen gDNA-näytteiden käsiteltiin ja lukemia pienennettiin 500-kertaisen keskimääräisen mitokondriaalisen kattavuuden saavuttamiseksi. Alavirran arvioinnissa käytettiin yhteensä 42 epäaitoa ”heteroplasmista” tutkimuskeskusta. Regressioanalyysiä käytettiin tarvittavien sekoitussuhteiden arvioimiseen tavoitteeksi 1x LoD ja 2x LoD mtSNV-alajoukolle.

Paikat, joissa molempien verinäytteiden gDNA:lla on referenssialleelin genotyyppi, arvioitiin sellaisten mtSNV-tunnistusten osalta, jotka läpäisivät suodattimen, jossa oli muu kuin referenssialleeli. Väärä positiivinen osuus laskettiin 0,8 %:ksi, joka vastaa nolla-LoB-oletusta kohdan ”Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, CLSI EP17-A2-ED1:2012” mukaisesti. Kukin 42 paikasta analysoitiin itsenäisesti probit-regressiolla. Havaitsemisraja-arvo määriteltiin odotettuna VAF-arvona, joka vastaa 95 %:n (C95) tunnistusmäärää. Raportoitu LoD-arvo, joka määriteltiin totuudenmukaisten kohtien 95. prosenttipisteenä, oli 4,75 % VAF. Havaittujen ja odotettujen VAF-arvojen absoluuttisten erojen jakautumisen keskiarvoksi kaikkien havaintojen osalta laskettiin 0,83 % ja 95 %:n luottamusvälin yläraja oli 0,86 % VAF.

## STR-laajennuskynnyksen määrittäminen

Johtuen teknisistä STR-rajoituksista, jotka ylittävät sekvensoinnin lukupituuden (~135 bp), havaittu STR-pituus TruSight Whole Genome:llä on usein todellisen pituuden aliarvio. Kun todellinen STR-pituus ylittää fragmentin mediaanipituuden (~330 bp), STR-pituusarvio tasaantuu. Tästä syystä TruSight Whole Genome arvioi kohdennettuja lukuksia, joiden osalta määrittäminen voi tarkasti erotella STR:t normaaleilla pituuksilla verrattuna sellaisiin pituuksiin, jotka ovat suurempia kuin oletettavasti terveessä populaatiossa havaitut (”laajennettu”) (ks. [Taulukko 2](#) luettelo lukuksista, jotka on arvioinut TruSight Whole Genome).

Sen varmistamiseksi, että kaikkien TruSight Whole Genome:n arvioimien STR-kohteiden yhteenlaskettu negatiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (NPA) on 95 %, linjakohtaiset kynnyksarvot laajennetun STR:n kutsumiselle kyseisessä kohteessa asetettiin siten, että keskimääräinen NPA oli 99,94 prosenttia kohdetta

kohti. Ottaaksemme huomioon STR-kokoarvioiden luontaisen vaihtelevuuden oletettavasti terveessä populaatiossa kynnysarvot asetettiin riippumattomasti havaittujen STR-pituuksien jakautumisen perusteella oletettavasti terveissä 1 000 Genomes Project -tietojoukoissa (2 504 näytettä eri populaatioista käsiteltynä DRAGEN 3.7.5:llä ja ExpansionHunter 4.0.2:lla).<sup>4</sup>

1000 Genomes Project -tietojoukolla määritettyjen kynnysarvojen vahvistamiseksi poimittiin gDNA 16 solulinjan viitenäytteestä (Center for Disease Control's Genetic Testing Reference Material (Get-RM) -ohjelma), joissa oli useita itsenäisesti arvioituja STR-kokoja, käsiteltiin TruSight Whole Genome:lla. 10 kirjaston rinnakkaisnäytettä kutakin 16 näytettä kohden valmisteltiin ja testattiin kuuden käyttäjän toimesta yhteensä 960 havainnon osalta, ja STR-koot arvioitiin itsenäisesti kullekin rinnakkaisnäytteelle. Havaittu näytetason väärin positiivisten tulosten osuus kaikissa kohteena olevissa lokuksissa oli 0,35 %.

Havaitsemisraja (LoD) arvioitiin 28 kohdennetulle STR-lokokselle solulinjoilla, jotka testattiin perustuen alleelikokoihin, jotka havaittiin TruSight Whole Genome:lla, ja odotettuihin alleelikokoihin aiemman riippumattoman karakterisoinnin perusteella (Taulukko 11). Valituille lokuksille määritettiin havaitsemisraja useammalle kuin yhdelle STR:lle samassa kohteessa, yhteensä 35 STR:lle. LoD on arvioitu koko, jolla odotettu STR-laajennus havaitaan 95 %:lle alleeleista probit-mallin perusteella ja jolla on vahvistetut kynnysarvot normaalien ja laajennettujen STR-kokojen erottamiseksi. Kaikkien niiden toimipaikkojen tiedot, joiden alleelikoko oli tiedossa, yhdistettiin, jotta jokaiselle toimipaikalle saataisiin havaitsemisraja-arviot laajennetun STR:n toimipaikkakohtaisen kynnysarvon perusteella. FMR1:n toistopituus aliarvioitiin järjestelmällisesti muihin STR:iin verrattuna, ja LoD:n asianmukainen arviointi vaati mukautetun mallin.

Tarkistetut toimipaikkakohtaiset laajennetun STR:n kynnysarvot, arvioitu odotettu ja havaittu havaitsemisraja kohdennetuille tutkimuspaikoille sekä kohdennettujen STR-kohdistimien saatavilla olevaan kirjallisuuteen perustuva taudin kynnysarvo (vain havainnollistamistarkoituksiin) on esitetty taulukossa Taulukko 11. Jos STR-laajennus on lukupituuden määräämää raja-arvoa pidempi ja jos odotettua pituutta ei voida suoraan havaita, havaittu pituus on likimääräinen pituus, joka olisi havaittu useissa sekvensointiajoissa. STR-laajennuksissa, jotka ovat lyhyempiä kuin lukupituuden sanelema kynnysarvo, odotetut ja havaitut pituudet ovat samat.

Taulukko 11 TruSight Whole Genome Kohdennettujen STR-toimipaikkojen arvioitu havaitsemiskykyhteenveto

Kohdelokus <sup>a</sup>	Laajennettu STR-kynnysarvo (bp) perustuu 1 000 Genomes Project -tietojoukkoon	Arvioitu havaitsemisraja (odotettu pituus, bp)	Arvioitu havaitsemisraja (havainnoitu pituus, bp)	Sairauden raja-arvo (todellinen pituus, bp) <sup>b</sup>
AFF2	168	266	221	600 <sup>5</sup>
AR	114	115	115	114 <sup>6</sup>
ATN1	90	92	92	135 <sup>7,8</sup>
ATXN1	114	115	115	114 <sup>7,8</sup>
ATXN10	200	298	233	3995 <sup>7,8</sup>
ATXN2	102	102	102	105 <sup>7,8</sup>
ATXN3	135	189	182	180 <sup>7,8</sup>
ATXN7	60	60	60	111 <sup>7,8</sup>



Kohdelokus <sup>a</sup>	Laajennettu STR-kynnysarvo (bp) perustuu 1 000 Genomes Project - tietojoukkoon	Arvioitu havaitsemisraja (odotettu pituus, bp)	Arvioitu havaitsemisraja (havainnoitu pituus, bp)	Sairauden raja-arvo (todellinen pituus, bp) <sup>b</sup>
ATXN7_GCC	93	101	101	Ei sovelleta
ATXN8OS	200	298	233	237 <sup>7,8</sup>
ATXN8OS_CTA	90	92	92	Ei sovelleta
C9ORF72 <sup>c</sup>	200	298	233	360 <sup>9,10</sup>
CACNA1A	57	57	57	60 <sup>7,8</sup>
CBL	171	281	227	243 <sup>5</sup>
CNBP	192	308	237	300 <sup>5,11</sup>
CNBP_CA	102	102	102	Ei sovelleta
CNBP_CAGA	68	80	80	Ei sovelleta
CSTB	200	298	233	348 <sup>12,13</sup>
DIP2B	200	298	233	Ei sovelleta
DMPK	122	132	142	150 <sup>14</sup>
FMR1	175	433	212	600 <sup>d,15</sup>
FXN	102	102	102	198 <sup>6,16</sup>
FXN_A	200	298	233	Ei sovelleta
GLS	111	115	115	270 <sup>17</sup>
HTT	108	115	115	120 <sup>18</sup>
HTT_CCG	42	42	42	Ei sovelleta
JPH3	99	101	101	123 <sup>19</sup>
NIPA1	33	33	33	Ei sovelleta
NOP56	84	84	84	3900 <sup>20,21</sup>
NOP56_CGCCTG	24	24	24	Ei sovelleta
NOTCH2NL	129	175	174	213 <sup>22,23</sup>
PABPN1	27	27	27	Ei sovelleta
PHOX2B	60	60	60	75 <sup>5,24</sup>
PPP2R2B	87	90	90	198 <sup>7,8</sup>
TBP	129	175	174	135 <sup>7,8</sup>

<sup>a</sup> LOCI\_<ALTERNATE\_REPEAT> (esim. ATXN7\_GCC) merkitsee vaihtoehtoisilla STR:illä varustetut lokukset.

<sup>b</sup> Taudin kynnysarvot on annettu vain havainnollistamistarkoituksiin julkaistun kirjallisuuden perusteella; tässä sarakeessa oleva N/A (Ei sovellu) osoittaa, että STR ei ehkä liity julkaistuun patogeeneeseen laajennukseen.

<sup>c</sup> 100% NA23378:n rinnakkaisnäytteistä havaitsi STR-laajennuksen C9ORF72:ssa, mikä viittaa aiemmin luonnehdittuun laajennukseen kyseisessä paikassa kyseisessä näytteessä. Tämä solulinjanäyte suljettiin pois analyysistä.

<sup>d</sup> Väili-laajennukset voivat liittyä myös fenotyyppiin.

Tämä tutkimus osoitti, että STR-kokoestimaattien täsmällisyys- ja tarkkuusprofiilit olivat samankaltaisia eri kohdelokusten osalta, ja STR-laajentumien havaitsemisraja johtui suurelta osin valitusta kynnyksarvosta (joka perustui 1 000 Genomes Project -hankkeen populaation kokojakaumaan) eikä niinkään havaitsemisvalmiuksien eroista eri paikkojen välillä. Kaikki arvioidut LoD-arvot odotetulla pituusasteikolla olivat suurempia kuin putatiivisesti terveissä populaatioissa havaitut pituudet ja pienempiä kuin monet julkaistut taudin kynnyksarvot, mikä tekee niihin liittyvistä STR-laajennustunnistuskynnyksistä hyödyllisiä toiston merkitsemisessä tietyssä lokuksessa mahdollisesti laajennettuna. Tässä raportoituja kynnyksarvoja käytettiin STR-laajenemisen havaitsemisen tarkkuuden arviointiin.

## Tarkkuus

Analyttinen tarkkuus määritettiin vertaamalla TruSight Whole Genome varianttutunnistuksia vaihtoehtoisilla menetelmillä saatuihin tuloksiin. Viitemenetelmät valittiin perustuen merkittävään eroon verrattuna TruSight Whole Genome, jossa käytetään Nextera™-helmiin sidottua kirjaston valmistelua, 2-väristä sekvensointikemialla NovaSeq 6000Dx:ssa ja DRAGEN:n versiota 3.9.5 varianttien tunnistamiseen. TruSight Whole Genome:n validointia edustava lähestymistapa tehtiin näytteillä, jotka edustivat variantteja kaikissa määrityksen tuotokseen sisältyvissä varianttiluokissa. TruSight Whole Genome:n tarkkuuden arviointiin käytettiin yhteensä 459 ainutlaatuaista analyttisen laadunvalvonnan läpäisevää näytettä. Näytteet testattiin kolmella kirjaston valmistelureagenssierällä ja tarvikkeilla, neljällä S4-sekvensointisarjaerällä, kahdeksalla operaattorilla, viidellä NovaSeq 6000Dx Instrument:llä ja kahdella sisäisellä laitoksella. 31 itsenäistä kirjastopoolia valmisteltiin ja sekvensoitiin.

Seuraava taulukko sisältää eri tutkimuksissa laskettujen mittaustietojen määritelmiä.

Termi	Määritelmä
Alempi luottamustaso (LCL)	Yksipuolinen 95 % alempi luottamusväli Wilson-menetelmää käyttäen.
Negatiivisen yhtäpitävyyden prosenttimäärä (NPA) <sup>1</sup>	Viitemenetelmällä määriteltyjen negatiivisten kohtien prosenttiosuus, jotka tunnustetaan yhdenmukaisesti negatiivisiksi TruSight Whole Genome:lla.
Positiivisen yhtäpitävyyden prosenttimäärä (PPA) <sup>2</sup>	Viitemenetelmässä tunnistettujen varianttien prosenttiosuus, joita tunnustetaan samanaikaisesti TruSight Whole Genome:n kanssa.
Tekninen positiivinen ennustearvo (TPPV) <sup>3</sup>	Niiden TruSight Whole Genome:llä tunnistettujen varianttien prosenttiosuus, jotka on tunnustettu yhdenmukaisesti vertailumenetelmässä.

<sup>1</sup> STR-laajennuksen tunnistustarkkuudelle ja SMN1-alleelin tunnistustarkkuudelle NPA = todellinen negatiivinen / (todellinen negatiivinen + väärä positiivinen).

<sup>2</sup> STR-laajennuksen tunnistustarkkuudelle ja SMN1-alleelin tunnistustarkkuudelle PPA = todellinen positiivinen / (todellinen positiivinen + väärä negatiivinen).

<sup>3</sup> STR-laajennuksen tunnistustarkkuudelle ja SMN1-alleelin tunnistustarkkuudelle TPPV = todellinen positiivinen / (todellinen positiivinen + väärä negatiivinen).

## Pienten varianttien tarkkuus

Pienten varianttien kutsumisen tarkkuutta arvioitiin käyttämällä 195 oletettavasti terveen luovuttajan perifeerisestä kokoverestä uutettua genomista DNA:ta. TruSight Whole Genome-varianttien kutsuja verrattiin kliinisesti validoidun koko genomien sekvensointitestin kutsuihin, jotka suoritettiin vertailumenetelmänä Illumina laboratoripalveluiden (ILS) CLIA-laboratoriossa. Viitemenetelmän koko genomien sekvensointityönkulussa käytetään ligaatiopohjaista, PCR-vapaata TruSeq™-kirjaston valmistelua, 4-väristä sekvensointikemialla HiSeq™-sekvensointijärjestelmässä ja DRAGEN 3.8.4:ää varianttien kutsumiseen. Lisäyksiä ja poistoja, joiden koko oli > 31 bp, ei luonnehdittu tässä tutkimuksessa, koska niitä ei validoitu viitemenetelmässä.

Yhteenveto kaikkien pienten varianttien tarkkuudesta on esitetty kohdissa [Taulukko 12](#) ja [Taulukko 13](#).

Taulukko 12 TruSight Whole Genome Assay Pienten varianttien tarkkuus, joka on ositettu luottamustason ja koon mukaan (Putatively Healthy Blood Samples)

Variantin alatyyppe	Luottamustaso	Viitemenetelmän vaatimusten mukaiset tunnistukset	Viitemenetelmän yksinomaiset tunnistukset	Analyysin vaatimusten mukaiset tunnistukset	Analyysin eksklusiiviset tunnistukset	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNV:t	Korkea	261 728 580	1 573 877	261 603 149	208 639	99,4 % (99,4 %)	99,9 % (99,9 %)
	Keskitaso	6 677 589	421 718	6 519 811	151 128	94,1 % (94,0 %)	97,7 % (97,7 %)
	Matala	6 864 840	3 251 709	6 649 756	2 151 388	67,9 % (67,8 %)	75,6 % (75,5 %)

Variantin alatyypin	Luottamustaso	Viitemenetelmän vaatimusten mukaiset tunnistukset	Viitemenetelmän yksinomaiset tunnistukset	Analyysin vaatimusten mukaiset tunnistukset	Analyysin eksklusiiviset tunnistukset	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
<b>Lyhyt poisto (1–5 bp)</b>	Korkea	11 978 745	201 783	12 246 922	67 277	98,3 % (98,3 %)	99,5 % (99,5 %)
	Keskitaso	2 875 258	45 290	3 050 170	47 593	98,4 % (98,4 %)	98,5 % (98,5 %)
	Matala	1 802 544	228 582	1 966 974	221 449	88,7 % (88,7 %)	89,9 % (89,8 %)
<b>Keskikokoinen poisto (6–15 bp)</b>	Keskitaso	858 673	20 079	860 493	18 361	97,7 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Matala	145 618	28 300	157 398	41 824	83,7 % (83,6 %)	79,0 % (78,9 %)
<b>Pitkä poisto (16–31 bp)</b>	Keskitaso	344 168	14 334	336 976	31 165	96,0 % (95,9 %)	91,5 % (91,5 %)
	Matala	54 444	23 438	53 835	47 272	69,9 % (69,6 %)	53,2 % (53,0 %)
<b>Lyhyt lisäys (1–5 bp)</b>	Korkea	11 212 366	164 651	11 380 307	49 776	98,6 % (98,5 %)	99,6 % (99,6 %)
	Keskitaso	1 015 324	41 890	988 512	36 051	96,0 % (96,0 %)	96,5 % (96,5 %)
	Matala	639 663	198 700	576 797	180 458	76,3 % (76,2 %)	76,2 % (76,1 %)

Variantin alatyypin	Luottamustaso	Viitemenetelmän vaatimusten mukaiset tunnistukset	Viitemenetelmän yksinomaiset tunnistukset	Analyyysin vaatimusten mukaiset tunnistukset	Analyyysin eksklusiiviset tunnistukset	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
<b>Keskikokoinen lisäys (6–15 bp)</b>	Keskitaso	790 968	18 163	798 572	17 111	97,8 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Matala	76 105	24 188	88 389	35 819	75,9 % (75,7 %)	71,2 % (71,0 %)
<b>Pitkä lisäys (16–31 bp)</b>	Keskitaso	159 927	3 135	159 432	8 639	98,1 % (98,0 %)	94,9 % (94,8 %)
	Matala	102 552	22 199	103 892	55 724	82,2 % (82,0 %)	65,1 % (64,9 %)

Taulukko 13 Yhteenveto TruSight Whole Genome:n NPA:sta pienille varianteille tarkoitetuista puheluista, jotka on ositettu luottamustason mukaan

Luottamustaso	Yhdenmukaiset negatiiviset tunnistukset	Vertailumenetelmä Eksklusiiviset negatiiviset puhelut	NPA (LCL)
Korkea	202 276 243 790	127 465 816	99,9 % (99,9 %)
Keskitaso	3 307 740 675	77 650 177	97,7 % (97,7 %)
Matala	3 653 569 580	439 038 662	89,3 % (89,3 %)

Lisätarkkuustutkimus tehtiin pienen variantin havaitsemisen arvioimiseksi kaupallisesti saatavilla referenssolulinjan DNA-näytteillä (Coriell Institute for Medical Research) hyvin luonnehdituilla soittosarjoilla, jotka Genome in a Bottle (GIAB) -konsortio loi. Tässä tutkimuksessa viitemenetelmänä käytettiin GIAB-soittosarjoja. Näihin näytteisiin kuuluva totuus sisältää yli 31 bp:n lisäykset ja poistot, joten tähän arviointiin sisällytettiin suuremmat insertiot ja poistot. Näihin näytteisiin sisältyi HG001-005 ja NA24695, ja tulokset on esitetty koosteina kohdassa [Taulukko 14](#).

Taulukko 14 TruSight Whole Genome Assay Tarkkuus pienille varianteille, jotka on ositettu luottamustason ja koon mukaan (hyvin luonnehditut solulinjanäytteet)

Variantin alatyypin	Luottamustaso	GIAB-yhtäpitävät kutsut	Eksklusiiviset GIAB-kutsut	Analyysin vaatimustenmukaiset tunnistukset	Analyysin eksklusiiviset tunnistukset	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
<b>SNV:t</b>	Korkea	21 431 369	2 552	21 439 303	3 954	> 99,9 % (> 99,9 %)	> 99,9 % (> 99,9 %)
	Keskitaso	908 172	1 259	910 058	2 175	99,9 % (99,9 %)	99,8 % (99,8 %)
	Matala	720 717	59 691	722 180	28 721	92,4 % (92,3 %)	96,2 % (96,1 %)
<b>Lyhyt poisto (1–5 bp)</b>	Korkea	1 080 383	690	1 090 370	730	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Keskitaso	423 547	788	437 019	606	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Matala	263 828	2 624	281 217	2 088	99,0 % (99,0 %)	99,3 % (99,2 %)
<b>Keskikokoinen poisto (6–15 bp)</b>	Keskitaso	142 671	238	144 997	167	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Matala	86 174	812	91 710	546	99,1 % (99,0 %)	99,4 % (99,4 %)
<b>Pitkä poisto (≥ 16 bp)</b>	Keskitaso	34 414	315	34 580	55	99,1 % (99,0 %)	99,8 % (99,8 %)
	Matala	9 985	393	10 212	106	96,2 % (95,9 %)	99,0 % (98,8 %)
<b>Lyhyt lisäys (1–5 bp)</b>	Korkea	927 288	221	925 787	271	> 99,9 % (> 99,9 %)	> 99,9 % (> 99,9 %)
	Keskitaso	158 346	294	137 081	250	99,8 % (99,8 %)	99,8 % (99,8 %)
	Matala	93 857	2 402	75 687	1 427	97,5 % (97,4 %)	98,1 % (98,1 %)

Variantin alatyypin	Luottamustaso	GIAB-yhtäpitävät kutsut	Eksklusiiviset GIAB-kutsut	Analyysin vaatimustenmukaiset tunnistukset	Analyysin eksklusiiviset tunnistukset	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
<b>Keskikokoinen lisäys (6–15 bp)</b>	Keskitaso	91 117	116	89 054	60	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Matala	37 925	745	36 670	406	98,1 % (98,0 %)	98,9 % (98,8 %)
<b>Pitkä lisäys (≥ 16 bp)</b>	Keskitaso	11 081	46	11 110	17	99,6 % (99,5 %)	99,8 % (99,8 %)
	Matala	14 086	607	14 312	262	95,9 % (95,6 %)	98,2 % (98,0 %)

## Kopioi numerovarianttien tarkkuus

CNV-tunnistusten tarkkuus arvioitiin samalla viitemenetelmällä ja putatiivisesti terveillä verenluovuttajanäytteillä (195), joita käytettiin pienten varianttien tunnistusten tarkkuuden arviointiin. Jokainen CNV katsotaan havaituksi tunnistusjoukossa, jos vähintään 50 % CNV:stä kuuluu samantyyppisten CNV-tunnistusten (GAIN(VOITTO)/LOSS(MENETYS)) yhteensovittamiseen vastaaviin tunnistusjoukkoihin. TruSight Whole Genome määrittää sarjan genomialueita, jotka eivät kuulu CNV-tunnistuksiin, perustuen arvioon 1 000 Genomin ja 77 putatiivisesti terveen verenluovuttajan näytetiedoista, jotka käyttävät kattavuuden poikkeamiin, peittosyvyyden poikkeamiin ja kattavuuden puutteisiin liittyviä mittareita genomien alueiden tarkistamiseksi, joita ei voida raportoida CNV:lle. CNV-tunnistuksia arvioitiin vain genomisilla alueilla, jotka olivat yleisiä sekä viitemenetelmälle että TruSight Whole Genome:lle. Kaikkien CNV-tunnistusten tarkkuuden yhteenveto on esitetty kohdissa [Taulukko 15](#) ja [Taulukko 16](#).

Taulukko 15 TruSight Whole Genome Assay CNV:iden tarkkuus koon ja tyyppin mukaan ositettuna

Koko	Tyyppi	Viitemenetelmän vaatimusten mukaiset tunnistukset	Viitemenetelmän yksinomaiset tunnistukset	Analyysin vaatimustenmukaiset tunnistukset	Analyysin eksklusiiviset tunnistukset	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
<b>10–25 kbp</b>	GAIN (VOITTO)	443	98	342	56	81,89 % (79,01 %)	85,93 % (82,82 %)
	LOSS (MENETYS)	4 162	457	4 155	679	90,11 % (89,36 %)	85,95 % (85,11 %)

Koko	Tyyppi	Viitemenetelmän vaatimusten mukaiset tunnistukset	Viitemenetelmän yksinomaiset tunnistukset	Analyysin vaatimustenmukaiset tunnistukset	Analyysin eksklusiiviset tunnistukset	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
25–50 kbp	GAIN (VOITTO)	355	117	370	76	75,21 % (71,81 %)	82,96 % (79,83 %)
	LOSS (MENETY S)	1 587	16	1 622	7	99,00 % (98,50 %)	99,57 % (99,21 %)
50–100 kbp	GAIN (VOITTO)	228	0	187	20	> 99,99 % (98,83 %)	90,34 % (86,42 %)
	LOSS (MENETY S)	723	5	697	6	99,31 % (98,60 %)	99,15 % (98,36 %)
≥ 100 kbp	GAIN (VOITTO)	371	1	335	5	99,73 % (98,80 %)	98,53 % (97,01 %)
	LOSS (MENETY S)	541	23	569	1	95,92 % (94,32 %)	99,82 % (99,22 %)
Yleisesti (kaikki CNV:t ≥ 10 kbp)	GAIN (VOITTO)	1 397	216	1 234	157	86,61 % (85,15 %)	88,71 % (87,24 %)
	LOSS (MENETY S)	7 013	501	7 043	693	93,33 % (92,84 %)	91,04 % (90,49 %)

Taulukko 16 Yhteenveto CNV-tunnistusten TruSight Whole Genome NPA:sta

Koko	Tyyppi	Yhdenmukaiset negatiiviset tunnistukset	Viitemenetelmä Yksinomaiset negatiiviset tunnistukset	Analyysin eksklusiiviset tunnistukset	NPA (LCL)
Yleisesti (kaikki CNV:t ≥ 10 kbp)	GAIN (VOITTO)	548 478 033 220	5 701 311	6 400 382	> 99,99 % (> 99,99 %)
	LOSS (MENETYS)	548 591 794 675	11 719 913	8 543 877	> 99,99 % (> 99,99 %)



## Homotsygositeetin tarkkuus

ROH-puheluiden tekninen positiivinen ennustearvo (TPPV) arvioitiin käyttämällä samaa viitemenetelmää ja putatiivisesti terveitä verenluovuttajanäytteitä (195), joita käytettiin pienen variantin ja CNV:n tarkkuusarvioinneissa. ROH-tapahtumat määritettiin tunnistamalla genomien alueet, jotka sisälsivät homotsygoottisten SNV-kutsujen sarjan, josta puuttui heterotsygoottisia SNV:itä, tai pitkiä aukkoja ilman varianteja. Kyseiset siemenalueet laajennettiin sitten vasemmalle ja oikealle ja arvioitiin ympäröivien homotsygoottisten tunnistusten tai heterotsygoottisten SNV:iden varalta. TruSight Whole Genome:n havaitsemia ROH-tapahtumia verrattiin vertailumenetelmän SNV-tunnistuksiin. TPPV:n yhteenveto ROH-tunnistuksista on esitetty kohdassa [Taulukko 17](#).

Taulukko 17 TruSight Whole Genome ROH-tapahtumien tarkkuus koon mukaan ositettuna

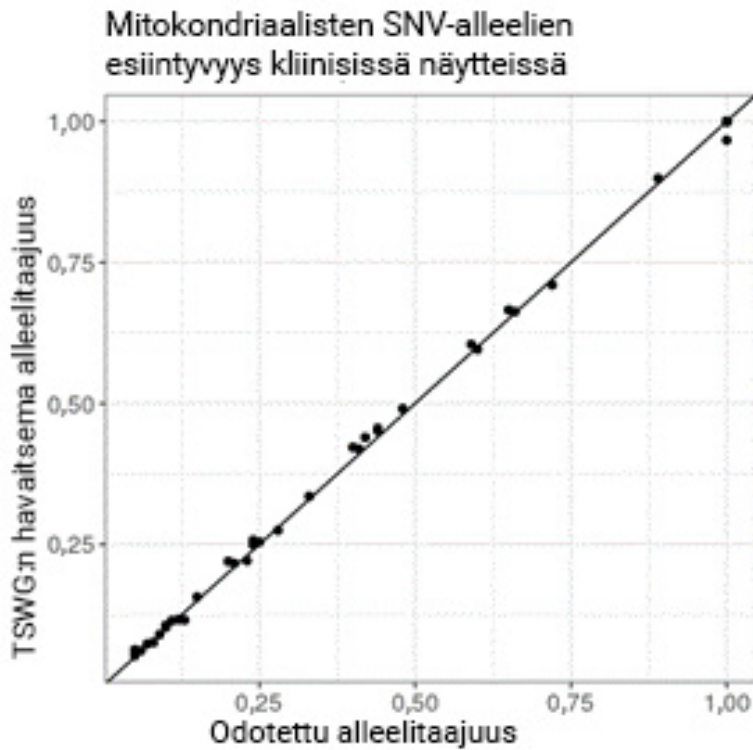
Koko	TPPV-keskiarvo	TPPV LCL
10–25 kbp	81,44 %	80,77 %
25–50 kbp	82,14 %	81,82 %
50–100 kbp	81,77 %	81,55 %
100–500 kbp	82,19 %	81,98 %
≥ 10 kbp	82,07 %	81,94 %
≥ 500 kbp	85,47 %	84,66 %

Positiivinen prosentuaalinen yhtäpitävyys (PPA) ROH:n havaitsemiselle määritettiin ulkoisista lähteistä peräisin olevissa kliinisisä näytteissä vertaamalla TruSight Whole Genome-tunnistuksia ROH-tunnistuksiin ortogonaalisista menetelmistä, mukaan lukien kromosomimikrosiru ja PCR-pohjainen arviointi. ROH-tapahtuma katsottiin havaituksi, jos vähintään 50 % alueesta raportoitiin ROH-tapahtumaksi ortogonaalisella menetelmällä, joka oli päällekkäinen ROH-tapahtumien liitoksen kanssa, jota tunnisti TruSight Whole Genome. TruSight Whole Genome Assay- ja ortogonaalisten menetelmien välinen PPA oli 34/34 (100 %) kaikkien odotettujen ROH-tapahtumien osalta (≥ 4 Mt).

## Heteroplasminen mitokondriaalinen SNV-tarkkuus

mtSNV-tunnistusten täsmällisyys arvioitiin 41 aiemmin talletetussa kliinisessä näytteessä, jotka oli hankittu ulkoisista tutkimuspaikoista. Jokainen kliininen näyte sisälsi aiemmin raportoidun mtSNV:n määrätysssä tutkimuspaikassa ja määritellyn heteroplasmaasteen perustuen mtDNA:n kohdennettu tunnettu analyysi heteroplasman avulla (MITOP) -analyysiin. TruSight Whole Genome:n arvioidut alleelitaajuudet korreloivat suuresti MITOP:n ennustamien odotettujen taajuuksien kanssa. Kaikki odotetut mtDNA SNV:t havaittiin, ja niiden PPA oli 100 % (41/41).

Kuva 3 TruSight Whole Genome Havaitut mitokondriaalisten SNV:iden alleelitiheydet vs. odotetut alleelitiheydet



Lisäksi tehtiin mtSNV-tarkkuustutkimus samalla 195 verinäytteellä ja viitemenetelmällä, jotka on kuvattu pienen variantin ja CNV:n tarkkuustutkimuksissa. Negatiivinen viitejoukko määriteltiin varmoina ei-variantteina puheluina (HYVÄKSYTTY-suodatin) ja positiivinen viitejoukko mtSNV-puheluina, joiden alleelitaajuus oli > 2,5 %. Asennot, joissa joko ei ole ohitussuodatinta tai ei-SNV-variantitunnistus poissuljettiin. esittää mtSNV:iden tarkkuuden yhteenvedon [Taulukko 18](#).

Taulukko 18 TruSight Whole Genome mtDNA SNV-tunnistusten tarkkuus

Tarkkuusmetriikka	Vertailumenetelmä, yhteneväinen positiivinen	Viitemenetelmä, eksklusiivinen positiivinen	Analyysi, eksklusiivinen positiivinen	Viitemenetelmä, yhteneväinen negatiivinen	Viitemenetelmä, eksklusiivinen negatiivinen	Analyysi, eksklusiivinen negatiivinen	Tarkkuusmetriikka-arvo (LCL)
PPA	6 875	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99% (99,96 %)
TPPV	6 875	Ei sovelleta	6	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	99,91 % (99,83 %)

Tarkkuusmetriikka	Vertailumenetelmä, yhteneväinen positiivinen	Viitemenetelmä, eksklusiivinen positiivinen	Analyysi, eksklusiivinen positiivinen	Viitemenetelmä, yhteneväinen negatiivinen	Viitemenetelmä, eksklusiivinen negatiivinen	Analyysi, eksklusiivinen negatiivinen	Tarkkuusmetriikka-arvo (LCL)
<b>NPA</b>	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	3 171 049	24 268	20 564	99,24 % (99,23 %)

## STR-laajennuksen tunnistuksen tarkkuus

STR-laajennuksen tunnistuksen tarkkuus perustui 160 kokonaisnäytteeseen, jotka oli valmistettu uuttamalla gDNA:ta kliinisesti sairastuneilta henkilöiltä, joilla oli laajennuksia tietyissä paikoissa ja jotka oli vahvistettu PCR:llä / RP-PCR:llä tai Southern Blotilla CLIA-laboratorioympäristössä. [Taulukko 11](#):ssä määritettyjä kynnysarvoja käytettiin määrittämään alleelin STR-tila tietyssä lokuksessa normaaliksi (arvioitu STR-koko on pienempi tai yhtä suuri kuin kynnys) tai laajennetuksi (kynnystä suurempi).

PPA laskettiin käyttämällä vain kliinisesti vahvistettuja näytteitä, NPA laskettiin käyttämällä vain yksittäisiä putatiivisesti terveitä verinäytteitä ja TPPV laskettiin molempien näyteryhmien välillä. Alleeleille, joissa kliinisesti vahvistettua näytettä ei ollut saatavilla, PPA:ta ei voitu laskea. Lisäksi TPPV:tä ei voitu laskea alleeleille, joissa kliinisesti vahvistettua näytettä ei ollut saatavilla eikä vääriä positiivisia puheluita ollut. NPA laskettiin kaikille STR-laajennuksille. Tietyn STR-laajennuksen ja tarkkuusmittarien osalta testattujen kliinisten näytteiden määrä on esitetty [Taulukko 19](#) -taulukossa.

Taulukko 19 TruSight Whole Genome STR-laajennusten tarkkuusmittarit

STR-laajennus	Testatut kliiniset näytteet	PPA	TPPV	NPA
AFF2	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
AR	8	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATN1	4	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATXN1	7	66,67 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATXN10	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
ATXN2	5	80,00 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATXN3	9	> 99,99 %	90,00 %	99,74 %
ATXN7	2	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
ATXN7_GCC	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
ATXN8OS	0	Ei sovelleta	0,00 %	99,74 %
ATXN8OS_CTA	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
C9ORF72	21	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %

STR-laajennus	Testatut kliiniset näytteet	PPA	TPPV	NPA
CACNA1A	5	> 99,99 %	83,33 %	99,74 %
CBL	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
CNBP	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
CNBP_CA	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
CNBP_CAGA	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
CSTB	0	Ei sovelleta	0,00 %	99,74 %
DIP2B	0	Ei sovelleta	0,00 %	99,74 %
DMPK	42	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
FMR1	47	> 99,9 %	> 99,99 %	> 99,99 %
FXN	0	Ei sovelleta	0,00 %	99,74 %
FXN_A	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
GLS	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
HTT	10	> 99,99 %	83,33 %	99,49 %
HTT_CCG	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
JPH3	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
NIPA1	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
NOP56	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
NOP56_CGCCTG	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
NOTCH2NL	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
PABPN1	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
PHOX2B	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
PPP2R2B	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
TBP	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
<b>KAIKKI</b>	<b>160</b>	<b>98,12 %</b>	<b>92,35 %</b>	<b>99,94 %</b>

STR-laajennushavainnon kokonais-PPA:n arviointi kaikissa lokuksissa edustaa lokusspesifisen PPA:n hyvää arviota saatavilla olevien kliinisten näytteiden avulla. PPA:n arviointi erityisesti FMR1-lokukseen voi toimia alarajana PPA:lle lokuksille, joita ei profiloitu suoraan suuren STR-kooltaan poikkeavuuden kynnyksarvon vuoksi.

### SMN1-alleelien tunnistustarkkuus

C-alleelin puuttumisen havaitsemisen tarkkuus SMN1:ssä (NM\_000344.3:c.840C) arvioitiin 26 kliinisellä näytteellä tapauksista, joissa oli diagnosoitu spinaalista lihasatrofiaa (SMA) ja homotsygoottinen eksonin 7 menetys SMN1:ssä, joka oli vahvistettu digitaalisella pisara-PCR:llä tai MLPA:lla. SMN1 c.840C -alleelin

esiintymisen tunnistamisen tarkkuus arvioitiin putatiivisesti terveillä yksittäisillä verinäytteillä. Jokaiselle näytteelle määritettiin yksittäinen tilastollinen metriikka (Todellinen positiivinen (TP), Väärä positiivinen (FP), Väärä negatiivinen (FN) tai Todellinen negatiivinen (TN)) C-alleelin havaitun esiintymisen (negatiivinen SMA-tila) tai puuttumisen (positiivinen SMA-tila) perusteella SMN1-geenin c.840-sijainnissa odotettuun tilaan verrattuna. PPA-, TPPV- ja NPA-estimaatit tehtiin sekä positiivisesta että negatiivisesta näytesarjasta (katso [Taulukko 20](#)).

Taulukko 20 SMN1 c.840C -alleelien puuttumisen tarkkuusmittarit

Tarkkuusmetriikka	TP	FP	TN	FN	Tarkkuusmetriikka-arvo
PPA	26	Ei sovelleta	Ei sovelleta	0	> 99,99 %
TPPV	26	0	Ei sovelleta	Ei sovelleta	> 99,99 %
NPA	Ei sovelleta	0	195	Ei sovelleta	> 99,99 %

## Toistettavuus

### Laboratorion sisäinen tarkkuus

Laboratorion sisäinen tarkkuus arvioitiin käyttämällä ekstrahoitua gDNA:ta ja erilaisia tunnettuja variantteja koko genomissa. Näihin sisältyivät mtSNV:t lähellä havaitsemisrajaa ja paljon sen yläpuolella, näytteet, jotka sisälsivät SMN1 c.840C -alleelin, sekä näytteet, joissa oli FMR ja HTT1, toistuvat laajennukset havaitsemisrajan lähellä ja paljon sen yläpuolella. Näytteet testattiin yhdeksällä ainutlaatuisella ehdolla, jotka oli suunniteltu kolmella käyttäjällä, kolmella kirjaston valmistelureagenssierällä, kolmella sekvensointitarvike-erällä ja kolmella sekvensointilaitteella.

Jokainen näyte ajettiin kahtena kappaleena samassa ajossa ajon sisäisen vaihtelun arvioimiseksi, ja jokainen testitapaus testattiin kaksi kertaa ajojen välisen vaihtelun osalta. Jokainen näyte arvioitiin 36 havainnolla, ja suunnittelu tarjosi 18 asteen vapauden toistettavuuden arviointiin. Luettelo paneelin jäsenistä, näytetyypistä ja kutakin paneelin jäsentä koskevista arvioiduista varianteista on esitetty kohdassa [Taulukko 21](#). Näytteet 1-4 ja 9-12 saatiin sekä miehiltä että naisilta, jotka olivat omien sanojensa mukaan valkoihoista, afrikkalaista ja aasialaista syntyperää, jotta näytejoukko olisi monipuolinen.

Taulukko 21 Laboratorion sisäiseen tarkkuustutkimukseen käytetyn paneelin näytekoostumus

Paneeli	Näytenumero	Näytteen tyyppi	Variantit
A	1	Verestä saatava gDNA	Pienet variantit, CNV, ROH, STR ei laajennettu, SMN1 c.840C:n läsnäolo
	2	Verestä saatava gDNA	Pienet variantit, CNV, ROH, STR ei laajennettu, SMN1 c.840C:n läsnäolo
	3	Verestä saatava gDNA	Pienet variantit, CNV, ROH, STR ei laajennettu, SMN1 c.840C:n läsnäolo
	4	Verestä saatava gDNA	Pienet variantit, CNV, ROH, STR ei laajennettu, SMN1 c.840C:n läsnäolo
	5	Verestä peräisin olevan gDNA:n keinotekoinen sekoitus	Mitokondriaaliset SNV:t matalan havaitsemisrajan tasolla
	6	Keinosolulinja NA20241 <sup>1</sup>	STR laajennettu FMR1-lokuksiin matalan havaitsemisrajan tasolla
	7	Keinosolulinja NA20208	STR laajennettu HTT-lokuksiin matalan havaitsemisrajan tasolla
	8	Keinosolulinja NA23686	SMN1 c.840C:n puuttuminen
B	9	Verestä saatava gDNA	Pienet variantit, CNV, ROH, STR ei laajennettu, SMN1 c.840C:n läsnäolo
	10	Verestä saatava gDNA	Pienet variantit, CNV, ROH, STR ei laajennettu, SMN1 c.840C:n läsnäolo
	11	Verestä saatava gDNA	Pienet variantit, CNV, ROH, STR ei laajennettu, SMN1 c.840C:n läsnäolo
	12	Verestä saatava gDNA	Pienet variantit, CNV, ROH, STR ei laajennettu, SMN1 c.840C:n läsnäolo
	13	Verestä peräisin olevan gDNA:n keinotekoinen sekoitus	mtSNV:t korkealla havaitsemisrajatasolla
	14	Keinosolulinja NA07862	STR laajennettu FMR1-lokuksiin korkean havaitsemisrajan tasolla
	15	Keinosolulinja NA20253	STR laajennettu HTT-lokuksiin korkean havaitsemisrajan tasolla
	16	Keinosolulinja NA03814	SMN1 c.840C:n puuttuminen

Korkea havaitsemisrajataso: Vaihteleva alleelitaajuus noin 2,0–4,0-kertaisella havaitsemisrajalla.

Matala havaitsemisrajataso: Vaihteleva alleelitaajuus noin 1,0x – 1,5x havaitsemisrajalla.

<sup>1</sup> NA20241-tutkimuksen tuloksia ei raportoitu lopullisina lukuina, koska sen määritettiin olevan merkittävästi alle 1,0x havaitsemisrajan, joten se ei täyttänyt näytevaatimuksia.

Kvalitatiivisessa arvioinnissa raportoidaan toistettavuuden metriikat, joissa variantteja käsitellään kvalitatiivisina kokonaisuuksina (muutoksina tai variantteina, joita ei ole). Positiivisten tai negatiivisten tunnistusten ja eri kvalitatiivisten mittarien eri määritelmiä arvioitiin ja raportoitin kunkin varianttityypin osalta (Taulukko 22). Kun pienen variantin, CNV ja ROH -tunnistusten toistettavuutta arvioitiin, luonnehdinta-ajon rinnakkaisnäytteenä tehtyjä varianttintunnistuksia käytettiin kullekin näytteelle, joka toimi vertailupisteenä kaikille muille kyseisen näytteen rinnakkaisnäytteille tutkimuksessa.

Taulukko 22 Yhteenvedo kunkin varianttityypin toistettavuuden laadullisesta arvioinnista

Varianttityyppi	Positiivinen	Negatiivinen	Vertailun tyyppi	Kvalitatiiviset metriikat
Pienet variantit	Vaihtoehdoisen tunnistuksen välityssuodattimet	Homotsygoottinen viitetunnistuksen läpäisy-suodattimet	Sopivuus tunnistusjoukon kanssa alkukarakterisointiajoista	Positiivisen yhtäpitävyyden keskiarvo (APA) ja negatiivisen yhtäpitävyyden keskiarvo (ANA)
CNV:t	CNV-tunnistuksen välityssuodattimet	Genomiset asemat eivät ole päällekkäisiä ohitetun kopionumeron varianttintunnistuksen kanssa	Sopivuus tunnistusjoukon kanssa alkukarakterisointiajoista	APA ja ANA
ROH	ROH-tunnistus	Genomisijainnit eivät ole ROH-tunnistuksen päällä	Sopivuus tunnistusjoukon kanssa alkukarakterisointiajoista	APA ja ANA
STR-laajennus	Näyte, jossa on STR-laajennus vähintään yhdessä kohdelokuksessa	Näyte ilman laajennuksia missä tahansa kohdelokuksessa	Näytteen tilan mukainen, joka on määritetty näytteen karakterisoinnilla ortogonaalisella määrittelyllä	Positiivisten tunnistusten prosenttiosuus (PPC) ja negatiivisten tunnistusten prosenttiosuus (PNC)

Varianttityyppi	Positiivinen	Negatiivinen	Vertailun tyyppi	Kvalitatiiviset metriikat
SMN1 c.840C - tunnistus	Näyte ilman C-alleelia SMN1:n (SMA-positiivinen) asemassa c.840	Näyte, joka sisältää vähintään yhden kopion C-alleelista SMN1:n (SMA-negatiivinen) sijainnissa c.840	Näytteen tilan mukainen, joka on määritetty näytteen karakterisoinnilla ortogonaalisella määrityksellä	PPC ja PNC
mtSNV	Mitokondriaaliset SNV-tunnistusten läpäisevät suodattimet	Ei-variantti asento mitokondriaalisen kromosomin läpäisy-suodattimessa	Laimentamattomissa näytteissä tehtyjen varianttitunnistusten ja muuttumattomien tunnistusten mukainen	PPC ja PNC

Eri varianttityyppien kvantitatiiviseen arviointiin sisältyi joko kvantitatiivisten, kvalitatiivisten puheluiden taustalla olevien mittarien tai pienten varianttien kohdalla yhtäpitävyyssmittarien vaihtelevuuden arviointi suhteessa viitepuhelujoukkoon. Tämä tutkimus suoritti sekä kvantitatiivisten mittareiden kokonaisvaihteluun arvioinnin rinnakkaisnäytteiden välillä että tutkimukseen sisältyvien eri tekijöiden vaikutuksen vaihteluun tällaisissa kvantitatiivisissa mittareissa Variance Components Analysis -analyysin avulla. [Taulukko 23](#) esittää yhteenvedon kvantitatiivisista mittareista, joita käytettiin kunkin varianttityypin analyysissä, sekä tekijät, joiden arvioitiin vaikuttavan kvantitatiivisen mittarin vaihteluun.

Taulukko 23 Yhteenvedo kvantitatiivisista mittareista, joita käytetään tarkkuuden arviointiin eron varianttityypeille

Varianttityyppi	Kvantitatiiviset metriikat	Vaihtelevuuteen vaikuttamisesta arvioidut tekijät
Pienet variantit	APA ja ANA	Käyttäjä, kirjaston valmistelupakkauksen erä, laite, sekvensointitarvikkeiden erä, variantin alatyypin, genomisen konteksti
CNV:t	Normalisoitu kattavuus CNV-alueella	Käyttäjä, kirjaston esivalmistussarjan erä, instrumentti, sekvensointitarvikkeiden erä, variantin alatyypin, variantin pituus
ROH	ROH-pisteet ROH-alueella	Käyttäjä, kirjaston esivalmistussarjan erä, instrumentti, sekvensointitarvikkeiden erä, variantin alatyypin, variantin pituus
STR-laajennus	STR-kokoarvio	Käyttäjä, kirjaston esivalmistelusarjan erä, instrumentti, sekvensointitarvikkeiden erä, STR-kohta, STR-pituus



Varianttityyppi	Kvantitatiiviset metriikat	Vaihtelevuuteen vaikuttamisesta arvioidut tekijät
SMN1 c.840C - tunnistus	Log- todennäköisyysuhde viitealleelin (C) esiintymiselle kohdesijainnissa	Käyttäjä, kirjaston esivalmistuspakkauksen erä, instrumentti, sekvensointitarvikkeiden erä, SMA:n tila
Mitokondriaalinen SNV	Variantin alleelitaajuus	Operaattori, kirjaston esivalmistussarjan erä, instrumentti, sekvensointitarvikkeiden erä, variantin sijainti, odotettu variantin alleelifrekvenssi

Varianssikomponenttianalyysin tulokset esitetään kohdassa [Taulukko 24](#). Pienten varianttien osalta suurin osa varianssista johtui jäännösvirheestä, eikä sitä selitetty rakenteeseen sisältyvillä määrytykseen liittyvillä tekijöillä, kuten sekvensointipakkauksen erällä, sekvensointilaitteella, kirjaston valmistelupakkauksen erällä, käyttäjällä ja ajolla. Yksi poikkeus havaittiin SNV:ille keskitason luottamusalueilla, joissa suurin osa varianssista liittyi sekvensointisarjan erään. Yleisesti ottaen suurempi varianssi liitettiin määrytykseen liittyviin tekijöihin pienille varianteille genomien heikosti luotettavilla alueilla. Kaikissa muissa varianttityypeissä suurin osa varianssista johtui jäännösvirheestä eikä määrytykseen liittyvistä tekijöistä. Tämä tutkimus osoittaa, että useimmissa pienissä varianttien alatyypeissä voidaan genomien korkean ja keskitason luottamusvälin alueiden suodatusta käyttää toistettavuuden lisäämiseen ja määrytyksen vaihtelevuuden vähentämiseen. [Ulkoinen toistettavuus sivulla 62](#) tarjoaa kattavan analyysin määrytyksen toistettavuudesta.

Taulukko 24 Varianssikomponenttien analyysitulosten tulokset

Mittari	Varianttien alatyypit	Luottamustaso	Jäännös	Sekvensointisarjan erä	Ajosta ajoon	Laite	Kirjaston valmistussarjan erä	Käyttämä
APA	Lyhyt poisto (1-5 bp)	Korkea	79,36 %	17,52 %	0,00 %	0,00 %	3,13 %	0,00 %
		Keskitaso	76,97 %	18,59 %	1,53 %	0,00 %	2,91 %	0,00 %
		Matala	67,85 %	24,87 %	4,4 %	0,00 %	2,88 %	0,00 %
	Keskitason poisto (6-15 bp)	Keskitaso	61,17 %	29,06 %	7,42 %	0,00 %	2,35 %	0,00 %
		Matala	59,33 %	31,76 %	6,38 %	0,17 %	2,35 %	0,00 %
	Pitkä poisto (16-31 bp)	Keskitaso	52,93 %	33,72 %	11,67 %	0,17 %	1,51 %	0,00 %
		Matala	49,10 %	37,01 %	11,08 %	1,42 %	1,39 %	0,00 %
	Lyhyt lisäys (1-5 bp)	Korkea	89,93 %	7,32 %	1,76 %	0,00 %	0,99 %	0,00 %
		Keskitaso	74,52 %	19,96 %	3,44 %	0,00 %	2,08 %	0,00 %
		Matala	60,64 %	29,72 %	8,49 %	0,00 %	1,15 %	0,00 %
	Keskikokoinen lisäys (6-15 bp)	Keskitaso	81,76 %	15,78 %	0,00 %	0,00 %	2,41 %	0,06 %
		Matala	51,28 %	35,07 %	12,07 %	0,00 %	1,58 %	0,00 %
	Pitkä lisäys (16-31 bp)	Keskitaso	87,59 %	9,83 %	1,18 %	0,00 %	1,40 %	0,00 %
		Matala	52,47 %	35,32 %	10,14 %	0,23 %	1,85 %	0,00 %
	SNV		Korkea	78,01 %	17,45 %	0,00 %	0,13 %	1,23 %
Keskitaso			79,71 %	16,95 %	0,77 %	0,20 %	1,29 %	1,09 %
Matala			56,63 %	36,08 %	6,97 %	0,22 %	0,00 %	0,09 %
ANA	SNV	Korkea	55,07 %	21,84 %	21,07 %	1,80 %	0,21 %	0,00 %
		Keskitaso	28,53 %	49,08 %	20,11 %	1,27 %	1,00 %	0,00 %
		Matala	51,78 %	36,04 %	9,76 %	2,42 %	0,00 %	0,00 %

Mittari	Varianttien alatyypit	Luottamustaso	Jäännös	Sekvensointisarjan erä	Ajosta ajoon	Laite	Kirjaston valmistussarjan erä	Käyttäjä
Syvyys	CNV-VOITTO (10 kbp, 25 kbp)	Ei sovelleta	73,28 %	2,87 %	0,00 %	0,00 %	1,01 %	0,00 %
	CNV-VOITTO (25 kbp, 50 kbp)	Ei sovelleta	72,99 %	5,25 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,56 %
	CNV-VOITTO (50 kbp, 100 kbp)	Ei sovelleta	66,40 %	5,16 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV-VOITTO (100 kbp, 500 kbp)	Ei sovelleta	43,51 %	14,92 %	14,01 %	0,20 %	0,00 %	15,72 %
	CNV HÄVIÖT (10 kbp, 25 kbp)	Ei sovelleta	83,41 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV HÄVIÖT (25 kbp, 50 kbp)	Ei sovelleta	84,67 %	1,20 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV HÄVIÖT (50 kbp, 100 kbp)	Ei sovelleta	84,16 %	2,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV HÄVIÖT (100 kbp, 500 kbp)	Ei sovelleta	81,25 %	5,22 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,55 %

Mittari	Varianttien alatyypit	Luottamustaso	Jäännös	Sekvensointisarjan erä	Ajosta ajoon	Laite	Kirjaston valmistussarjan erä	Käyttäjä
Pisteytys alueen suhteen	ROH (1 kbp, 10 kbp)	Ei sovelleta	74,32 %	1,65 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,52 %
	ROH (10 kbp, 25 kbp)	Ei sovelleta	84,78 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (25 kbp, 50 kbp)	Ei sovelleta	84,92 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (50 kbp, 100 kbp)	Ei sovelleta	85,63 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (100 kbp, 500 kbp)	Ei sovelleta	85,76 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH $\geq$ 500 kbp	Ei sovelleta	84,81 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Mittari	Varianttien alatyypit	Luottamustaso	Jäännös	Sekvensointisarjan erä	Ajosta ajoon	Laite	Kirjaston valmistussarjan erä	Käyttäjä
STR-lokusten <sup>1</sup> kokoarvio	AFF2	Ei sovelleta	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ATXN7	Ei sovelleta	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ATXN7_GCC	Ei sovelleta	99,43 %	0,57 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP	Ei sovelleta	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP_CA	Ei sovelleta	95,45 %	4,55 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CSTB	Ei sovelleta	96,45 %	0,87 %	2,57 %	0,00 %	0,00 %	0,11 %
	DIP2B	Ei sovelleta	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	FMR1	Ei sovelleta	71,02 %	10,06 %	0,00 %	17,33 %	0,64 %	0,95 %
	FXN_A	Ei sovelleta	94,52 %	1,37 %	0,00 %	1,37 %	1,37 %	1,37 %
	HTT	Ei sovelleta	82,23 %	0,00 %	11,99 %	3,81 %	0,00 %	1,97 %
	HTT_CCG	Ei sovelleta	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	NOTCH2NL	Ei sovelleta	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,29 %	0,29 %	0,00 %
	TBP	Ei sovelleta	90,91 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
Todennäköisyysuhde	c.840C mallissa NA03814	Ei sovelleta	65,71 %	18,98 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	15,32 %
	c.840C mallissa NA23686	Ei sovelleta	87,64 %	0,00 %	0,00 %	5,90 %	0,00 %	6,46 %
VAF	mtSNV:t LOD:n lähellä	Ei sovelleta	83,13 %	0,37 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,05 %

<sup>1</sup> Varianssikomponenttianalyysia ei tehty lokuksille, joille ei havaittu varianssia.

## Pakkausseloste

### Ulkoisen toistettavuus

Ulkoisen toistettavuus määritettiin käyttämällä yhtä kirjaston valmistelu- ja sekvensointireagenssieriää kolmessa ulkoisessa tutkimuskeskuksessa, joissa kussakin oli kaksi käyttäjää. Toistettavuustutkimuksessa käytettiin samoja [Laboratorion sisäinen tarkkuus sivulla 53](#) käytettyjä näytteitä ([Taulukko 21](#)) yhtä poikkeusta lukuun ottamatta: näyte NA20241 korvattiin näytteellä NA20239 FMR1 lokuksen STR-laajennuksen arvioimiseksi alhaisella havaitsemisrajalla. Yhteensä 16 ainutlaatuista näytettä testattiin kahtena alapaneelina kahdeksasta ainutlaatuisesta näytteestä (paneelit A ja paneeli B) kussakin tutkimuspaikassa. Jokaisen alapaneelin kirjastoille tehtiin kolme sekvensointiajoa yhteensä 36 sekvensointiajoa yksittäistä näytettä kohti. 576 näytekirjaston näytteenläpäisy nopeus kelvollisilla sekvensointiajoilla, jotka määriteltiin näytekirjaston QC-mittarien läpäisevien näytteiden määränä ensimmäisellä yrityksellä, oli 99,1 % (571 / 576; 95 % CI: 98,0 %, 99,6 %). Kaikki testitulokset perustuvat alkutestaukseen.

SNV:iden, insertioiden, poistojen, CNV:iden ja ROH:n toistettavuus arvioitiin vertaamalla tietoja viitetunnistusjoukkoon tavanomaisen suorituskyvyn perusteella kolmella karakterisointiajolla ([Taulukko 25](#) ja [Taulukko 26](#)). STR-laajennusten toistettavuus, SMN1 c.840C -alleelin ja mtSNV:iden puuttuminen arvioitiin vertaamalla tietoja tunnettuun tilaan ([Taulukko 27](#)).

Taulukko 25 toistettavuus SNV:TruSight Whole Genomeille, CNV:ille ja ROH:ille

Varianttityyppi – stratifikaatio	Samanaikaiset Positiiviset Tunnistukset <sup>1</sup> / Positiiviset Tunnistukset <sup>2</sup>			Positiivisen yhtäpitävyyden keskiarvo (%) (95% CI) <sup>3</sup>
	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	
<b>Pienet variantit (korkea varmuus)</b>				
SNV:t	687 996 150 /	666 509 635 /	688 001 697 /	99,9
	688 770 402	667 253 493	688 766 887	(99,9–99,9)
Insertiot — 1-5 bp	34 087 135 /	33 025 772 /	34 089 204 /	99,9
	34 137 298	33 073 087	34 137 792	(99,9–99,9)
Deleetiot — 1-5 bp	44 096 186 /	42 733 935 /	44 102 515 /	99,6
	44 255 442	42 883 089	44 256 695	(99,6–99,6)
<b>Pienet variantit (keskinkertainen varmuus)</b>				
SNV:t	42 238 226 /	40 920 370 /	42 236 751 /	98,8
	42 737 228	41 391 560	42 725 827	(98,8–98,9)
Insertiot — 1-5 bp	11 075 073 /	10 734 488 /	11 080 468 /	98,9
	11 204 210	10 855 790	11 204 818	(98,9–99,9)
Insertiot – 6–15 bp	4 307 181 /	4 173 626 /	4 308 408 /	99,3
	4 339 975	4 205 261	4 340 277	(99,2–99,3)
Insertiot — ≥ 16 bp	611 952 /	593 114 /	612 222 /	96,8
	632 214	612,877	632 498	(96,8–96,8)
Deleetiot — 1-5 bp	24 571 502 /	23 814 655 /	24 586 095 /	98,9
	24 851 492	24 076 930	24 855 041	(98,9–98,9)
Deleetiot — 6-15 bp	8 737 319 /	8 473 410 /	8 746 773 /	98,2
	8 900 796	8 624 403	8 902 016	(98,2–98,2)
Deleetiot — ≥ 16 bp	3 590 282 /	3 481 192 /	3 594 420 /	95,0
	3 779 907	3 662 448	3 780 659	(95,0–95,0)
<b>Pienet variantit (alhainen varmuus)</b>				
SNV:t	78 507 103 /	76 365 789 /	78 863 977 /	81,2
	96 859 682	94 066 720	97 058 652	(81,2–81,2)

Varianttityyppi – stratifikaatio	Samanaikaiset Positiiviset Tunnistukset <sup>1</sup> / Positiiviset Tunnistukset <sup>2</sup>			Positiivisen yhtäpitävyyden keskiarvo (%) (95% CI) <sup>3</sup>
	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	
Insertiot — 1-5 bp	17 312 805 /	16 859 987 /	17 406 355 /	89,6
	19 370 351	18 807 745	19 418 516	(89,5–89,6)
Insertiot – 6–15 bp	5 543 985 /	5 404 652 /	5 584 241 /	85,1
	6 529 886	6 338 556	6 550 066	(85,1–85,2)
Insertiot — ≥ 16 bp	3 284 197 /	3 205 165 /	3 314 025 /	77,0
	4 275 286	4 158 315	4 298 399	(77,0–77,0)
Deleetiot — 1-5 bp	31 659 416 /	30 751 952 /	31 746 379 /	92,7
	34 194 748	33 158 757	34 226 245	(92,7–92,7)
Deleetiot — 6-15 bp	9 189 220 /	8 928 794 /	9 217 516 /	92,1
	9 987 568	9 684 179	9 995 101	(92,1–92,2)
Deleetiot — ≥ 16 bp	3 335 400 /	3 241 968 /	3 346 219 /	85,4
	3 909 364	3 791 331	3 912 857	(85,4–85,5)
<b>CNV:t – vahvistukset ≥ 10 kbp</b>	7 883 /	7 664 /	7 916 /	95,5
	8 275	8 012	8 282	(95,2–95,8)
<b>CNV:t – tappiot ≥ 10 kbp</b>	11 517 /	11 248 /	11 516 /	95,3
	12 089	11 777	12 113	(95,1–95,5)
<b>ROH — ≥ 500 kbp</b>	6 641 /	6 519 /	6 616 /	98,0
	6 765	6 663	6 756	(97,8–98,2)

<sup>1</sup> Positiivisten tunnistusten kokonaismäärä = Kyselyn konkordantti positiivinen (QCP) + Viitekonkordantti positiivinen (RCP).

<sup>2</sup> Positiivisten tunnistusten kokonaismäärä = Kyselyn konkordantti positiivinen (QCP) + Kyselyn eksklusiivinen positiivinen (QEP) + Viitekonkordantti positiivinen (RCP) + Viite-eksklusiivisen positiivinen (REP).

<sup>3</sup> 2-puolinen 95 %:n luottamusväli lasketaan Wilsonin pisteytysmenetelmällä.



Taulukko 26 SNV:den, CNV:den ja ROH:n ANA:n TruSight Whole Genome:n toistettavuus

Varianttityyppi – stratifikaatio	Samanaikaiset negatiiviset tunnistukset <sup>1</sup> / Negatiiviset tunnistukset <sup>2</sup>			Keskimääräinen negatiivinen yhtäpitävyys (%) (95% CI) <sup>3</sup>
	Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3	
Pienet variantit (korkea varmuus)	486 282 620 918 /	470 948 205 740 /	486 285 759 770 /	> 99,9
	486 388 081 375	471 054 131 230	486 389 857 817	(> 99,9-> 99,9)
Pienet variantit (keskinkertainen varmuus)	17 249 915 828 /	16 699 106 194 /	17 253 834 878 /	99,0
	17 427 817 811	16 874 794 553	17 429 035 482	(99,0-99,0)
Pienet variantit (alhainen varmuus)	24 072 615 254 /	23 454 103 344 /	24 180 801 788 /	94,0
	25 608 493 410	24 947 163 687	25 695 956 102	(94,0-94,0)
CNV:t – vahvistukset ≥ 10 kbp	592 486 270 144 /	573 973 293 084 /	592 487 297 632 /	> 99,9
	592 500 222 476	573 985 772 396	592 500 614 241	(> 99,9-> 99,9)
CNV:t – tappiot ≥ 10 kbp	592 548 802 882 /	574 030 570 254 /	592 547 683 360 /	> 99,9
	592 559 825 216	574 041 311 257	592 559 141 007	(> 99,9-> 99,9)
ROH — ≥ 500 kbp	542 968 586 606 /	525 724 060 526 /	543 014 319 116 /	99,2
	547 402 885 905	530 011 754 808	547 444 495 449	(99,2-99,2)

<sup>1</sup> Yhtäpitävien negatiivisten tunnistusten kokonaismäärä = 2 × yhtäpitävä negatiivinen (CN).

<sup>2</sup> Negatiivisten tunnistusten kokonaismäärä = 2 × Samanaikaiset negatiiviset tunnistukset (CN) + Eksklusiiviset negatiiviset referenssit (REN) + Kyselyn eksklusiivinen negatiivinen (QEN).

<sup>3</sup> 2-puolinen 95 %:n luottamusväli lasketaan Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

Taulukko 27 STR:n, SMN1:n ja mtSNV:n toistettavuus TruSight Whole Genome:n suhteen

Varianttityyppi – stratifikaatio	Odotetut positiiviset tunnistukset yhteensä	Positiiviset tunnistukset			Odotetut negatiiviset tunnistukset yhteensä	Negatiiviset tunnistukset			Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) (95 % CI) <sup>1</sup>	Negatiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) (95 % CI) <sup>1</sup>
		Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3		Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3		
<b>STR-laajennukset – korkea havaitsemistaso (2x–4x LOD)</b>										
STR-laajennukset – FMR1	35	12	11	12	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	100 (90,1–100)	Ei sovelleta
STR-laajennukset – HTT	36	12	12	12	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	100 (90,4–100)	Ei sovelleta
STR-laajennukset – FMR1 ja HTT yhdistetty	71	24	23	24	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	100 (94,9–100)	Ei sovelleta
<b>STR-laajennukset – matala havaitsemistaso (1x–1,5x LOD)</b>										
STR-laajennukset – FMR1	36	11	10	11	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	88,9 (74,7–95,6)	Ei sovelleta
STR-laajennukset – HTT	36	12	12	12	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	100 (90,4–100)	Ei sovelleta

Varianttityyppi – stratifikaatio	Odotetut positiiviset tunnistukset yhteensä	Positiiviset tunnistukset			Odotetut negatiiviset tunnistukset yhteensä	Negatiiviset tunnistukset			Positiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) (95 % CI) <sup>1</sup>	Negatiivisten tunnistusten prosenttimäärä (%) (95 % CI) <sup>1</sup>
		Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3		Testipaikka 1	Testipaikka 2	Testipaikka 3		
STR-laajennukset – FMR1 ja HTT yhdistetty	72	23	22	23	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	94,4 (86,6–97,8)	Ei sovelleta
STR-laajennukset – 28 pääkohde-STR-lokusta yhdistettyinä	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	Ei sovelleta	285	96	93	96	Ei sovelleta	100 (98,7–100)
SMN1 c.840C:n puuttuminen	71	24	24	23	285	96	93	96	100 (94,9–100)	100 (98,7–100)
mtSNV:t – korkea taso (2x–4x LOD)	1 080	360	360	360	457 524	152 491	152 489	152 484	100 (99,6–100)	> 99,9 (> 99,9–> 99,9)
mtSNV:t – matala taso (1x–1.5x LOD)	1 080	360	359	360	457 524	152,481	152 489	152 483	99,9 (99,5–99,9)	> 99,9 (> 99,9–> 99,9)

<sup>1</sup> Kaksipuolinen 95 %:n luottamusväli laskettuna Wilsonin pisteytysmenetelmällä.

# Vianmääritys

Seuraavan taulukon avulla voit tehdä työnkulun ongelmien vianmäärityksen. Jos näytteen sekvensointiajo tai kirjaston valmistelu epäonnistuu kaksi kertaa, vianmäärityksen lisätoimet saattavat olla tarpeen. Ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen.

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpide
Suorita luontiongelma	Liittyvää suunniteltua ajoa ei voi valita manuaalisesti NovaSeq 6000Dx Control Software -ohjausohjelmisto-ohjelmassa kulutustarvikkeiden lataamisen jälkeen	Virheellinen kirjastoputken tunnus määritettiin ajon suunnittelun aikana	Katso kohta Suorita revisio kohdassa TruSight Whole Genome Analysis Application -opas (asiakirjanro 200049931).

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpite
Sekvensointivirhe	Sekvensoinnin epäonnistumisen tila kohteessa Illumina Run Manager	Sekvensointiajo keskeytettiin tai sitä ei saatu päätökseen NovaSeq 6000Dx:n tai sekvensointikulutustarvikkeiden käsittelyyn liittyvän ongelman vuoksi	Katso NovaSeq 6000Dx Instrument tekninen dokumentaatio (asiakirjanro 200010105).  Ongelman ratkaisemisen jälkeen kirjasto voidaan yhdistää uudelleen ja järjestää uudelleen enintään kerran (tilavuuden vuoksi).

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suositeltu toimenpide
		<p>Ajo suoritettu loppuun, mutta klusterin määrittäminen epäonnistui. Mahdollinen NovaSeq 6000Dx ongelma, tarvikkeiden käsittelyongelman sekvensointi tai katastrofaalinen kirjaston valmisteluvirhe reagenssin käsittelyongelman tai käyttäjävirheen vuoksi (esim. ohitettu vaihe tai hylätty siirretyn supernatantin sijaan koon valinnan aikana)</p>	<p>Arvioi yksittäisten kirjastojen saannot FLP:ssä qPCR:llä <math>\geq 0,94</math> nM:n (oletuksena 450 bp:n pakkauselosteen koko) osalta kirjaston valmisteluun ja sekvensointiin liittyvien ongelmien sulkemiseksi pois.</p> <p>Jos kirjaston valmisteluongelmat on suljettu pois ja sekvensointiin liittyvää ongelmaa epäillään, katso NovaSeq 6000Dx Instrument tekninen dokumentaatio (asiakirjanro 200010105).</p> <p>Jos kirjaston valmisteluongelmaa epäillään, tutustu <a href="#">Vinkkejä ja tekniikoita sivulla 12</a> sekä <a href="#">Käyttöohjeet sivulla 15</a> ennen kirjaston valmistelun ja sekvensoinnin toistamista. Jos virheitä esiintyy toistuvasti, ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen.</p>

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpite
Sekvensointitietojen siirto palvelimelle epäonnistui	Sekvenssitiedoston siirto analyysin vikatilaa varten Illumina Run Manager:ssa	Verkkoyhteyden ongelma tai laitteen tai palvelimen virtakatkos tapahtui ajon tiedonsiirron aikana	<p>Tarkista laitteen verkkoyhteyden virtakatkos tai menetys. Odota, että järjestelmä on käyttämättömänä (valmistuksen jälkeen) ja vahvista sitten yhteys määritettyyn lähtösijaintiin siirtymällä kohtaan Laiteasetukset, IVD-ASETUKSET käyttämällä Selaa-toimintoa.</p> <p>Jos vianhakua tarvitaan lisää, katso NovaSeq 6000Dx Instrument tekninen dokumentaatio (asiakirjanro 200010105). Jos yhteyden tai virtaongelmien ratkaisemisen jälkeen tiedostonsiirto ei käynnisty uudelleen ja valmis, ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen.</p>



Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
Analyysi ei käynnisty	Analyysiä ei aloitettu - tilassa Illumina Run Manager, vaikka tiedoston siirto sekvensointia analyysia varten on suoritettu	Laitteen ja DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx kadonneen tai DRAGEN käyttöoikeuden välinen pariliitos tai yhteys on vanhentunut.	<p>Odotetaan, että järjestelmä on käyttämättömänä (valmistuksen jälkeen) ja vahvista sitten, DRAGEN että DRAGEN lisenssi on voimassa. Jos lisenssi on vanhentunut, ota yhteyttä Illumina. Jos lisenssi on voimassa, valitse <b>Run Self-Test</b> (Suorita itsetesti). Jos testi epäonnistuu tai jos itsetestin suoritusvaihtoehto ei ole käytettävissä, kirjaudu Instrument-laitteeseen tarkistaaksesi, liittykö palvelimen pariliittämiseen virhe. Katso NovaSeq 6000Dx Instrument tekninen dokumentaatio (asiakirjanro 200010105):n kohta Järjestelmän määrittäminen.</p> <p>Analyysin pitäisi käynnistyä automaattisesti, kun ongelma on ratkaistu. Poistu sivulta ja siirry Aktiiviset ajot -välilehteen vahvistaaksesi, että analyysi on käynnissä. Jos ongelma jatkuu, ota yhteyttä Illumina.</p>

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
Analyysi juuttuu kiinni	Analyysi käynnissä Illumina Run Manager-tilassa paljon odotettua pidempään	Verkkoyhteys tai laitteen tai palvelimen virta on saattanut häiriintyä analyysin aikana ja aiheuttaa analyysin juuttumisen	<p>Peruuta analyysi ja tarkista, onko laitteen verkkoyhteydessä virtakatkoksia tai häiriöitä.</p> <p>Odota, että järjestelmä on käyttämättömänä (valmistuksen jälkeen) ja siirry sitten kohtaan Laiteasetukset (IVD-ASETUKSET) ja varmista yhteys määritettyyn lähtösijaintiin. Jos lisävianmäärittäystä tarvitaan, katso NovaSeq 6000Dx Instrument tekninen dokumentaatio (asiakirjanro 200010105).</p> <p>Kun olet käsitellyt ongelman, suorita analyysi ilman muutoksia. Katso kohta TruSight Whole Genome Analysis Application -opas (asiakirjanro 200049931).</p>

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpite
Analyysitiedostojen siirto epäonnistui	Analyysitiedoston siirto tallennustilaan epäonnistui Illumina Run Manager :ssa	Verkkoyhteyden ongelma tai laitteen tai palvelimen virtakatkos tapahtui analyysin tiedonsiirron aikana	<p>Peruuta analyysi ja tarkista, onko laitteen verkkoyhteydessä virtakatkoksia tai häiriöitä.</p> <p>Odota, että järjestelmä on käyttämättömänä (valmistuksen jälkeen) ja siirry sitten kohtaan Laiteasetukset (IVD-ASETUKSET) ja varmista yhteys määritettyyn lähtösijaintiin. Jos lisävianmäärittäminen tarvitaan, katso NovaSeq 6000Dx Instrument tekninen dokumentaatio (asiakirjanro 200010105).</p> <p>Kun olet käsitellyt ongelman, suorita analyysi ilman muutoksia. Katso kohta TruSight Whole Genome Analysis Application -opas (asiakirjanro 200049931).</p>
Analyysi epäonnistuu jonossa	Analyysi epäonnistui jonon jälkeen	Jos analyysia haetaan, alkuperäinen ajo on ehkä poistettu tai arkistoitu, eikä se ole enää ulkoiselle tallennussijainnille määritetyssä paikassa	Tarkista, että alkuperäinen ajo on edelleen ulkoisessa tallennussijainnissa. Jos se on arkistoitu, palauta se arkistosta ja suorita analyysi uudelleen.

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpite
Sekvensoinnin laadunvalvonta epäonnistuu	Yhteenveto laadunvalvonnan tuloksen epäonnistumisesta konsolidoidussa raportissa	”Yhteensä % $\geq$ Q30” alle analyttisen spesifikaation johtuen sekvensoinnin kulutustarvikkeiden virheellisestä käsittelystä (sulamisen epäonnistuminen kokonaan tai sekoittuminen sulattamisen jälkeen)	Katso NovaSeq 6000Dx Instrument tekninen dokumentaatio (asiakirjanro 200010105). Ongelman ratkaisemisen jälkeen kirjasto voidaan yhdistää uudelleen ja järjestää uudelleen enintään kerran (tilavuuden vuoksi).
FASTQ QC epäonnistuu kaikkien näytteiden osalta	FASTQ laadunvalvontatuloksen yhteenveto ja näytekirjaston laadunvalvontatuloksen yhteenveto on EPÄONNISTUI, jossa yksittäisten kirjastojen QC-mittaritulokset ilmoitetaan ND:nä, kaikkien näytteiden osalta konsolidoidussa raportissa, jossa sekvensoinnin laadunvalvontatuloksen yhteenveto on HYVÄKSYTTY	Luomisajon aikana määritetty indeksisovitinsarja ei ole yhdenmukainen sen kanssa, jota käytettiin kirjaston valmistuksen aikana	Tarkastele näytteissä analyysissä käytettyjä indeksitietoja kohdassa IRM. Jos korjausta tarvitaan, katso kohtaa Requeue Analysis kohdassa TruSight Whole Genome Analysis Application -opas (asiakirjanro 200049931).

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpite
FASTQ laadunvalvonta epäonnistuu yhden tai useamman näytteen osalta ilman alhaista suorituskapasiteettia; ei-indeksoitu saanto (GB) $\geq 2\ 800$ Gt S4:llä tai $\geq 1\ 000$ Gt S2:lla	FASTQ laadunvalvontatuloksen yhteenveto ja näytekirjaston laadunvalvontatuloksen yhteenveto on FAIL, jossa yksittäisten kirjastojen QC-mittaritulokset ilmoitetaan ND:nä, yhden tai useamman näytteen osalta, mutta ei kaikkien näytteiden osalta konsolidoidussa raportissa ilman matalaa ajotulosta	Kirjaston valmistelun tai yhdistämisen aikana tapahtuneet käyttövirheet	<p>Arvioi lopullisessa kirjastokilvessä (FLP) jäljellä oleva tilavuus (jäännökset) ja varmista, että yhdistetyistä kirjastoista jätettyjä näytteitä ei käytetä. Äänenvoimakkuuden ansiosta käyttäjä voi muodostaa yhteyden uudelleen ja järjestää sen uudelleen jopa kerran. Vaihtoehtoisesti ota epäonnistuneet näytteet uudelleen seuraavaan kirjaston esivalmistuserään ja suorita ne sen jälkeen, kun <a href="#">Käyttöohjeet sivulla 15</a>.</p> <p>Vaihtoehtoisesti arvioi yksittäisten kirjastojen riittoisuudet FLP:ssä qPCR:llä <math>\geq 0,94</math> nM:n (oletuksena 450 bp:n pakkausselosteen koko) osalta kirjaston valmisteluun ja sekvensointiin liittyvien ongelmien sulkemiseksi pois. Ota epäonnistuneet näytteet uudelleen seuraavaan kirjaston esivalmistuserään ja suorita ne sen jälkeen, kun <a href="#">Käyttöohjeet sivulla 15</a>. Kirjaston eri valmisteluerien kirjastoja ei suositella yhdistettäväksi erien välisten saantojen vaihteluiden vuoksi, jotka voivat johtaa suurempaan %:iin CV:tä ja suurempaan epäonnistumiseen keskimääräisessä autosomaalisessa kattokyvyssä.</p>

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpite
FASTQ laadunvalvonta epäonnistuu joissakin näytteissä, joissa ei ole alhaista käyttökapasiteettia; ei-indeksoitu kokonaissaanto (GB) alhainen, < 2 800 Gt S4:llä tai < 1 000 Gt S2:lla	FASTQ laadunvalvontatuloksen yhteenveto ja näytekirjaston laadunvalvontatuloksen yhteenveto on EPÄONNISTUI, jossa yksittäisten kirjastojen QC-mittaritulokset ilmoitetaan ND:nä, yhden tai useamman mutta ei kaikkien näytteiden osalta konsolidoidussa raportissa, jossa on alhainen ajotulos	Saattaa viitata kirjaston valmisteluun tai sekvensointiin liittyvään ongelmaan	<p>Arvioi yksittäisten kirjastojen saannot FLP:ssä qPCR:llä <math>\geq 0,94</math> nM:n (oletuksena 450 bp:n pakkauselosteen koko) osalta kirjaston valmisteluun ja sekvensointiin liittyvien ongelmien sulkemiseksi pois</p> <p>Jos epäilet sekvensointiongelmaa, katso NovaSeq 6000Dx Instrument tekninen dokumentaatio (asiakirjanro 200010105). Ongelman ratkaisemisen jälkeen kirjastot voidaan yhdistää uudelleen ja järjestää uudelleen enintään kerran (tilavuuden vuoksi).</p> <p>Jos kirjaston valmisteluongelmaa epäillään, tutustu <a href="#">Vinkkejä ja tekniikoita sivulla 12</a> sekä <a href="#">Käyttöohjeet sivulla 15</a> ennen kirjaston valmistelun ja sekvensoinnin toistamista. Jos virheitä esiintyy toistuvasti, ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen.</p>

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpite
Kirjaston laadunvalvonta epäonnistuu vähäisen katealueen vuoksi	Yhteenveto näytekirjaston laadunvalvonnan tuloksesta EPÄONNISTUI yhdelle tai useammalle näytteelle konsolidoidussa raportissa keskimääräisen autosomaalisen peiton ja/tai autosomin prosenttiosuuden vuoksi, kun peitto on yli 20X, ja/tai genomien keskimääräisen mitokondrian peitto ei läpäissyt analyttisiä määrittämiä	Näytteen laadun tai kirjaston valmisteluongelma(t)	<p>Suorita uudelleenkvantifiointi prosessin säätimillä DNA:n syöttöön liittyvien ongelmien poissulkemiseksi.</p> <p>Tarkista <a href="#">Vinkkejä ja tekniikoita sivulla 12</a> ja <a href="#">Käyttöohjeet sivulla 15</a> ennen epäonnistuneen näytteen (epäonnistuneiden näytteiden) jonottamista seuraavassa kirjaston valmisteluerässä ja ajossa. Jos samalle näytteelle (näytteille) esiintyy toistuvasti vika (viat), tämä voi olla merkki näytteen laatuongelmasta (-ongelmista).</p> <p>Jos vika havaitaan uudelleen, mutta eri näytteillä, tämä voi viitata kirjaston valmisteluun liittyvään ongelmaan, joka liittyy käyttäjään, reagenssiin, tarvike- tai laitteistoon. Jos ongelma jatkuu, ota yhteyttä Illumina tekniseen tukeen.</p>

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpite
Kirjaston laadunvarmistus epäonnistuu GC:n ennakoasenteen perusteella	Yhteenveto näytekirjaston laadunvalvonnan tuloksesta EPÄONNISTUI yhdelle tai useammalle näytteelle konsolidoidussa raportissa johtuen normalisoidusta peittoalueesta 60–79 %:n GC-astioissa ja/tai normalisoidusta peittokyvystä 20–39 %:n GC-astioissa, jotka eivät läpäise analyttisiä määrittämiä	Liiallinen ELM:n kantaminen yli tai ylittäminen aiheuttaa GC:n ennakkoluuloja peittoalueella	Tarkista <a href="#">Vinkkejä ja tekniikoita sivulla 12</a> ja <a href="#">Käyttöohjeet sivulla 15</a> ennen epäonnistuneen näytteen (epäonnistuneiden näytteiden) jonottamista seuraavassa kirjaston valmisteluerässä ja ajossa.
Kirjaston laadunvarmistus epäonnistuu yhden tai useamman näytteen saastumisen perusteella, mutta ei kaikkien ajon näytteiden osalta	Yhteenveto näytekirjaston laadunvalvonnan tuloksesta EPÄONNISTUI yhdelle tai useammalle, mutta ei kaikille näytteille konsolidoidussa raportissa, koska arvioitu näytekontaminaatio ei läpäissyt analyttistä määrittämiä	Kontaminoitunut näyte (näytteet) tai ei muuttanut vinkkejä näytteen tai kirjaston valmistelun aikana	Tarkista <a href="#">Vinkkejä ja tekniikoita sivulla 12</a> ja <a href="#">Käyttöohjeet sivulla 15</a> ennen epäonnistuneen näytteen (epäonnistuneiden näytteiden) jonottamista seuraavassa kirjaston valmisteluerässä ja ajossa. Jos samalle näytteelle (näytteille) esiintyy toistuvasti vika (vikoja), näytteen DNA voi olla kontaminoitunut.



Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpiteet
Kirjaston laadunvarmistus epäonnistuu kontaminaation perusteella kaikkien ajossa olevien näytteiden osalta	Yhteenveto Näytekirjaston laadunvalvontaan liittyvä tulos ilmoitetaan EPÄONNISTUNEENA kaikkien näytteiden osalta konsolidoidussa raportissa, koska arvioitu näytekontaminaatio ei läpäissyt analyttistä spesifikaatiota	Saastunut reagenssi tai kärkiä ei vaihdettu näytteen laimennuksen tai kirjaston valmistuksen aikana	Tarkista <a href="#">Vinkkejä ja tekniikoita sivulla 12</a> kontaminaation välttämiseksi. Pyydä epäonnistuneita näytteitä seuraavassa kirjaston valmisteluerässä ja aja käyttämällä tuoreita näytteen laimennuksia ja kirjaston valmistelupakkausta.
ND Yhteenveto Ploidiatulos	Yhteenveto Ploidiatuloksesta, joka raportoitii ND:nä (määrittelemätön) konsolidoidussa raportissa	Sukupuoli listattiin tuntemattomaksi luonnin aikana	Vahvista, että ”tarjottu sukupuolikromosomiploidia” konsolidoidussa raportissa oli ”tuntematon”. On suositeltavaa luetella sukupuoli ”mies” tai ”nainen” näytetiedoissa, kun se tunnetaan Luontiajon aikana.
		DRAGEN raportoi muun kuin XX:n tai XY:n sukupuoliploidisen tuloksen, kuten X0:n tai XXY:n	Tarkista ”Käytännön arviointi” -tulos DRAGEN konsolidoidusta raportista.

Kudostyyppi	Havainto	Mahdollinen syy	Suosittelut toimenpite
ERILAINEN yhteenveto Ploidiatuloksesta	Yhteenveto ploidiatuloksesta, joka raportoitiin ERILAISENA konsolidoidussa raportissa.	Mahdollinen näytteenvaihto-ongelma	Tarkista, että luontiajon aikana annetut näytetiedot olivat oikein. Jos analyysi on virheellinen, analyysi on käynnistettävä uudelleen muutosten kanssa. Jos analyysi on oikein ja epäillään näytteenvaihto-ongelmaa, suositellaan, että DISCORDANT näyte (ERILAISET näytteet) lähetetään uudelleen seuraavaan kirjaston esivalmistuserään ja ajetaan uudelleen, jotta vältetään väärin tulosten raportointi. Näyteohjelmisto ei pakota epäonnistumaan näytettä, jonka yhteenvetoploidiatulos on DISCORDANT (ERILAINEN).

## Lähdeviitteet

1. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 2003;34(4):460-463. doi: 10.1038/ng1207.
2. Chen X, Sanchis-Juan A, French CE, et al. Spinal muscular atrophy diagnosis and carrier screening from genome sequencing data. *Genet Med.* 2020;22(5):945-953. doi: 10.1038/s41436-020-0754-0.
3. Prior TW. Perspectives and diagnostic considerations in spinal muscular atrophy. *Genet Med.* 2010;12(3):145-52. doi: 10.1097/GIM.0b013e3181c5e713.
4. The 1000 Genomes Project Consortium. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526:68-74. doi: <https://doi.org/10.1038/nature15393>.
5. Halman A, Dolzhenko E, Oshlack A. STRipy: A graphical application for enhanced genotyping of pathogenic short tandem repeats in sequencing data. *Hum Mutat.* 2022;43(7):859-868. doi: 10.1002/humu.24382. Epub 21.4.2022 PMID: 35395114; PMCID: PMC9541159.
6. Ibañez K, Polke J, Hagelstrom RT, Dolzhenko E, et al. Whole genome sequencing for the diagnosis of neurological repeat expansion disorders in the UK: a retrospective diagnostic accuracy and prospective clinical validation study. *Lancet Neurol.* 2022;21(3):234-245. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00462-2. PMID: 35182509; PMCID: PMC8850201.
7. Sequeiros J, Seneca S, Martindale J. Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of *spinocerebellar ataxias*. *Eur J Hum Genet.* 2010;18(11):1188-95. doi: 10.1038/ejhg.2010.10. Epub 24.2.2010 PMID: 20179748; PMCID: PMC2987480.
8. Perlman S. Hereditary Ataxia Overview. 28.10.1998 [päivitetty 16.11.2023]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., eds. *GeneReviews*. Seattle (WA): Washingtonin yliopisto, Seattle; 1993-2024. PMID: 20301317.
9. Gijssels I, Van Mossevelde S, van der Zee J, et al. The C9orf72 repeat size correlates with onset age of disease, DNA methylation and transcriptional downregulation of the promoter. *Mol Psychiatry.* 2016;21(8):1112-24. doi: 10.1038/mp.2015.159. Epub 20.10.2015. PMID: 26481318; PMCID: PMC4960451.
10. DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, et al. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron.* 2011;72(2):245-56. doi: 10.1016/j.neuron.2011.09.011. Epub 21.9.2011. PMID: 21944778; PMCID: PMC3202986.
11. Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, et al. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science.* 2001;293(5531):864-7. doi: 10.1126/science.1062125. PMID: 11486088.
12. Lalioti MD, Scott HS, Antonarakis SE. What is expanded in progressive myoclonus epilepsy? *Nat Genet.* 1997;17(1):17. doi: 10.1038/ng0997-17. PMID: 9288090.
13. Joensuu T, Lehesjoki AE, Kopra O. Molecular background of EPM1-Unverricht-Lundborg disease. *Epilepsia.* 2008 ;49(4):557-63. doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01422.x. Epub 19.11.2007. PMID: 18028412.
14. Kamsteeg EJ, Kress W, Catalli C, et al. Best practice guidelines and recommendations on the molecular diagnosis of myotonic dystrophy types 1 and 2. *Eur J Hum Genet.* 2012;20(12):1203-8. doi: 10.1038/ejhg.2012.108. Epub 30.5.2012. PMID: 22643181; PMCID: PMC3499739.

15. Biancalana V, Glaeser D, McQuaid S, Steinbach P. EMQN best practice guidelines for the molecular genetic testing and reporting of fragile X syndrome and other fragile X-associated disorders. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(4):417-25. doi: 10.1038/ejhg.2014.185. Epub 17.9.2014. PMID: 25227148; PMCID: PMC4666582.
16. Dolzhenko E, Deshpande V, Schlesinger F, et al. ExpansionHunter: a sequence-graph-based tool to analyze variation in short tandem repeat regions. *Bioinformatics.* 2019;35(22):4754-4756. doi: 10.1093/bioinformatics/btz431. PMID: 31134279; PMCID: PMC6853681.
17. van Kuilenburg ABP, Tarailo-Graovac M, Richmond PA, et al. Glutaminase Deficiency Caused by Short Tandem Repeat Expansion in GLS. *N Engl J Med.* 2019;380(15):1433-1441. doi: 10.1056/NEJMoa1806627. PMID: 30970188; PMCID: PMC8819703.
18. Losekoot M, van Belzen MJ, Seneca S, et al; European Molecular Genetic Quality Network (EMQN). EMQN/CMGS best practice guidelines for the molecular genetic testing of Huntington disease. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(5):480-6. doi: 10.1038/ejhg.2012.200. Epub 19.9.2012. PMID: 22990145; PMCID: PMC3641377.
19. Holmes SE, O'Hearn E, Rosenblatt A, et al. A repeat expansion in the gene encoding junctophilin-3 is associated with Huntington disease-like 2. *Nat Genet.* 2001;29(4):377-8. doi: 10.1038/ng760. Virheellinen julkaisussa: *Nat Genet* 2002 tammikuu;30(1):123. PMID: 11694876.
20. Kobayashi H, Abe K, Matsuura T, et al. Expansion of intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. *Am J Hum Genet.* 2011;89(1):121-30. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.05.015. Epub 16.6.2011. PMID: 21683323; PMCID: PMC3135815.
21. García-Murias M, Quintáns B, Arias M, et al. 'Costa da Morte' ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization. *Brain.* 2012;135(Pt 5):1423-35. doi: 10.1093/brain/aws069. Epub 3.4.2012 PMID: 22492559; PMCID: PMC3338928.
22. Ishiura H, Shibata S, Yoshimura J, et al. Noncoding CGG repeat expansions in neuronal intranuclear inclusion disease, oculopharyngodistal myopathy and an overlapping disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1222-1232. doi: 10.1038/s41588-019-0458-z. Epub 22.7.2019. PMID: 31332380.
23. Sone J, Mitsuhashi S, Fujita A, et al. Long-read sequencing identifies GGC repeat expansions in NOTCH2NLC associated with neuronal intranuclear inclusion disease. *Nat Genet.* 2019;51(8):1215-1221. doi: 10.1038/s41588-019-0459-y. Epub 22.7.2019. PMID: 31332381.
24. Amiel J, Laudier B, Attié-Bitach T, et al. Polyalanine expansion and frameshift mutations of the paired-like homeobox gene PHOX2B in congenital central hypoventilation syndrome. *Nat Genet.* 2003;33(4):459-61. doi: 10.1038/ng1130. Epub 17.3.2003. PMID: 12640453.

# Liite A

## S4-indeksijoukko 1

Indeksilevyn kuopan tunnus	Indeksin nimi	i7 Pohjat	i5 Pohjat
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACCTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG
G01	UDP0043	CCATCTCGCC	TTCTATGGTT
H01	UDP0044	CTGCGAGCCA	AATCCGGCCA
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA
G02	UDP0071	CTTGTACACC	AAGCGCGCTT
H02	UDP0072	ACACAGGTGG	TGAGCGTTGT

## S4-indeksijoukko 2

Indeksilevyn kuopan tunnus	Indeksin nimi	i7 Pohjat	i5 Pohjat
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT

Indeksilevyn kuopan tunnus	Indeksin nimi	i7 Pohjat	i5 Pohjat
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC
G03	UDP0087	CCTCTACATG	GATACCTCCT
H03	UDP0088	GGAGCGTGTA	ATCCGTAAGT
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG
G04	UDP0095	GTATTCCACC	ATGTAGACAA
H04	UDP0096	CCTCCGTCCA	CACATCGGTG

## S2-indeksijoukko 1

Indeksilevyn kuopan tunnus	Indeksin nimi	i7 Pohjat	i5 Pohjat
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAACTGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG

## S2-indeksijoukko 2

Indeksilevyn kuopan tunnus	Indeksin nimi	i7 Pohjat	i5 Pohjat
A02	UDP0065	TAATGTGTCT	GTAAGGCATA
B02	UDP0066	ATACCAACGC	AATTGCTGCG
C02	UDP0067	AGGATGTGCT	TTACAATTCC
D02	UDP0068	CACGGAACAA	AACCTAGCAC
E02	UDP0069	TGGAGTACTT	TCTGTGTGGA
F02	UDP0070	GTATTGACGT	GGAATTCCAA

## S2-indeksijoukko 3

Indeksilevyn kuopan tunnus	Indeksin nimi	i7 Pohjat	i5 Pohjat
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC

## S2-indeksijoukko 4

Indeksilevyn kuopan tunnus	Indeksin nimi	i7 Pohjat	i5 Pohjat
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG

## Liite B

Lisälaskelmat vaihtoehdolle 1: 280 ng DNA-syöttö Quant- ja Qubit - kvantifiointimenetelmille

**DNA-varastopitoisuuden 11,2–154,0 ng/μl pitoisuusrajojen laskenta:**

Vähimmäispitoisuus perustuu 280,0 ng:n DNA-tuloon / 25,0 μl:n tilavuuteen = 11,2 ng/μl.

Perustuu pipetoinnin vähimmäistilavuuteen 2,0 μl, enimmäispitoisuus on 280 ng\*1,1 (10 %:n ylijäämä) / 2,0 μl = 154,0 ng/μl, kokonaistilavuudessa 27,5 μl.

**Esimerkkilaskelmat 280,0 ng:n DNA-syötteellä**

Työstetty esimerkki DNA-varastopitoisuudelle = 95,0 ng/μl:

- DNA-kantatilavuus (μl) =  $280,0 \text{ ng} \times 1,1/95,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$ , pyöristyy 3,24 μl:aan tarkkaa pipetointia varten P-10:llä.
- Laimennetun DNA:n kokonaistilavuus on kiinteä 27,5 μl.
- RSB-tilavuus (μl) =  $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$ , pyöristyy 24,3 μl:aan tarkan pipetoinnin varmistamiseksi P-200:lla.

Työstetty esimerkki DNA-varastopitoisuudelle = 308,0 ng/μl:

- DNA-kantatilavuus (μl) on kiinteä 2,0 μl
- Laimennetun DNA:n kokonaistilavuus (μl) =  $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/11,2 \text{ ng}/\mu\text{l} = 55,0 \mu\text{l}$
- RSB-tilavuus (μl) =  $55,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 53,0 \mu\text{l}$

Lisälaskelmat vaihtoehdolle 2: 350 ng DNA-tulo Accuclear Ultra High Sensitivity Quantitation Method -kvantifiointimenetelmälle

**DNA-varastopitoisuuksien 14,0–192,5 ng/μl pitoisuusrajojen laskenta:**

Vähimmäispitoisuus perustuu 350,0 ng:n DNA-tuloon / 25,0 μl:n tilavuuteen = 14,0 ng/μl.

Perustuu pienimpään pipetointitulavuuteen 2,0 μl, enimmäispitoisuus on 350 ng\*1,1 (10 %:n ylijäämä) / 2,0 μl = 192,5 ng/μl.

**Esimerkkilaskelmat 350,0 ng:n DNA-syötteellä**

Työstetty esimerkki DNA-varastopitoisuudelle = 118,75 ng/μl:

- DNA-kantatilavuus (μl) =  $350,0 \text{ ng} \times 1,1/118,75 \text{ ng}/\mu\text{l} = 3,242 \mu\text{l}$ , pyöristyy 3,24 μl:aan tarkkaa pipetointia varten P-10:llä
- Laimennetun DNA:n kokonaistilavuus on kiinteä 27,5 μl.
- RSB-tilavuus (μl) =  $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$ , pyöristyy 24,3 μl:aan tarkan pipetoinnin varmistamiseksi P-200:lla.

Työstetty esimerkki DNA-varastopitoisuudelle = 308,0 ng/μl:



- DNA-kantatilavuus ( $\mu\text{l}$ ) on kiinteä 2,0  $\mu\text{l}$
- Laimennetun DNA:n kokonaistilavuus ( $\mu\text{l}$ ) =  $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l}/14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- RSB-tilavuus ( $\mu\text{l}$ ) =  $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

## Versiohistoria

Asiakirja	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
Asiakirja nro 200050132 v00.1	Toukokuu 2024	Korjattu syöttötilavuus Accuclear Ultra High Sensitivity - kvantitointimenetelmälle.
Asiakirja nro 200050132 v00	Huhtikuu 2024	Ensimmäinen versio.

## Pakkauseloste

### Patentit ja tavamerkit

Tämä asiakirja ja sen sisältö ovat Illumina, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden ("Illumina") omaisuutta, ja ne on tarkoitettu ainoastaan Illumina-yhtiön asiakkaiden sopimuskäyttöön tässä kuvattujen tuotteiden käyttöön liittyen eikä mihinkään muuhun tarkoitukseen. Tätä asiakirjaa ja sen sisältöä ei saa käyttää tai jakaa missään muussa tarkoituksessa ja/tai välittää, paljastaa tai jäljentää millään muulla tavoin ilman Illumina-yhtiöltä ennakoon saatua kirjallista lupaa. Illumina ei tällä asiakirjalla luovuta mitään käyttöoikeuksia sen patenti-, tavamerkki-, tekijänoikeus- tai tapaoikeuksien nojalla eikä vastaavien kolmansien osapuolten oikeuksien nojalla.

Tässä kuvattuja tuotteita saa käyttää vain pätevä ja asianmukaisesti koulutettu henkilökunta noudattamalla täsmällisesti tässä asiakirjassa annettuja ohjeita, jotta tuotteiden asianmukainen ja turvallinen käyttö voidaan taata. Asiakirjan sisältö on luettava ja ymmärrettävä kokonaisuudessaan ennen näiden tuotteiden käyttöä.

MIKÄLI KAIKKIA TÄSSÄ ANNETTUJA OHJEITA EI LUETA JA TÄSMÄLLISESTI NOUDATETA, SEURAUKSENA VOI OLLA TUOTTEIDEN VAURIOITUMINEN, HENKILÖVAHINKOJA JOKO KÄYTTÄJILLE TAI MUILLE JA MUITA OMAISUUSVAHINKOJA, MINKÄ LISÄKSI TUOTTEITA MAHDOLLISESTI KOSKEVAT TAKUUT MITÄTÖITYVÄT.

ILLUMINA EI OLE VASTUUSSA TÄSSÄ KUVATTUJEN TUOTTEIDEN VÄÄRINKÄYTÖSTÄ (MUKAAN LUKIEN TUOTTEEN OSAT JA OHJELMISTO).

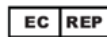
© 2024 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

Kaikki tavamerkit ovat Illumina, Inc:n tai niiden vastaavien omistajien omaisuutta. Tarkemmat tavamerkkikiedot ovat verkkosivustolla [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

### Yhteystiedot



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A.  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (Pohjois-Amerikan ulkopuolella)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

#### Rahoittaja Australiassa

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

### Tuotteiden merkinnät

Katso kaikkien tuotteen pakkauksessa ja merkinnöissä käytettyjen symbolien selitykset verkko-osoitteesta [support.illumina.com](http://support.illumina.com) käyttämäsi pakkauksen välilehdeltä *Documentation* (Dokumentaatio).