

Súprava reagensíí NextSeq™ 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov)

NA DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO

Katalógové č. 20028871

Zamýšľané použitie

Súprava reagensíí Illumina NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) je súprava reagensíí a spotrebného materiálu určená na sekvenovanie knižníc vzoriek pri použití s validovanými testami. Táto súprava je určená na použitie s prístrojom NextSeq 550Dx a analytickým softvérom.

Zásady postupu

Súprava reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) je špecializovaná jednorazová súprava reagensíí a spotrebného materiálu na sekvenovanie v prístroji NextSeq 550Dx. Súprava reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) používa ako vstup knižnicu vytvorenú z DNA, kde sa indexy vzoriek a zachytené sekvencie pripájajú k amplifikovaným cieľom. Knižnice vzoriek sa zachytávajú na prietokovom článku a sekvenujú sa v prístroji pomocou chémie sekvenovania syntézou (SBS, Sequencing by Synthesis). Chémia SBS používa metódu reverzibilného terminátora s cieľom detegovať fluorescenčne označené samostatné nukleotidové bázy pri ich začleňovaní do rastúcich vlákien DNA. Počet knižníc vzoriek závisí od multiplexovania podporovaného metódou „upstream“ prípravy knižnice.

V písomnej informácii pre používateľa *prístroja NextSeq 550Dx* sa uvádza návod na vykonávanie sekvenovania v prístroji NextSeq 550Dx.

Výkonnostné charakteristiky a obmedzenia postupu pre súpravu reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) sa stanovili pomocou modulov Germline Variant a Somatic Variant softvéru Local Run Manager.

Obmedzenia postupu

- 1 Na diagnostické účely *in vitro*.
- 2 Testovací softvér nezarovnáva čítania s indelmi (inzerciami, deléciami alebo kombináciami), ak je dĺžka obsahu > 25 párov báz (bp). V dôsledku toho testovací softvér nedokáže detegovať indely s dĺžkou > 25 bp.
- 3 Testovací softvér nemôže zarovnávať čítania amplikónov s extrémnym obsahom, v dôsledku čoho sa oblasť vykáže ako divoký typ. Takýto extrémny obsah zahŕňa:
 - ▶ Čítania obsahujúce viac ako tri indely.
 - ▶ Čítania s dĺžkou aspoň 30 bp s obsahom jednonukleotidového variantu (SNV) > 4 % celkovej cieľovej dĺžky amplikónu (okrem oblasti prób).
 - ▶ Čítania s dĺžkou < 30 bp s obsahom SNV > 10 % celkovej dĺžky amplikónu (vrátane oblasti prób).
- 4 Veľké varianty vrátane viacnukleotidových variantov (MNV) a veľkých indelov sa môžu vo výstupnom súbore VCF vykazovať ako samostatné menšie varianty.
- 5 Varianty delécií sa môžu pri premostení dvoch prekrývajúcich sa amplikónov filtrovať alebo vynechať, ak je dĺžka delécie rovná prekrytiu medzi prekrývajúcimi sa amplikónmi alebo väčšia ako toto prekrytie.
- 6 Ak sa indely nachádzajú tesne vedľa priméru a chyba prekrývajúci sa amplikón, systém nedokáže tieto indely detegovať. V prípade oblastí s prekrývajúcimi sa amplikónmi test nedokáže detegovať delécie, ak je oblasť prekrytia

- menšia ako veľkosť delécie, ktorá sa má detegovať. Napríklad ak oblasť prekrytia medzi dvoma susediacimi amplikónmi tvoria dve bázy, test nedokáže detegovať žiadne delécie zahŕňajúce obe tieto bázy. Deléciu jednej bázy v ktorejkoľvek z týchto báz je možné detegovať.
- 7 Rovnako ako pri inom pracovnom postupe prípravy knižnice na báze hybridizácie môžu základné polymorfizmy, mutácie, inzercie alebo delécie vo väzbových oblastiach oligonukleotidov ovplyvňovať alely, na ktoré sa zameriava próba, a následne stanovenia vykonané počas sekvenovania. Príklad:
 - ▶ Nemusí sa amplifikovať variant vo fáze s variantom v oblasti priméru, v dôsledku čoho sa získa falošne negatívny výsledok.
 - ▶ Varianty v oblasti priméru by mohli zabrániť amplifikácii referenčnej alely, v dôsledku čoho by sa nesprávne stanovil homozygotný variant.
 - ▶ Varianty indelov v oblasti priméru môžu spôsobovať falošne pozitívne stanovenie na konci čítania susediaceho s primérom.
 - 8 Ak sa indely nachádzajú v blízkosti konca jedného čítania a sú počas zarovnania tzv. soft-clipped (mierne zastrihnuté), tieto indely sa môžu filtrovať v dôsledku odchýlky vlákna.
 - 9 Malé MNV neboli validované a vykazujú sa len v module Somatic Variant.
 - 10 Delécie sa vo VCF vykážu na súradnici predchádzajúcej bázy podľa formátu VCF. Preto v prípade susediacich variantov treba pred nahlásením zvážiť, či je jednotlivé stanovenie báz homozygotná referencia.
 - 11 Obmedzenia špecifické pre germinálne varianty:
 - ▶ Prístroj NextSeq 550Dx používajúci modul Germline Variant softvéru Local Run Manager prístroja NextSeq 550Dx je určený na poskytovanie kvalitatívnych výsledkov na stanovenie germinálnych variantov (napr. homozygotných, heterozygotných, divokého typu).
 - ▶ Ak sa používa s modulom Germline Variant, minimálne pokrytie na amplikón potrebné na presné stanovenie variantov je 150x. V dôsledku toho sa vyžaduje 150 podporných fragmentov DNA, čo zodpovedá 300 prekryvajúcim sa čítaniam z oboch koncov. Na pokrytie má vplyv počet vzoriek a celkový počet cieľových báz. Na pokrytie môže mať vplyv obsah GC a iný genómový obsah.
 - ▶ Variácia v počte kópií môže ovplyvniť to, či sa variant identifikuje ako homozygotný alebo heterozygotný.
 - ▶ Varianty v určitom repetitívnom kontexte sa v súboroch VCF odfiltrujú. Ak sa celá sekvencia variantu alebo jej časť nachádza opakovane v referenčnom genóme vedľa pozície variantu, na filtrovanie variantov sa použije filter opakovania RMxN. V prípade stanovenia germinálnych variantov sa na filtrovanie variantu vyžaduje minimálne deväť opakovaní v referencii a zohľadňujú sa len opakovania s dĺžkou do 5 bp (R5x9).
 - ▶ Ak sa v jednom lokuse nachádza indel a SNV, môže to viesť k vykázaniu iba jedného variantu.
 - 12 Obmedzenia špecifické pre somatické varianty:
 - ▶ Prístroj NextSeq 550Dx používajúci modul Somatic Variant softvéru Local Run Manager prístroja NextSeq 550Dx je určený na poskytovanie kvalitatívnych výsledkov na stanovenie somatických variantov (napr. prítomnosť somatického variantu s frekvenciou variantu $\geq 0,026$ s limitom detekcie 0,05).
 - ▶ Ak sa používa modul Somatic Variant, minimálne pokrytie na amplikón potrebné na presné stanovenie variantov je 450x na pool oligonukleotidov. V dôsledku toho sa vyžaduje 450 podporných fragmentov DNA na pool oligonukleotidov, čo zodpovedá 900 prekryvajúcim sa čítaniam z oboch koncov. Na pokrytie má vplyv počet vzoriek a celkový počet cieľových báz. Na pokrytie môže mať vplyv obsah GC a iný genómový obsah.
 - ▶ V prípade stanovenia somatických variantov sa na filtrovanie variantu vyžaduje minimálne šesť opakovaní v referencii a zohľadňujú sa len opakovania s dĺžkou do 3 bp (R3x6).
 - ▶ Modul Somatic Variant nedokáže rozlišovať medzi germinálnymi a somatickými variantmi. Modul je určený na detekciu variantov v celom rozsahu frekvencií variantov, frekvenciu variantov však nie je možné použiť na odlíšenie somatických variantov od germinálnych variantov.
 - ▶ Normálne tkanivo vo vzorke ovplyvňuje detekciu variantov. Vykazovaný limit detekcie je založený na frekvencii variantov vzhľadom na celkovú DNA extrahovanú z nádorového aj normálneho tkaniva.

Komponenty súpravy reagensíí

Každý komponent súpravy reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) sa dodáva v samostatnej škatuli. Komponenty okamžite uskladnite pri uvedenej teplote, aby sa zabezpečil ich riadny výkon. Ďalej sa uvádza zoznam komponentov súpravy reagensíí.

Tabuľka 1 Komponenty súpravy reagensíí

Komponent	Množstvo	Plniaci objem	Opis	Skladovanie*
Kazeta s reagensiami NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cyklov)	1 každá	rôzny	reagencie na klastrovanie a sekvenovanie	-25 °C až -15 °C
Kazeta s pufrom NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cyklov)	1 každá	rôzny	pufre a preplachovací roztok	15 °C až 30 °C
Kazeta s prietokovými článkami NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cyklov)	1 každá	nie je k dispozícii	sklenená prietoková komôrka na jedno použitie s čítaním z oboch koncov	2 °C až 8 °C
Škatuľa s príslušenstvom NextSeq 550Dx Accessory Box (300 cyklov)	1 skúmavka	12 ml	Pufer na riedenie knižníc	-25 °C až -15 °C

*Kazeta s prietokovými komôrkami NextSeq 550Dx v2.5 (300 cyklov) sa prepravuje pri teplote okolia.

Číslo distribučných šarží

Súprava reagensíí má jedno číslo distribučnej šarže, ktoré sa považuje za číslo distribučnej šarže súpravy reagensíí. Na každej škatuli v súprave reagensíí je vytlačené číslo distribučnej šarže súpravy reagensíí. Na komponentoch súpravy reagensíí, ktoré sa nachádzajú vnútri škatúľ, sú vytlačené čísla distribučných šarží špecifické pre tieto komponenty, ktoré sa líšia od čísla distribučnej šarže súpravy reagensíí. Spotrebný materiál na sekvenovanie uchovávajte v pôvodných škatuliach až do jeho použitia, aby sa zachovalo spojenie s distribučnou šaržou súpravy. Podrobné informácie o číslach dielov a distribučných šarží reagensíí nájdete v certifikáte o analýze súpravy reagensíí.

Skladovanie a manipulácia

- Izbová teplota sa vymedzuje ako teplota od 15 °C do 30 °C.
- Komponenty súpravy reagensíí sú stabilné až do dátumu expirácie na štítku, pokiaľ sa skladujú pri predpísaných teplotách.
- Škatuľa s príslušenstvom prístroja NextSeq 550Dx a kazeta s reagensiami NextSeq 550Dx Reagent Cartridge sú stabilné počas maximálne jedného rozmrazenia na izbovú teplotu pred uplynutím stanoveného dátumu expirácie. Kazeta s reagensiami je po rozmrazení na izbovú teplotu vo vodnom kúpeli stabilná až 6 hodín. Prípadne sa kazeta s reagensiami môže pred použitím rozmraziť a 5 dní uchovávať pri teplote od 2 °C do 8 °C.
- Zmeny fyzického vzhľadu reagensíí môžu naznačovať znehodnotenie materiálu. Ak sa po premiešaní zmení fyzický vzhľad, napr. zjavne sa zmení farba reagensíí alebo sa objaví zjavný zákal v dôsledku mikrobiálnej kontaminácie, reagencie nepoužívajte.

Požadované vybavenie a materiály, ktoré sa predávajú samostatne

- ▶ Prístroj NextSeq 550Dx, katalógové č. 20005715

Varovania a preventívne opatrenia



UPOZORNENIE

Federálne zákony obmedzujú predaj, objednanie, používanie alebo objednanie používania tohto zariadenia na lekára alebo iného odborníka s licenciou podľa práva štátu, v ktorom vykonáva prax.

- Súprava reagensíí NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklov) obsahuje potenciálne nebezpečné chemikálie. K osobným zraneniam môže dôjsť v dôsledku vdychnutia, požitia, kontaktu s pokožkou a kontaktu

s očami. Noste ochranné prostriedky vrátane ochrany očí, rukavíc a laboratórneho plášťa, ktoré sú vhodné pre toto nebezpečenstvo vystavenia. S použitými reagensiami manipulujte ako s chemickým odpadom a likvidujte ich v súlade s platnými regionálnymi, národnými a miestnymi zákonmi a predpismi.

- 2 Informácie týkajúce sa ochrany životného prostredia, zdravia a bezpečnosti nájdete v karte bezpečnostných údajov na stránke support.illumina.com/sds.html.
- 3 Akékoľvek závažné nehody súvisiace s týmto produktom okamžite nahláste spoločnosti Illumina a príslušným orgánom členských štátov, v ktorých má používateľ a pacient sídlo.
- 4 Nedodržanie uvedených postupov môže viesť k chybným výsledkom alebo výraznému zníženiu kvality vzorky.
- 5 Používajte bežné laboratórne preventívne opatrenia. Nepipetujte ústami. V určených pracovných priestoroch nejedzte, nepite a nefajčite. Pri manipulácii so vzorkami a testovacími reagensiami používajte jednorazové rukavice a laboratórny plášť. Po manipulácii so vzorkami a testovacími reagensiami si dôkladne umyte ruky.
- 6 Vyžaduje sa dodržiavanie správnych laboratórnych postupov a správnej laboratórnej hygieny s cieľom zabrániť kontaminácii reagensíí, nástrojov a vzoriek genómovej DNA produktmi PCR. Kontaminácia produktmi PCR môže viesť k nepresným a nespoľahlivým výsledkom.
- 7 Aby sa zabránilo kontaminácii, priestory pred amplifikáciou a po amplifikácii musia mať jednoúčelové vybavenie (napr. pipety, pipetové špičky, vortexer a centrifúga).

Návod na použitie

Pozrite písomnú informáciu pre používateľa *prístroja NextSeq 550Dx* a príslušné referenčné príručky.

Výkonnostné charakteristiky

Pozrite písomnú informáciu pre používateľa *prístroja NextSeq 550Dx*.

História revízií

Dokument	Dátum	Opis zmeny
Dokument č. 1000000073349 v03	November 2021	Pridané vyhlásenie o upozorneniach a preventívnych opatreniach pri ohlasovaní závažných nehôd. Pridaná tabuľka História revízií.

Patenty a ochranné známky

Tento dokument a jeho obsah sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. a jej pridružených spoločností (ďalej len „Illumina“) a sú určené výlučne na zmluvné použitie u zákazníka v súvislosti s používaním produktu (produktov) opísaného (opísaných) v tomto dokumente a na žiadny iný účel. Tento dokument a jeho obsah sa nesmú používať ani šíriť na žiadny iný účel a/alebo inak poskytovať, zverejňovať alebo reprodukovat' akýmkoľvek spôsobom bez predchádzajúceho písomného súhlasu spoločnosti Illumina. Spoločnosť Illumina týmto dokumentom neposkytuje žiadnu licenciu na základe patentu, ochrannej známky, autorských práv alebo práv podľa zvykového práva, či podobných práv tretích strán.

Pokyny v tomto dokumente musia byť prísne a výslovne dodržiavané kvalifikovaným a riadne vyškoleným personálom, aby sa zabezpečilo správne a bezpečné používanie tu opísaného produktu (produktov). Pred použitím takéhoto produktu (produktov) je nutné prečítať si celý obsah tohto dokumentu s porozumením.

NEPREČÍTANIE VŠETKÝCH POKYNOV TU OBSIAHNUTÝCH A ICH VÝSLOVNÉ NEDODRŽANIE MÔŽE MAŤ ZA NÁSLEDOK POŠKODENIE PRODUKTU (PRODUKTOV), ZRANENIE OSOBY VRÁTANE POUŽÍVATEĽOV ALEBO INÝCH OSÔB, POŠKODENIE ĎALŠIEHO MAJETKU A ZRUŠENIE PLATNOSTI ZÁRUKY VZŤAHUJÚCEJ SA NA PRODUKT (PRODUKTY).

SPOLOČNOSŤ ILLUMINA NEPREBERÁ ŽIADNU ZODPOVEDNOSŤ VYPLÝVAJÚCU Z NEBEZPEČNÉHO POUŽITIA TU OPÍSANÉHO PRODUKTU (PRODUKTOV) (VRÁTANE SÚČASTÍ ALEBO SOFTVÉRU).

© 2021 Illumina, Inc. Všetky práva vyhradené.

Všetky ochranné známky sú vlastníctvom spoločnosti Illumina, Inc. alebo príslušných vlastníkov. Informácie o konkrétnych ochranných známkach nájdete na stránke www.illumina.com/company/legal.html.

Kontaktné informácie



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (okrem Severnej Ameriky)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Austrálsky zadávateľ

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

Označenie produktu

Úplné informácie o symboloch, ktoré sa môžu nachádzať na obale a označení produktu, nájdete vo vysvetlivkách symbolov pre vašu súpravu na stránke support.illumina.com.