

## Packungsbeilage

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK.

## Beabsichtigter Verwendungszweck

TruSight™ Whole Genome ist ein qualitatives *In-vitro*-Diagnostikum, das für die Sequenzierung des gesamten Genoms und den Nachweis von Einzelnukleotidvarianten, Insertionen/Deletionen, Kopienzahlvarianten, Homozygotie-Läufen, kurzen Tandem-Wiederholungsexpansion und mitochondrialen Variationen in menschlicher genomischer DNA, die aus Blut extrahiert wird, bestimmt ist.

TruSight Whole Genome enthält die TruSight Whole Genome Dx Library Prep mit UD-Indizes und die TruSight Whole Genome Analysis Application-Software. Das Produkt ist für die Verwendung mit kompatiblen Downstream-Keimbahnanwendungen zur Entwicklung von *In-vitro*-Diagnoseassays sowie zur Verwendung durch qualifiziertes Laborpersonal und Assayentwicklern vorgesehen.

TruSight Whole Genome ist für die Verwendung mit NovaSeq™ 6000Dx Instrument vorgesehen.

## Zusammenfassung und Erläuterung

TruSight Whole Genome ist ein Sequenzierungsassay der nächsten Generation, der eine tagmentierungsbasierte PCR-freie Bibliotheksvorbereitung verwendet, beginnend mit genomischer DNA (gDNA), die aus peripherem Vollblut extrahiert wurde, mit anschließender Sequenzierung und Primäranalyse auf dem Illumina® NovaSeq 6000Dx Instrument.

Die sekundäre Analyse wird mit der TruSight Whole Genome Analysis Application-Software durchgeführt, die im erforderlichen Illumina DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx enthalten ist, und umfasst das Demultiplexing, das Alignment auf das menschliche Referenzgenom GrCh38/hg38 und Varianten-Calling sowie eine Annotation und die Anwendung der in [Tabelle 1](#) dargestellten Metrikspezifikationen zur Qualitätskontrolle (QC) zur Sicherstellung der analytischen Leistung. Die Ausgaben des Assays umfassen QC-Berichte zu Lauf und Proben sowie genomische Dateien im Variant Call Format (VCF) zur Verwendung mit einer kompatiblen nachgelagerten tertiären Analyse- und Berichtssoftware.

TruSight Whole Genome wertet genomische Varianten in sämtlichen codierenden und nicht codierenden Regionen des menschlichen Genoms aus. Die Auswertung der Varianten umfasst die Erkennung kleiner Varianten, Kopienzahlvarianten (CNVs), Homozygotie-Läufe (ROH) und Short Tandem Repeat (STR)-Erweiterungen. TruSight Whole Genome erkennt außerdem, wenn das SMN1 c.840C-Allel fehlt (NM\_000344.3:c.840C>T), was auf eine SMN1-Gen-Deletion oder SMN1/SMN2-Genkonversion hindeuten könnte.<sup>1,2</sup> Der biallelische Verlust des SMN1 c.840C-Allels ist für etwa 95 % der Fälle von spinaler Muskelatrophie (SMA) verantwortlich.<sup>3</sup>

[Tabelle 2](#) enthält Informationen zu den Variantentypen, die mit TruSight Whole Genome validiert wurden.

Tabelle 1 TruSight Whole Genome Qualitätsmetrik-Spezifikationen

Ausgabetyp	Metrik	Spezifikation
Sequenzierungslauf-QC	Gesamt % $\geq$ Q30	$\geq 85,0$
FASTQ-QC	Ergebnis pro Probe (bps)	$\geq 90.000.000.000$
Probenbibliotheks-QC	Durchschnittliche Autosomen-Coverage	$\geq 35,0$
	Autosomen % mit einer Coverage über 20X	$\geq 93,94$
	Normalisierte Coverage bei 60 % bis 79 % der GC-Klassen	$0,82 \leq x \leq 1,13$
	Normalisierte Coverage bei 20 % bis 39 % der GC-Klassen	$0,97 \leq x \leq 1,06$
	Durchschnittliche Mitochondrien-Coverage	$\geq 500,0$
	Prozent der Q30-Basen	$\geq 85,0$
	Geschätzte Probenkontamination	$\leq 0,005$

Tabelle 2 Nachgewiesene Varianten validiert mit TruSight Whole Genome

Variantentyp	Validierter Variatennachweis
Kleine Varianten	Einzelne Nukleotidvarianten (SNVs), kurze Insertionen/Deletionen (1-31 bp)
Kopienzahlvarianten (CNVs)	$\geq 10$ kb Zunahmen und Verluste
Homozygotie-Läufe (ROH)	$\geq 500$ kb
Mitochondriale SNV	% Heteroplasmie, wenn $\geq 4,75$ %
Short Tandem Repeat (STR)-Erweiterungen	Ziel-Loci (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 und TBP)
SMN1-Variante	NM_000344.3:c.840C/T

## Verfahrensprinzipien

TruSight Whole Genome ist für die Vorbereitung von PCR-freien Bibliotheken zur Erzeugung von Whole-Genome-Sequencing-Daten vorgesehen. Der Assay beginnt mit der Vorbereitung von Bibliotheken aus quantifizierter genomischer DNA, die aus peripherem menschlichen Vollblut extrahiert wurde, und umfasst Sequenzierung und Analyse auf dem NovaSeq 6000Dx Instrument mit der TruSight Whole Genome Analysis Application und endet mit dem Calling und der Annotation von Varianten.

Das TruSight Whole Genome-Assay-Verfahren besteht aus den folgenden Schritten:

- **Batchplanung und Lauferstellung:** Es wird dringend empfohlen, den Batch und die Läufe vor Beginn der Bibliotheksvorbereitung zu planen. Bis zu 24 Probenbibliotheken können in einem Bibliotheksvorbereitungs-Batch vorbereitet werden. Basierend auf der Anzahl der Proben können verschiedene Fließzell-Konfigurationen verwendet werden (6-Plex auf S2 und 16-Plex auf S4). Die Bibliotheksröhrchen-ID, die Probenamen und die entsprechende Indizierung werden während der Laufplanung und -erstellung aufgezeichnet. Weitere Informationen zur Lauferstellung finden Sie unter TruSight Whole Genome Analysis Application Handbuch (Dokument-Nr. 200049931). Befolgen Sie den geplanten Batch während der Ausführung des Bibliotheksvorbereitungs-Workflows.
- **Vorbereitung für Protokoll:** Einige Reagenzien sind eingefroren und müssen auf Raumtemperatur gebracht werden. Aufgrund des kurzen Workflows ist es möglich, am selben Tag die Vorbereitung abzuschließen und mit der Sequenzierung zu beginnen. Somit können auch Verbrauchsmaterialien der Sequenzierung für geplante Läufe in diesem Schritt aufgetaut werden. Quantifizierte genomische DNA-Proben werden aufgetaut und für eine optimierte DNA-Zugabe verdünnt.
- **Bibliotheksvorbereitung**
  - **Genomische DNA-Tagmentierung:** Verwendet PCR-freie Bead-Linked Transposomes (BLT-PF), um die DNA-Zugabe zu tagmentieren. Während der Tagmentierung wird gDNA fragmentiert, mit Adaptern getagged und auf der Oberfläche magnetischer BLT-PF-Beads gebunden.
  - **Reinigung nach der Tagmentierung:** Reinigt die mit einem Adapter getaggte DNA auf dem BLT-PF und entfernt den Stopppuffer, um sie auf die Ligation-Indizes vorzubereiten.
  - **Ligation der Indizes:** Fügt Bibliotheken eindeutige doppelte Indizes für das Multiplexing hinzu. Erweitert die Lücken und eluiert einsträngige DNA-Bibliotheken von Beads.
  - **Größenauswahl und Bereinigung von Bibliotheken:** Ein Mikropartikelreinigungsverfahren mit beidseitiger Größenauswahl entfernt zu kleine und zu große Fragmente, um eine mediane Fragmentlänge von ca. 450 bp, Bereich ~360 bis 550 bp, zu erreichen.
  - **Poolen und Denaturieren von Bibliotheken:** Die Selbstnormalisierungsfunktion von BLT-PF ermöglicht das Poolen nach Volumen ohne qPCR oder andere Normalisierung. Das angegebene Volumen jeder Bibliothek wird gemäß dem Plan für jeden Lauf gepoolt und mit 0,2 N NaOH denaturiert (verdünntes HP3). Der denaturierte Pool wird dann mit der ID, die dem geplanten Lauf entspricht, in das NovaSeq 6000Dx-Bibliotheksröhrchen übertragen.
- **Sequenzierung und Analyse:** Verbrauchsmaterialien in der S2- und/oder S4-Konfiguration werden auf den NovaSeq 6000Dx Instrument geladen, einschließlich des oder der zugehörigen NovaSeq 6000Dx-Bibliotheksröhrchen mit den gepoolten Bibliotheken. Nach dem Laden wird die Bibliotheksröhrchen-ID gescannt und, wenn sie während der Laufplanung eingegeben wird, verwendet, um den entsprechenden geplanten Lauf auszuwählen. Andernfalls muss der zugehörige geplante Lauf manuell ausgewählt werden. Gepoolte Bibliotheken werden auf einer Fließzelle geclustert und dann mittels SBS-Chemie (Sequencing by Synthesis) auf dem NovaSeq 6000Dx sequenziert. Die SBS-Chemie verwendet eine Methode mit reversiblen Terminatoren, um einzelne, mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Nukleotidbasen zu erkennen, die in wachsende DNA-Stränge eingebaut sind.

Die Software Real-Time Analysis (RTA) führt die Primäranalyse durch, die das Base-Calling und die Zuweisung eines Qualitäts-Score zu jedem Base-Call umfasst. Die Daten aus der Primäranalyse werden automatisch an den Illumina DRAGEN-Server übertragen.

Das Demultiplexing und die DRAGEN-Analyse werden automatisch mithilfe der TruSight Whole Genome Analysis Application durchgeführt. Im Rahmen dieser Analyse wird jeder Lauf und jede Probenbibliothek anhand der in [Qualitätskontrollen auf Seite 34](#) beschriebenen analytischen Metriken auf ihre Gültigkeit überprüft und die Ergebnisse dann in konsolidierten und individuellen Probenberichten bereitgestellt. Für gültige Probenbibliotheken werden genomische Dateien im Variant Call Format (VCF) mit Annotationen generiert. Weitere Informationen zum Analyse-Workflow finden Sie unter TruSight Whole Genome Analysis Application Handbuch (Dokument-Nr. 200049931).

## Einschränkungen des Verfahrens

- Für die *In-vitro*-Diagnostik.
- TruSight Whole Genome ist kompatibel mit genomischer DNA, die aus menschlichem peripherem Vollblut gewonnen wird.
- Der Assay enthält keine Reagenzien für die DNA-Extraktion oder -Quantifizierung. Die analytischen Testergebnisse, einschließlich auf [Störende Substanzen auf Seite 42](#), wurden mittels Vollblut unter Verwendung repräsentativer DNA-Extraktionskits und DNA-Quantifizierungskits erzielt. Für alle diagnostischen Tests, die für die Verwendung mit TruSight Whole Genome entwickelt wurden, müssen alle Leistungsparameter mit den jeweilig gewählten DNA-Extraktions- und DNA-Quantifizierungskits vollständig validiert werden.
- Der Assay wurde für die in der folgenden Tabelle angegebenen Probenplexitäten und Indexsätze konfiguriert und getestet.

Batchgröße der Bibliotheksvorbereitung	Plexität	Laufkonfiguration	Indizierung
6, 12, 18 oder 24 Proben	6-Plex	1–4 S2-Läufe	S2-Satz 1 bis 4
16 Proben	16-Plex	1 S4-Lauf	S4-Satz 1 oder 2
22 Proben	16-Plex + 6-Plex	1 S4-Lauf + 1 S2-Lauf	S4-Satz 1 oder 2, S2-Satz 1 bis 4 (nicht verwendet für S4)

- Der Assay erzwingt keine positive Probenverfolgung. Die von der Software ausgegebene Zusammenfassung des QC-Ergebnis für Ploidie kann zwar optional dazu verwendet werden, um Probentauschvorgänge zu identifizieren, sie identifiziert aber keine männlichen Proben, die mit männlichen getauscht wurden bzw. keine weiblichen Proben, die mit weiblichen getauscht wurden.

- Der Assay bietet nur Validierungen bis zur Ausgabe von Genom-VCF-Dateien. Für alle diagnostischen Tests, die für die Verwendung mit TruSight Whole Genome entwickelt wurden, müssen alle Leistungsparameter mit den jeweilig ausgewählten nachgelagerten Anwendungen vollständig validiert werden.
- Der Assay gibt keine Varianten-Calls für Proben aus, die die Qualitätskontrolle nicht bestehen.
- Der Assay definiert hohe Konfidenzstufen nur für SNVs und Insertionen/Deletionen von 1–5 bp anhand der strengen Kriterien, die zur Definition eines genomischen Kontexts als hohe Konfidenz für einen bestimmten Variantentyp unter [Bestimmung der Konfidenzstufe kleiner Varianten auf Seite 43](#) verwendet werden.
- Der Assay wurde entwickelt, um CNVs über das gesamte zu berichtende Genom hinweg zu bewerten, unabhängig vom genomischen Kontext, und schließt Regionen mit Merkmalen aus, die Einschränkungen des Referenzgenoms widerspiegeln, wie Zentromere, Telomere und häufige in Populationen segregierende CNVs.
- Die Assayleistung wurde nicht für Kopienzahlvarianten unter 10 kb bewertet.
- Der Assay meldet keine Translokationen, Inversionen oder balancierte Rearrangements.
- Die Assayleistung wurde nicht auf Insertionen oder Deletionen von mitochondrialer DNA (mtDNA) untersucht.
- Der Assay berichtet nur Ergebnisse für STR-Loci, die in [Tabelle 2](#) aufgeführt sind. Wenn die echten STR-Expansionslängen ca. 135 bp überschreiten, stellt die beobachtete Länge aufgrund technischer Einschränkungen von Kurz-Reads oft eine Unterschätzung der wahren Länge dar, wobei dieser Effekt für FMR1 noch ausgeprägter ist. Sobald die echte STR-Länge die mediane Fragmentlänge (~330 bp) überschreitet, stabilisiert sich die STR-Längenschätzung.
- Der Assay meldet keine SMN1- oder SMN2-Kopienzahl.
- Der Assay macht keine Aussagen über die Pathogenität der nachgewiesenen Varianten.

## Produktkomponenten

TruSight Whole Genome besteht aus:

- TruSight Whole Genome Dx Library Prep with UD Indexes, 24 sample (Teile-Nr. 20093209) und
- TruSight Whole Genome Analysis Application (Katalog-Nr. 20106190, installiert durch geschultes Illumina-Personal)

# Reagenzien

## Bereitgestellte Reagenzien

### TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 1, Teile-Nr. 20072256

Name des Reagenzes	Menge	Füllvolumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF)	1	460 µl	Streptavidin Magnetic Beads, die mit Transposomen in gepufferter wässriger Lösung verbunden sind.	-25 °C bis -15 °C
Extension Ligation Mix (ELM)	1	1,6 ml	Ligase, DNA Polymerase und dNTPs in gepufferter wässriger Lösung.	-25 °C bis -15 °C
2N NaOH (HP3)	1	400 µl	2N Natriumhydroxid (NaOH)-Lösung.	-25 °C bis -15 °C
Tagmentation Buffer 1 (TB1)	1	290 µl	Gepufferte wässrige Lösung mit Magnesiumsalz und Dimethylformamid.	-25 °C bis -15 °C

### TruSight Whole Genome Dx Library Prep Box 2, Teile-Nr. 20072257

Name des Reagenzes	Menge	Füllvolumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
Tagmentation Wash Buffer 2 (TWB2)	1	41 ml	Gepufferte wässrige Lösung mit Reinigungsmittel und Salz.	15 °C bis 30 °C
Resuspension Buffer (RSB)	1	20 ml	Gepufferte wässrige Lösung.	15 °C bis 30 °C
Cleanup Beads (CB)	1	10 ml	Festphasige paramagnetische Beads in gepufferter wässriger Lösung.	15 °C bis 30 °C
Stop Tagment Buffer 2 (ST2)	1	1,4 ml	Reinigungslösung in Wasser.	15 °C bis 30 °C
Neutralization Buffer (NB)	1	450 µl	Tris-HCl-Lösung.	15 °C bis 30 °C

**TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes, Teile-Nr. 20072258**

Name des Reagenzes	Menge	Füllvolumen	Erläuterung	Lagerungstemperatur
UDI PCR-Free (32 Indexes)	1	37 µl	Eindeutige, in der Platte angeordnete duale (UD) Indexadapter.	-25 °C bis -15 °C

**Erforderliche, nicht bereitgestellte Verbrauchsmaterialien**

- Ethanol, 100 % (200 Proof), in Molekularbiologie-Qualität
- Zertifiziertes RNase/DNase-free water
- NovaSeq 6000Dx S2 Reagent Kit (300 Zyklen) (Katalog-Nr. 20046931)
- NovaSeq 6000Dx S4 Reagent Kit (300 Zyklen) (Katalog-Nr. 20046933)
- NovaSeq 6000Dx S2 Buffer Cartridge (Katalog-Nr. 20062292)
- NovaSeq 6000Dx S4 Buffer Cartridge (Katalog-Nr. 20062293)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube (Katalog-Nr. 20062290)
- NovaSeq 6000Dx Library Tube, Packung mit 24 Stück (Katalog-Nr. 20062291)

**Lagerung und Handhabung**

- Die Raumtemperatur ist mit 15 bis 30 °C definiert.
- Sollte die Verpackung oder der Inhalt von TruSight Whole Genome Dx Library Prep-Komponenten beschädigt oder beeinträchtigt sein, wenden Sie sich an den Kundendienst von Illumina.
- Die Reagenzien sind bis zu dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum stabil, wenn sie wie angegeben gelagert werden. Die Lagerungsbedingungen finden Sie unter [Bereitgestellte Reagenzien auf Seite 6](#). Die Assay-Komponenten bei der angegebenen Temperatur lagern und keine abgelaufenen Reagenzien verwenden. Kit-Komponenten aus unterschiedlichen Kit-Chargen nicht untereinander austauschen. Die Kit-Chargen sind auf den Kit-Etiketten gekennzeichnet.
- Änderungen der physischen Struktur der Reagenzien können auf eine Schädigung der Materialien hindeuten. Verwenden Sie die Reagenzien nicht, wenn Änderungen an der physischen Struktur auftreten (z. B. deutliche Veränderungen der Reagenzienfarbe oder Eintrübung). Werden bei ST2 Ausfällungen beobachtet, 10 Minuten lang bei 37 °C erhitzen und dann vortexen, bis die Ausfällungen aufgelöst sind.
- Die Stabilität von TruSight Whole Genome Dx Library Prep wurde überprüft. Die Leistung wurde bei Verwendung eingefrorener Röhrchen für bis zu vier Verwendungen der eingefrorenen Röhrchen nachgewiesen.

## Geräte und Materialien

### Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Ausstattung

Überprüfen Sie den Kalibrierungsstatus der Ausrüstung, bevor Sie mit dem Assay beginnen.

Ausrüstung	Lieferant
Vortexer mit 3000 U/min, flacher Boden oder Becher	Allgemeiner Laborlieferant
Mikroprobeninkubator kalibriert, um Temperaturgenauigkeit von $\pm 2$ °C zu gewährleisten	SciGene, Katalog-Nr. 1057-30-O (oder gleichwertig)
Mikroproben-Inkubatoreinsatz für 96-Well-MIDI-Platten	Illumina, Katalog-Nr. BD-60-601
Mikrozentrifuge	Allgemeiner Laborlieferant
96-Well-Mikroplattenzentrifuge	Allgemeiner Laborlieferant
Plattenschüttler mit folgenden Spezifikationen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Kann mit 1.800 U/min schütteln</li> <li>• Orbit-Mischkonstante 2 mm</li> <li>• Mischgenauigkeit von <math>\pm 25</math> U/min</li> </ul>	VWR, Katalog-Nr. 1808-0506 (oder gleichwertig)
Siegelwalze oder Dichtkeil	Allgemeiner Laborlieferant
Magnetstativ mit folgenden Spezifikationen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausgelegt für Präzipitation/Separation paramagnetischer Beads</li> <li>• Seitlich am Stativ angebrachte Magnete (nicht am Boden)</li> <li>• Für 96-Well-MIDI-Platten geeignet</li> </ul>	Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. AM10027 (oder gleichwertig)
NovaSeq 6000Dx Instrument	Illumina, Katalog Nr. 20068232

Ausrüstung	Lieferant
Präzisionspipetten (Einkanal): <ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 µl</li> <li>• 20 µl</li> <li>• 200 µl</li> <li>• 1000 µl</li> </ul> Präzisionspipetten (8-Kanal): <ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 µl</li> <li>• 200 µl</li> </ul> Stellen Sie sicher, dass die Pipetten regelmäßig kalibriert werden und innerhalb von 5 % des angegebenen Volumens korrekt sind	Allgemeiner Laborlieferant
Pipettierhilfe	Allgemeiner Laborlieferant

## Erforderliche, jedoch nicht bereitgestellte Materialien

Stellen Sie vor dem Starten des Protokolls sicher, dass Sie über die erforderlichen Materialien verfügen. Das Protokoll wurde unter Verwendung der aufgeführten Elemente optimiert und validiert. Bei Verwendung alternativer Materialien ist eine vergleichbare Leistung nicht gewährleistet.

Materialien	Lieferant
Serologische 5-ml-Pipetten	Allgemeiner Laborlieferant
Serologische 10-ml-Pipetten	Allgemeiner Laborlieferant
Selbsthaftende Verschlussfolie für 96-Well-Platten mit den folgenden Spezifikationen: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Abziehbares, optisch klares Polyester</li> <li>• Starker Klebstoff, der wiederholten Temperaturänderungen von -40 °C bis 110 °C widersteht</li> <li>• DNase-/RNase-frei</li> </ul>	Allgemeiner Laborlieferant
Mikrozentrifugenröhrchen, nukleasefrei (1,5, 1,7 oder 2,0 ml, sofern nicht als 0,5 ml angegeben)	Allgemeiner Laborlieferant
Nukleasefreie Reagenzienbehälter, 50 ml oder vergleichbar (Einwegwannen aus PVC)	Allgemeiner Laborlieferant
Konische 15-ml-Röhrchen	Allgemeiner Laborlieferant
Konische 50-ml-Röhrchen	Allgemeiner Laborlieferant

Materialien	Lieferant
Aerosol-resistente Pipettenspitzen, 20 µl	Allgemeiner Laborlieferant
Aerosol-resistente Pipettenspitzen, 200 µl	Allgemeiner Laborlieferant
Aerosol-resistente Pipettenspitzen, 1.000 µl	Allgemeiner Laborlieferant
96-Well-Lagerungsplatten, 0,8 ml (MIDI-Platte)	Fisher Scientific, Artikel-Nr. AB-0859 (oder gleichwertig)
96-Well-PCR-Platten, 0,2 ml (Polypropylen, RNase-/DNase-frei, Low-Bind)	Allgemeiner Laborlieferant
Eiskübel und Eis	Nicht zutreffend
Quantifizierte genomische DNA-Proben	Nicht zutreffend

## Erfassen, Transportieren und Lagern von Proben



### VORSICHT

Behandeln Sie alle Proben wie potenzielle Infektionserreger.

- Befolgen Sie die Sicherheitsverfahren, einschließlich der Verwendung von PSA, wenn Sie menschliche Blutproben entnehmen, transportieren, aufbewahren und verarbeiten.
- Der Transport von Vollblut muss allen geltenden regionalen, nationalen und lokalen gesetzlichen Bestimmungen für den Transport von Infektionserregern entsprechen.
- Entnehmen Sie 2–5 ml peripheres Vollblut in EDTA-Röhrchen und lagern Sie diese bis zu fünf Wochen vor der Entnahme bei 2 °C bis 8 °C.
- Bei Vollblutproben mit erhöhten Bilirubin-, Hämoglobin-, Triglycerid, Biotin- oder EDTA-Werten wurden keine negativen Auswirkungen auf die Assay-Leistung beobachtet. Siehe *Störende Substanzen*.
- TruSight Whole Genome ist mit handelsüblichen Extraktionskits und Protokollen kompatibel, die für die Verwendung von Next Generation Sequencing (NGS)-Verfahren geeignet sind. Siehe [Beurteilung der DNA-Extraktionsmethode auf Seite 41](#).
- TruSight Whole Genome ist kompatibel mit einer in Tris-gepufferten Lösung eluierten DNA, die ≤ 10 mM EDTA enthält, wie z. B. 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0 (TE).
- Es wird empfohlen, die DNA in TE zu eluieren und zu lagern. Aus Stabilitätsgründen sollte die Lagerung in Wasser vermieden werden.

## Empfehlungen für DNA-Zugaben

- Bevor Sie mit dem TruSight Whole Genome-Assay beginnen, quantifizieren Sie die genomische DNA, die aus Vollblut extrahiert wurde, mit einer beliebigen fluorometrischen Quantifizierungsmethode mit nukleinsäurebindenden Farbstoffen. Es wird empfohlen, gDNA für Proben, die für einen bestimmten Bibliotheksvorbereitung-Batch und einen Sequenzierunslauf vorgesehen sind, zusammen zu quantifizieren, um eine Batch-to-Batch-Variabilität nach Möglichkeit auszuschließen, oder Prozesskontrollen zu verwenden, damit eine Batch-to-Batch-Variabilität von  $\leq 25\%$  für die DNA-Quantifizierung gewährleistet ist.
- Vermeiden Sie das Pipettieren kleiner Probenvolumina ( $< 2\ \mu\text{l}$ ), um eine genaue DNA-Quantifizierung und -Zugabe zu gewährleisten.
- Der TruSight Whole Genome Dx Library Prep benötigt ausreichend DNA für die Sättigung der BLT-PF-Beads, um eine effektive Selbstnormalisierung der Bibliotheksergebnisse und optimale Leistung zu erreichen. Da die verschiedenen Quantifizierungsmethoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führen, enthält die folgende Tabelle die empfohlene DNA-Zugabe für drei Quantifizierungsmethoden, mit denen eine optimale Assayleistung gewährleistet werden kann. Die Verwendung anderer Quantifizierungsmethoden kann eine Optimierung erfordern. Siehe hierzu [DNA-Zugabe-Sensitivität auf Seite 41](#).

Quant-Methode	DNA-Zugabeziel (ng)	Minimale DNA-Bestandskonzentration
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	280	11,2 ng/ $\mu\text{l}$
Qubit dsDNA Broad-Range (BR) Assay Kit	280	11,2 ng/ $\mu\text{l}$
AccuClear Ultra High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit	350	14 ng/ $\mu\text{l}$

## Empfehlungen zu Kompetenzen

Die Kenntnisse des Bedieners und die erfolgreiche Assay-Implementierung können durch einmalige Durchführung eines Komplet-Workflows gemäß der Gebrauchsanweisung bewertet werden. Dieser Workflow kann entweder mit einer einzelnen Bibliotheksvorbereitung von 6 Proben und einem Sequenzierunslauf mit einer S2-Fließzelle oder mit einer einzelnen Bibliotheksvorbereitung von 16 Proben und einem Sequenzierunslauf mit einer S4-Fließzelle durchgeführt werden. Die Übung war erfolgreich, wenn die QC-Metriken für den Lauf und die Bibliothek in der konsolidierten Berichtsausgabe der TruSight Whole Genome Analysis Application-Software als bestanden angegeben wurden. Siehe TruSight Whole Genome Analysis Application Handbuch (Dokument-Nr. 200049931).

Illumina empfiehlt die Aufnahme genomischer DNA-Proben, die aus peripherem Vollblut extrahiert wurden und die Qualifizierungskriterien der DNA-Bestandskonzentration und des DNA-Volumens erfüllen, um eine erfolgreiche Assayintegration mit vorgelagerten Laborprozessen wie der Probenentnahme und -lagerung sowie DNA-Extraktions- und -Quantifizierungsverfahren nachzuweisen. Handelsübliche genomische DNA-Referenzproben, die von einem einzelnen menschlichen Spender, etwa von NA24385/HG002 (National Institute of Standards and Technology Genome in a Bottle Consortium) stammen, können ebenfalls verwendet werden.

Wenn Probleme auftreten, lesen Sie den Abschnitt [Fehlerbehebung auf Seite 76](#) für empfohlene Maßnahmen und wenden Sie sich an den Illumina technischen Support.

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- **Einige Komponenten dieses Assays enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Personen können sich durch Einatmen, Verschlucken oder durch Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Tragen Sie eine dem Expositionsrisiko entsprechende Schutzausrüstung, insbesondere Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften.** Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS) unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).
- Melden Sie schwerwiegende Vorkommnisse in Zusammenhang mit diesem Gerät unmittelbar an Illumina und die zuständigen Behörden des Mitgliedslandes, in dem sich Anwender und Patient befinden.
- Behandeln Sie alle Proben, als wären sie erwiesenermaßen infektiös.
- Wenden Sie die routinemäßigen Vorsichtsmaßnahmen für das Labor an. Benutzen Sie zum Pipettieren nicht den Mund. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht in ausgewiesenen Arbeitsbereichen. Tragen Sie beim Umgang mit Proben und Assay-Reagenzien Einweghandschuhe und einen Laborkittel. Waschen Sie sich nach dem Umgang mit Proben und Assay-Reagenzien gründlich die Hände.
- Dieser Assay enthält Polyethylenglykol. Personen können sich durch Einatmen, Verschlucken oder durch Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen.
- Dieser Assay enthält Natriumhydroxid. Personen können sich durch Einatmen, Verschlucken oder durch Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen.
- Für die Bibliotheksvorbereitung ist eine RNase-/DNase-freie Umgebung erforderlich. Dekontaminieren Sie die Arbeitsbereiche sorgfältig mit RNase-/DNase-hemmendem Reinigungsmittel.
- Verwenden Sie nukleasefreie Mikrozentrifugenröhrchen, Platten, Pipettenspitzen und Behälter.
- Verwenden Sie für den gesamten Assay kalibrierte Ausrüstung. Die Ausrüstung muss für die in diesem Protokoll angegebenen Drehzahlen, Temperaturen und Volumen kalibriert werden.
- Die Verwendung von Präzisionspipetten gewährleistet eine genaue Reagenz- und Probenabgabe. Führen Sie die Kalibrierung regelmäßig gemäß den Herstellerspezifikationen durch.
- Verwenden Sie für den Assay spezifizierte Ausrüstung und konfigurieren Sie die Programme gemäß den Anweisungen.

- Die Temperaturangaben für den Mikroproben-Inkubator beziehen sich auf die für die Reaktion festgelegte Temperatur, die von der Temperatur der Ausrüstung abweichen kann.
- Tauschen Sie Kit-Komponenten aus unterschiedlichen TruSight Whole Genome Dx Library Prep-Chargen nicht untereinander aus. Die Chargen sind auf den Kit-Etiketten gekennzeichnet.
- Ordnungsgemäße Laborpraktiken sind unerlässlich, um eine Kontaminierung von Reagenzien, Instrumenten, Proben und Bibliotheken durch Nukleasen und PCR-Produkte zu verhindern. Eine Kontaminierung durch Nukleasen und PCR-Produkte kann zu falschen und unzuverlässigen Ergebnissen führen.
- Nur mit dem entsprechenden Plattentyp können hinsichtlich Assay-Leistung und Lagerung optimale Ergebnisse erzielt werden. Die Anweisungen zur Plattenübertragung in der [Gebrauchsanweisung auf Seite 16](#) sind unbedingt zu befolgen.
- Es kann es zu Kreuzkontaminationen oder Probenverlusten kommen, wenn die Verschlussfolien auf der Platte nicht ordnungsgemäß angebracht oder entfernt werden (siehe [Handhabung von Bibliotheksvorbereitungsplatten auf Seite 14](#)).
- Wenn die beschriebenen Verfahren nicht eingehalten werden, kann dies zu fehlerhaften Ergebnissen oder einer wesentlichen Minderung der Bibliotheksqualität führen.
- Assay-Reagenzien oder -Komponenten bei den angegebenen Temperaturen lagern.
- Reagenzien nicht in einem frostfreien Tiefkühlgerät lagern.
- Verwenden Sie ausschließlich Reagenzien, die ordnungsgemäß gelagert wurden.
- Komponenten nicht mehr nach ihrem angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Bereiten Sie 0,2 N NaOH (verdünnte HP3) am Tag der Verwendung frisch vor und entsorgen Sie das restliche Volumen nach der Verwendung.
- Frisches 80 %iges Ethanol mit RNase/DNase-free Water am Tag der Anwendung vorbereiten. Ethanol kann Wasser aus der Luft aufnehmen, was die Ergebnisse verfälschen kann. Entsorgen Sie das 80%ige Ethanol nach Gebrauch gemäß den örtlichen und/oder landesweiten Vorschriften. Ethanol in Molekularbiologie-Qualität verwenden.

## Verfahrenshinweise

### Tipps und Techniken

#### Vermeiden einer Kreuzkontamination

- Wechseln Sie beim Hinzufügen oder Übertragen von Proben die Spitzen zwischen den *einzelnen Proben*.
- Bei Hinzufügen von Adaptern oder Primer mit einer Mehrkanalpipette die Spitzen zwischen *jedem Well* wechseln.
- Verschlussfolien der Platten auf einer Arbeitsplatte sorgfältig öffnen und verschließen, um eine Kreuzkontamination der Probe zu vermeiden.

- Um eine Kontamination zu vermeiden, ist jeder Index-Well zum einmaligen Gebrauch bestimmt.
- Die angegebenen Wannenvolumina verwenden und das verbleibende Volumen nicht zurück in die Vorratsröhrchen gießen, da dies zu einer Kontamination führen kann. Das Volumen ist völlig ausreichend für den Workflow.
- Keine Bibliotheken aus verschiedenen Prep-Kits miteinander poolen.

## **Pipettiergenauigkeit**

Beachten Sie bei Verwendung von Mehrkanalpipetten folgende Richtlinien:

- Spitzen mit Barriere müssen genau passen und für die Marke und das Modell der Mehrkanalpipette geeignet sein.
- Bringen Sie die Spitzen mit einer Drehbewegung an, um sicherzustellen, dass alle Spitzen ordnungsgemäß sitzen.
- Achten Sie beim Aspirieren auf gleiche Flüssigkeitsvolumina in allen Spitzen.
- Zähflüssige Lösungen (BLT-PF, CB, ELM, TWB2) langsam pipettieren.
- Stellen Sie nach der Abgabe sicher, dass aus jeder Spitze Flüssigkeit abgegeben wurde.

## **Vermeidung von Schaumbildung**

- Langsam pipettieren und zum Mischen invertieren. ELM und TWB2 nicht mit dem Vortexer mischen.

## **Handhabung von Indexplatten**

- Foliendichtungen nur für Indizes durchstechen, die auch verwendet werden.
- Die Platte an den Kanten anfassen und eine Berührung der Verschlussfolie mit etwas anderem als sauberen Pipettenspitzen vermeiden.
- Wells, die durchstoßen wurden, nicht wiederverwenden.
- Nach der Verwendung unbenutztes Volumen (~30 µl) aus den durchbohrten Wells der Indexplatte entsorgen und Verschlussfolien über die durchbohrten Wells platzieren, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verschlussfolie nicht über unbenutzte Wells platzieren, da dies ein Durchstechen erschwert.

## **Handhabung von Bibliotheksvorbereitungsplatten**

- Die Platte vor Lagerung, Schütteln, Inkubation oder Zentrifugieren immer versiegeln.
- Die Platte versiegeln, indem Sie die selbsthaftende Verschlussfolie mit einem Dichtkeil oder einer Siegelwalze auf der Platte anbringen.
- Stellen Sie sicher, dass die Ränder und Wells vollständig versiegelt sind, um das Risiko für Kreuzkontaminierung und Verdunstung zu verringern.
- Versiegeln Sie die Platten mit einer neuen selbsthaftenden Verschlussfolie. Versiegelungen dürfen nicht mehrfach verwendet werden.
- Platte vor dem Entfernen der Verschlussfolie auf eine ebene Oberfläche platzieren.

- Wenn nicht anders angegeben, können Schritte mit der Platte auf oder außerhalb des Magneten durchgeführt werden.

## Platten-Transfers

- Wenn Sie Volumen zwischen den Platten übertragen, müssen die angegebenen Volumen aus jedem Well einer Ausgangsplatte in den entsprechenden Well der Zielplatte übertragen werden.

## Wannen

- Bei Bedarf können Reagenzwannen verwendet werden. Befolgen Sie die folgenden Richtlinien:
  - Die Wanne nach dem Vortexen mit CB vorbereiten. Es ist nicht erforderlich, CB vor dem zweiten Schritt der Bead-Zugabe in das Röhrchen zurückzugießen und zu mischen.
  - TWB2- und RSB-Wannen beschriften, um Verwechslungen zu vermeiden.
  - Entsorgen Sie Reagenzien, wenn dies angezeigt ist bzw. am Ende des Workflows.
- Empfohlenes Volumen verwenden. Zu den empfohlenen Volumina gehören 1 ml Überschuss für das Gesamtvolumen.
- RSB und TWB2 sind in ähnlichen Röhrchen verpackt. Lesen Sie vor der Verwendung jedes Etikett sorgfältig durch.

## Zentrifugieren

- Nur bei den angegebenen Schritten im Verfahren zentrifugieren, um Flüssigkeit oder Beads auf dem Boden des Wells zu konsolidieren und einen Probenverlust zu vermeiden.

## Handhabung von Beads

- Cleanup Beads (CB) nicht einfrieren.
- Bei Waschläufen für Beads:
  - Magnetic Stand-96 für alle MIDI-Platten verwenden.
  - Flüssigkeit so verteilen, dass keine Beads an der Seite des Wells haften bleiben.
  - Belassen Sie die Platte auf dem Magnetstativ.
- Reagenzien immer in die Mitte oder auf den Boden des Wells geben, ohne das Bead-Pellet durcheinanderzubringen. Keine Reagenzien an der Oberseite des Wells hinzufügen.
- Bead-Suspensionen langsam pipettieren.
- Die Bead mit dem Vortexer mischen, bis sie gut dispergiert sind. Die Flüssigkeit muss farblich homogen aussehen. Wenn im Protokoll angegeben, mit Vortexer mischen, um sicherzustellen, dass die Beads zum Zeitpunkt der Verwendung resuspendiert werden.
- Wenn die Beads nicht resuspendieren, erneut schütteln.
- Wenn Beads in die Pipettenspitzen aspiriert werden, obwohl das nicht vorgesehen war, geben Sie die Beads in die Platte auf dem Magnetstativ zurück. Warten Sie ca. 2 Minuten, bis die Flüssigkeit klar ist.
- Aufrecht lagern, um sicherzustellen, dass die Beads nach der Verwendung in den Puffer getaucht sind.

## Kontrollproben

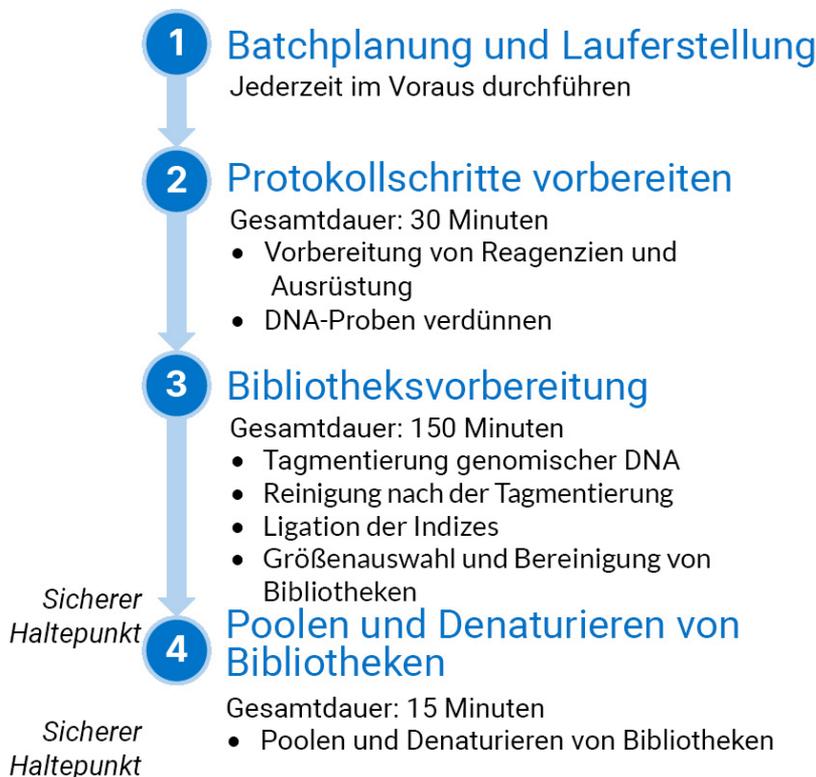
TruSight Whole Genome verwendet in die TruSight Whole Genome Analysis Application-Software integrierte analytische Kontrollproben zur Datenqualifizierung und benötigt keine externen Chargenkontrollen. Weitere Informationen finden Sie unter [Qualitätskontrollen auf Seite 34](#).

## Gebrauchsanweisung

### TruSight Whole Genome Dx Library Prep Workflow

Das folgende Diagramm veranschaulicht den TruSight Whole Genome Dx Library Prep-Workflow. Zwischen den Schritten sind sichere Haltepunkte markiert.

Wenn Sie das Programm abbrechen, bringen Sie die verbleibenden Reagenzien in den Originalröhrchen wieder auf die unter [Bereitgestellte Reagenzien auf Seite 6](#) angegebene Lagertemperatur zurück. Wenn Sie fortfahren, fahren Sie mit dem nächsten Abschnitt im Protokoll mit den vorbereiteten Reagenzien fort.



### Batchplanung und Lauferstellung

Planen Sie die Anzahl der Probenbibliotheken für Batch, Indexierung und Pooling für Sequenzierumläufe.

TruSight Whole Genome wurde bewertet und die Leistung für vier Indexsätze für die S2-Fließzelle ([Abbildung 1, Tabelle 4](#)) und zwei Indexsätze von für die S4-Fließzelle ([Abbildung 2, Tabelle 5](#)) nachgewiesen. Die Software erzwingt die Verwendung bestimmter Indexsätze. Spezifizierte Indexsätzen nicht mischen und miteinander abgleichen.

Ein Multiplexverfahren zur Sequenzierung außerhalb dieser Empfehlungen wird nicht unterstützt.

S2-Index- und S4-Index-Sätze unterstützen zusammen die Bibliotheksvorbereitung mit Batchgrößen von 6, 12, 16, 18, 22 und 24 Proben. Verwenden Sie die kompatiblen Indexsätze, die in [Tabelle 3](#) für jede Batchgröße zur Bibliotheksvorbereitung aufgeführt sind.



## VORSICHT

Die Proben in der Platte in einer Ausrichtung anordnen, die der geplanten Indexierung entspricht, d. h. Reihen A bis H für einen 16-Plex oder Reihen A bis F für einen 6-Plex. Indizes mit einer Mehrkanalpipette hinzufügen, um zu vermeiden, dass ein Well übersprungen oder zwei Indexsätze zu einer einzigen Probe hinzugefügt werden, was zu keinen Ergebnissen bzw. falschen Ergebnissen führen kann.

Tabelle 3 Indexsatz-Optionen für Batch zur Bibliotheksvorbereitung

Batchgröße der Bibliotheksvorbereitung	Index-Satz	Fließzell-Konfigurationen
6 Proben	S2-Indexsatz 1, 2, 3 oder 4 (1 beliebigen Satz auswählen)	S2 x 1
12 Proben	S2-Indexsatz 1, 2, 3 oder 4 (2 beliebige Sätze auswählen)	S2 x 2
18 Proben	S2-Indexsatz 1, 2, 3 oder 4 (3 beliebige Sätze auswählen)	S2 x 3
24 Proben	S2-Indexsatz 1, 2, 3 und 4	S2 x 4
16 Proben	S4-Indexsatz 1 oder 2	S4 x 1
22 Proben	S4-Indexsatz 1 + S2-Indexsatz 3 oder 4 S4-Indexsatz 2 + S2-Indexsatz 1 oder 2	S4 x 1 und S2 x 1

Abbildung 1 Indexplattenlayout mit vier Indexsätzen für die S2-Fließzellsequenzierung

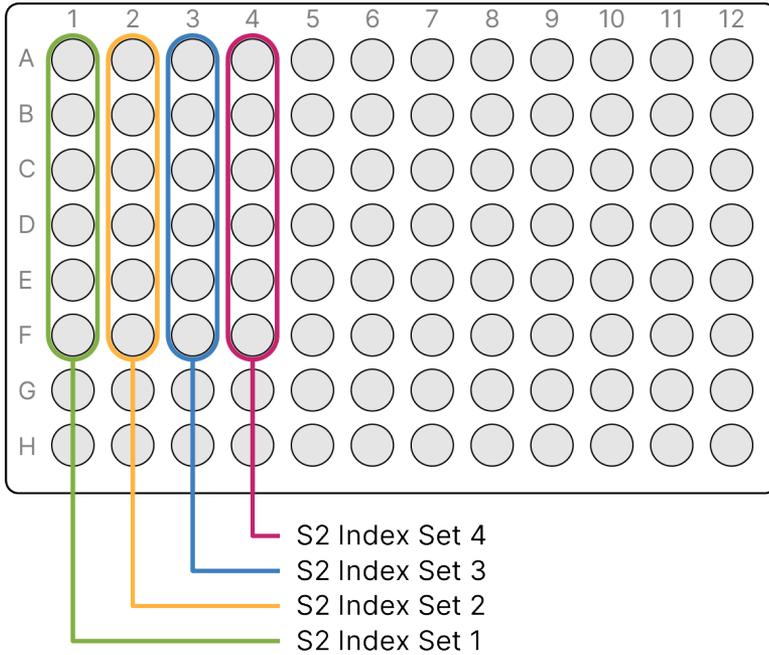


Tabelle 4 S2-Indexsätze für S2-Fließzelle

	S2-Indexsatz 1 (Grün)	S2-Indexsatz 2 (Gelb)	S2-Indexsatz 3 (Blau)	S2-Indexsatz 4 (Magenta)
	1	2	3	4
A	UDP0037	UDP0065	UDP0081	UDP0089
B	UDP0038	UDP0066	UDP0082	UDP0090
C	UDP0039	UDP0067	UDP0083	UDP0091
D	UDP0040	UDP0068	UDP0084	UDP0092
E	UDP0041	UDP0069	UDP0085	UDP0093
F	UDP0042	UDP0070	UDP0086	UDP0094

Abbildung 2 Indexplattenlayout mit zwei Indexsätzen für die S4-Fließzellsequenzierung

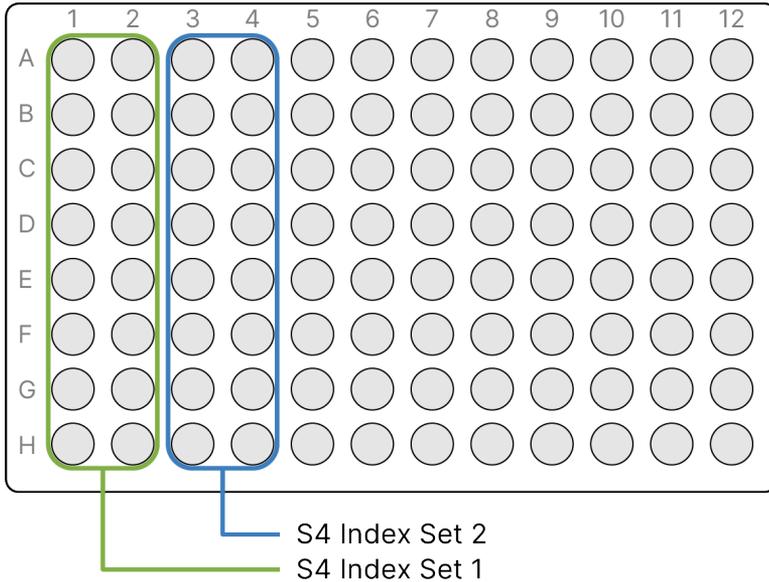


Tabelle 5 S4-Indexsätze für S4-Fließzelle

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

Notieren Sie den eindeutigen Batch-Namen und die Probanddaten, einschließlich Proben-ID, zugehörige Indexplatten-Well-ID (siehe [Anhang A auf Seite 92](#)), Bibliotheksplatte, Bibliotheksplatten-Well-ID und Bibliotheksröhrchen-ID (falls bekannt). Diese Informationen werden bei der Lauferstellung eingegeben.

Anweisungen zur Erstellung eines Laufs mithilfe der Anwendung finden Sie im TruSight Whole Genome Analysis Application Handbuch (Dokument-Nr. 200049931). Notieren Sie den Laufnamen, der während des Ladens von Verbrauchsmaterialien verwendet werden soll.

**VORSICHT**

Stellen Sie sicher, dass die Indizes und zugehörigen Proben, die während der Bibliotheksvorbereitung verwendet werden, mit denen übereinstimmen, die aufgezeichnet und zum Erstellen eines Laufs verwendet wurden. Diskrepanzen können dazu führen, dass falsche Ergebnisse oder keine Ergebnisse gemeldet werden.

## Protokollschritte vorbereiten

### Vorbereitung von Reagenzien und Ausrüstung

Wenn eine Sequenzierung am selben Tag geplant ist, tauen Sie die Verbrauchsmaterialien für Sequenzierungsmaterialien im Voraus auf. Siehe NovaSeq 6000Dx Instrument-Produktdokumentation (Dokument-Nr. 200010105) für detaillierte Anweisungen dazu.

1. Einen Mikroproben-Inkubator mit MIDI-Platteneinsatz auf 47 °C vorheizen.
2. Die folgenden Reagenzien aus dem Karton nehmen und wie folgt auftauen.

Tabelle 6 Lagerung bei -25 °C bis -15 °C

Reagenz	Kartonname	Anweisungen zum Auftauen
BLT-PF	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	30 Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen lassen.
ELM	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	30 Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen lassen. Anschließend bis zur Verwendung auf Eis aufbewahren.
HP3	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	30 Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen lassen.
TB1	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 1	30 Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen lassen.
UD-Indizes	TruSight Whole Genome Dx 32 Unique Dual Indexes	30 Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen lassen.

Tabelle 7 Lagerung bei 15 °C bis 30 °C

Reagenz	Kartonname	Anweisungen zum Auftauen
CB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Bei Raumtemperatur verwenden.
RSB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Bei Raumtemperatur verwenden.
ST2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Bei Raumtemperatur verwenden.
TWB2	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Bei Raumtemperatur verwenden.
NB	TruSight Whole Genome Dx Library Prep 2	Bei Raumtemperatur verwenden.

**VORSICHT**

Diese Reagenzien enthalten potenziell gesundheitsschädliche Chemikalien. Personen können sich durch Einatmen, Verschlucken oder durch Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Tragen Sie eine dem Expositionsrisiko entsprechende Schutzausrüstung, insbesondere Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS) unter [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

**DNA-Proben vorbereiten**

Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor.

- Quantifizierte gDNA-Proben:
  - a. Bringen Sie das Reagenz auf Raumtemperatur.
  - b. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, um Tropfen zu sammeln.
  - c. Mit Pulsvortexen oder Pipettieren mischen und dann kurz zentrifugieren.
- RSB: Zum Mischen vortexen oder invertieren. Bei Raumtemperatur aufbewahren.
  - RSB und TWB2 sind in ähnlichen Röhrchen verpackt. Lesen Sie vor der Verwendung jedes Etikett sorgfältig durch.

**Verfahren**

Abhängig von der DNA-Zugabe, die je nach verwendeter DNA-Quantifizierungsmethode variiert, berechnen Sie die Volumina, die zur Herstellung verdünnter DNA-Proben erforderlich sind. Nachfolgend finden Sie Formeln für die drei getesteten DNA-Quantifizierungsmethoden. Weitere Informationen dazu finden Sie unter [Empfehlungen für DNA-Zugaben auf Seite 11](#) und [Anhang B auf Seite 95](#).

Die Berechnungen gehen von einem Mindestpipettiervolumen von 2,0 µl aus und beinhalten 10 % Überschuss. Nach Abschluss der Berechnungen sollte bei den letzten Schritten mit der erforderlichen Anzahl an Dezimalstellen gerundet werden, um eine genaue Pipettierung zu gewährleisten.

**Option 1: 280 ng DNA-Zugabe für Breitband-Quantifizierungsmethoden mit Quant und Qubit**

Die minimale DNA-Bestandskonzentration der Probe beträgt 11,2 ng/µl. Bei Proben < 11,2 ng/µl ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass die Bibliotheks-QC nach der Sequenzierung fehlschlägt. Verwenden Sie je nach Konzentration des DNA-Bestands eine der folgenden Gleichungen für Ihre Berechnungen.

1. Berechnen Sie für die DNA-Bestandskonzentration von 11,2 bis 154,0 ng/µl das Volumen des DNA-Bestands und die benötigte Menge RSB unter Verwendung eines Gesamtvolumens der verdünnten DNA von 27,5 µl (25 µl plus 10 % Überschuss) als Konstante:
  - a. Berechnen des Volumens für den DNA-Bestand:

$$\begin{aligned}
 \text{DNA- Bestandsvolumen } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{DNA-Zugabe-Ziel (ng)} + 10 \% \text{ \u00dcberschuss})}{\text{DNA-Bestandskonzentration (ng/\u00b5l)}} \\
 &= 280 \text{ ng} \times 1,1 / \text{DNA- Bestandskonzentration (ng/\u00b5l)} \\
 &= 308 \text{ ng} / \text{DNA- Bestandskonzentration (ng/\u00b5l)}
 \end{aligned}$$

- b. Berechnen des Volumens f\u00fcr den RSB-Bestand:

$$\begin{aligned}
 \text{Volumen RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Gesamtvolumen verd\u00fcnnter DNA } (\mu\text{l}) - \text{berechnetes DNA- Bestandsvolumen } (\mu\text{l}) \\
 &= 27,5 (\mu\text{l}) - \text{berechnetes DNA- Bestandsvolumen } (\mu\text{l})
 \end{aligned}$$

- c. Berechnungen \u00fcberpr\u00fcfen: Best\u00e4tigen Sie das berechnete DNA-Bestandsvolumen ( $\mu\text{l}$ ) + das berechnete Volumen von RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 27,5  $\mu\text{l}$ , das Gesamtvolumen der verd\u00fcnnten DNA (eine Konstante, 25  $\mu\text{l}$  plus 10 % \u00dcberschuss).

2. Alternativ kann f\u00fcr DNA-Bestandskonzentrationen > 154,0 ng/ $\mu\text{l}$  das Gesamtvolumen von verd\u00fcnnter DNA und ben\u00f6tigtem RSB berechnet werden, das mit dem DNA-Bestandsvolumen von 2,0  $\mu\text{l}$  und der anvisierten verd\u00fcnnten DNA-Bestandskonzentration von 11,2 ng/ $\mu\text{l}$  als Konstanten ben\u00f6tigt wird.

- a. Berechnen des Gesamtvolumens der verd\u00fcnnten DNA:

$$\begin{aligned}
 \text{Gesamtvolumen der verd\u00fcnnten DNA } (\mu\text{l}) &= \frac{\text{DNA-Bestandskonzentration (ng/\u00b5l)} \times \text{Volumen des DNA-Bestands } (\mu\text{l})}{\text{Zielkonzentration des verd\u00fcnnten DNA-Bestands}} \\
 &= \text{DNA- Bestandskonzentration (ng/\u00b5l)} \times 2,0 \mu\text{l} / 11,2 \text{ ng/\u00b5l}
 \end{aligned}$$

- b. Berechnen des RSB-Volumens:

$$\begin{aligned}
 \text{Volumen RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Gesamtvolumen verd\u00fcnnter DNA } (\mu\text{l}) - \text{Berechnetes DNA- Bestandsvolumen } (\mu\text{l}) \\
 &= \text{Berechnetes Gesamtvolumen verd\u00fcnnter DNA } (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l}
 \end{aligned}$$

- c. Berechnungen \u00fcberpr\u00fcfen: Best\u00e4tigen Sie das berechnete DNA-Bestandsvolumen ( $\mu\text{l}$ ) + das berechnete Volumen von RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 2,0  $\mu\text{l}$ , das DNA-Bestandsvolumen (eine Konstante).

Fahren Sie mit Schritt 3 unten fort.

## Option 2: 350 ng DNA-Zugabe f\u00fcr die Accuclear Ultra hochempfindliche Quantifizierungsmethode

Die minimale DNA-Bestandskonzentration der Probe betr\u00e4gt 14,0 ng/ $\mu\text{l}$ . Bei Proben < 14,0 ng/ $\mu\text{l}$  ist die Wahrscheinlichkeit gr\u00f6\u00dfer, dass die Bibliotheks-QC nach der Sequenzierung fehlsch\u00e4gt. Verwenden Sie je nach Konzentration des DNA-Bestands eine der folgenden Gleichungen f\u00fcr Ihre Berechnungen.

1. Berechnen Sie f\u00fcr die DNA-Stammkonzentration von 14,0 bis 192,5 ng/ $\mu\text{l}$  das Volumen des DNA-Stamms und den RSB Bedarf unter Verwendung eines Gesamtvolumens der verd\u00fcnnten DNA von 27,5  $\mu\text{l}$  (25  $\mu\text{l}$  plus 10 % \u00dcberschuss) als Konstante:
  - a. Berechnen des Volumens f\u00fcr den DNA-Bestand:

$$\begin{aligned} \text{DNA- Bestandsvolumen } (\mu\text{l}) &= \frac{(\text{DNA-Zugabe-Ziel (ng)} + 10 \% \text{ Überschuss})}{\text{DNA-Bestandskonzentration (ng}/\mu\text{l})} \\ &= 350 \text{ ng} \times 1,1 / \text{DNA- Bestandskonzentration (ng}/\mu\text{l}) \\ &= 385 \text{ ng} / \text{DNA- Bestandskonzentration (ng}/\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- b. Berechnen des Volumens für den RSB-Bestand:

$$\begin{aligned} \text{Volumen RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Gesamtvolumen verdünnter DNA } (\mu\text{l}) - \text{berechnetes DNA- Bestandsvolumen } (\mu\text{l}) \\ &= 27,5 (\mu\text{l}) - \text{Berechnetes DNA- Bestandsvolumen } (\mu\text{l}) \end{aligned}$$

- c. Berechnungen überprüfen: Bestätigen Sie das berechnete DNA-Bestandsvolumen ( $\mu\text{l}$ ) + das berechnete Volumen von RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 27,5  $\mu\text{l}$ , das Gesamtvolumen der verdünnten DNA (eine Konstante, 25  $\mu\text{l}$  plus 10 % Überschuss).

2. Alternativ berechnen Sie für DNA-Bestandskonzentrationen > 192,5 ng/ $\mu\text{l}$  das Gesamtvolumen von verdünnter DNA und benötigtem RSB mithilfe eines DNA-Bestandsvolumens von 2,0  $\mu\text{l}$  als eine Konstante.

- a. Berechnen des Gesamtvolumens der verdünnten DNA:

$$\text{Gesamtvolumen verdünnter DNA } (\mu\text{l}) = \frac{\text{DNA-Bestandskonzentration (ng}/\mu\text{l}) \times 2,0 \mu\text{l}}{14,0 \text{ ng}/\mu\text{l}}$$

- b. Berechnen des RSB-Volumens:

$$\begin{aligned} \text{Volumen RSB } (\mu\text{l}) &= \text{Gesamtvolumen verdünnter DNA } (\mu\text{l}) - \text{DNA- Bestandsvolumen } (\mu\text{l}) \\ &= \text{Gesamtvolumen verdünnter DNA } (\mu\text{l}) - 2,0 \mu\text{l} \end{aligned}$$

- c. Berechnungen überprüfen: Bestätigen Sie das berechnete DNA-Bestandsvolumen ( $\mu\text{l}$ ) + das berechnete Volumen von RSB ( $\mu\text{l}$ ) = 2,0  $\mu\text{l}$ , das DNA-Bestandsvolumen (eine Konstante).

3. Für jede verdünnte Probe ein neues 0,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen beschriften.
4. Oben berechnetes RSB-Volumen für jede verdünnte Probe in das entsprechende Röhrchen geben.
5. Oben berechnetes DNA-Bestandsvolumen für jede verdünnte Probe in das entsprechende Röhrchen geben.
6. Im Vortexer mit Pulsfunktion mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

## Bibliotheksvorbereitung

Verwenden Sie die Vorbereitungsschritte in diesem Abschnitt, um Reagenzien im Voraus vorzubereiten. Sofern kein sicherer Haltepunkt angegeben ist, fahren Sie sofort mit dem nächsten Schritt fort.

### Vorbereitung

Bereiten Sie folgende Verbrauchsmaterialien vor:

- BLT-PF (Bead-Linked Transposomes PCR-Free): Mit dem Vortexer mischen. Bei Verwendung mehrerer Röhrchen mit dem Vortexer mischen und dann kombinieren.
- TB1 (Tagmentation Buffer 1):

- a. Mischen Sie mit dem Vortexmischer.
- b. Zentrifugieren Sie kurz.
- ST2 (Stop Tagment Buffer 2):
  - a. Auf Ausfällungen kontrollieren. Werden Ausfällungen beobachtet, 10 Minuten lang bei 37 °C erhitzen und dann vortexen, bis die Ausfällungen aufgelöst sind.
  - b. Gründlich mit dem Vortexer mischen und anschließend kurz zentrifugieren.
- ELM (Extension Ligation Mix):
  - a. Invertieren Sie sie zum Mischen. Mischen Sie nicht mit dem Vortexer.
  - b. Bis zur Verwendung auf Eis lagern.
- HP3 (2N NaOH):
  - a. Mit dem Vortexer mischen und anschließend kurz zentrifugieren.
  - b. Bei Raumtemperatur aufbewahren.
- NB (Neutralization Buffer):
  - a. Mit dem Vortexer mischen und anschließend kurz zentrifugieren.
  - b. Bei Raumtemperatur aufbewahren.
- CB (Cleanup Beads):
  - a. 1 Minute mit dem Vortexer mischen.
  - b. 2–5 Mal invertieren und dann gründlich mit dem Vortexer mischen, um zu resuspendieren.
- Index-Adapter (UDI PCR-Free (32 Indexes)):
  - a. Mit dem Vortexer mischen und anschließend kurz zentrifugieren.
  - b. Bei Raumtemperatur aufbewahren.
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2):
  - a. Die Röhrchenkappe mit TWB2 beschriften.
  - b. Zum Mischen gründlich invertieren.
- In einem mit 0,2 N NaOH gekennzeichneten Mikrozentrifugenröhrchen die folgenden Volumina 0,2 N NaOH gemäß der geplanten Chargengröße vermischen. Mischen Sie mit dem Vortexmischer.

## HINWEIS

Wenn Sie planen, Bibliotheken am selben Tag zu poolen und zu denaturieren, bereiten Sie zusätzliche 0,2 N NaOH vor. Siehe [Vorbereitung auf Seite 31](#).

Reagenz	6 Proben (µl)	12 Proben (µl)	16 Proben (µl)	18 Proben (µl)	22 Proben (µl)	24 Proben (µl)
HP3	30	60	80	90	110	120
RSB	270	540	720	810	990	1080

- In einem konischen 15-ml-Röhrchen werden die folgenden Volumina zu 80 % EtOH entsprechend der geplanten Batchgröße gemischt. Ein Überschuss für die Nutzung in der Wanne ist inbegriffen. Mischen Sie mit dem Vortexmischer.

Reagenz	6 Proben (ml)	12 Proben (ml)	16 Proben (ml)	18 Proben (ml)	22 Proben (ml)	24 Proben (ml)
100 % Ethanol, rein (200 Proof)	4	8	8	12	12	12
Nukleasefreies Wasser	1	2	2	3	3	3



### VORSICHT

Diese Reagenzien enthalten potenziell gesundheitsschädliche Chemikalien. Personen können sich durch Einatmen, Verschlucken oder durch Kontakt mit der Haut oder den Augen verletzen. Tragen Sie eine dem Expositionsrisiko entsprechende Schutzausrüstung, insbesondere Schutzbrille, Handschuhe und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie in den Sicherheitsdatenblättern (SDS) unter [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

## Tagmentierung genomischer DNA

In diesem Schritt wird das Bead-Linked Transposomes PCR-Free (BLT-PF) zur Markierung der DNA eingesetzt, ein Prozess, bei dem die DNA fragmentiert und mit Adaptersequenzen getagt wird.

### Verbrauchsmaterialien

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

## Verfahren

1. Bestätigen, dass der Mikroproben-Inkubator mit MIDI-Platteneinsatz auf 47 °C vorgeheizt wurde.
2. Eine neue 96-Well-MIDI-Platte mit „LP1“ (Library Plate 1) beschriften.
3. Proben-Well-IDs zur Kennzeichnung von verdünnten DNA-Proben und Reagenzien zuweisen und notieren.
4. 25 µl verdünnte Proben-DNA in jeden Well transferieren.
5. 10 µl TB1 zu jedem Well hinzufügen.
6. Zum Resuspendieren BLT-PF 1 Minute lang kräftig vortexen. Nicht zentrifugieren. Bei Bedarf wiederholen.
7. 15 µl BLT-PF zu jedem Well hinzufügen.
8. LP1 versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.
9. LP1 8 Minuten lang in dem auf 47 °C vorgewärmten Mikroproben-Inkubator inkubieren.

**HINWEIS** Es ist mit leichter Kondensation an der Plattenversiegelung zu rechnen. Nicht zentrifugieren.

10. Verschlussfolie entfernen und 10 µl ST2 in jeden Well zugeben.
11. LP1 versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln. Fahren Sie dann mit dem nächsten Schritt fort.

## Reinigung nach der Tagmentierung

Mit den folgenden Schritten wird ungebundene DNA entfernt und ein Pufferaustausch in Vorbereitung auf den nächsten Schritt durchgeführt.

## Verbrauchsmaterialien

- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2)
- Wanne

## Allgemeines zu Reagenzien

- TWB2 Langsam pipettieren, um Schaumbildung zu minimieren.
- RSB und TWB2 sind in ähnlichen Röhrchen verpackt. Lesen Sie vor der Verwendung jedes Etikett sorgfältig durch.

## Verfahren

1. Die Verschlussfolie entfernen und LP1 auf einem Magnetstativ platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (ca. 2 Minuten).
2. TWB2-Wanne mit Volumen gemäß nachfolgender Tabelle vorbereiten und als TWB2-Wanne deutlich beschriften. Die Volumina umfassen einen Überschuss von 1 ml für das Totvolumen. Stellen Sie die Wanne für spätere Schritte zur Seite.

Reagenz	6 Proben (µl)	12 Proben (µl)	16 Proben (µl)	18 Proben (µl)	22 Proben (µl)	24 Proben (µl)
TWB2	3700	6400	8200	9100	10900	11800

- LP1 auf dem Magnetstativ belassen und mit einer auf 60 µl eingestellten Mehrkanalpipette den Überstand aus jedem Bibliotheks-Well ohne Berührung des Bead-Pellets entfernen und entsorgen.
- Mit einer Mehrkanalpipette 150 µl TWB2 in jeden Well geben.
- LP1 versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.
- Die Verschlussfolie entfernen und LP1 auf einem Magnetstativ platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (ca. 2 Minuten).
- Während der Inkubation BLT-PF wieder gefroren lagern und mit dem nächsten Schritt fortfahren.

## Ligation von Indizes

In diesem Abschnitt ligieren die Benutzer die eindeutigen doppelten Index-Adapter an jede Probe gemäß der während der [Batchplanung und Lauferstellung auf Seite 16](#).

## Verbrauchsmaterialien

- ELM (Extension Ligation Mix)
- Index-Adapter (UDI PCR-Free (32 Indexes))
- TWB2 (Tagmentation Wash Buffer 2) Wanne
- 0,2 N NaOH (verdünnte HP3)

## Allgemeines zu Reagenzien

- Die Indexplatten-Wells können nicht wiederverwendet werden.
- Aufgrund der Viskosität der Lösung ELM langsam aspirieren und abgeben.
- RSB und TWB2 sind in ähnlichen Röhrchen verpackt. Lesen Sie vor der Verwendung jedes Etikett sorgfältig durch.

## Verfahren

- LP1 auf dem Magnetstativ halten und die folgenden Schritte ausführen:
  - Mit einer auf 150 µl eingestellten Pipette den Überstand aus den einzelnen Wells entnehmen und entsorgen.
  - Ohne das Bead-Pellet zu berühren, den Überstand von TWB2 aus jedem Proben-Well mit einer 20 µl-Pipette entfernen und entsorgen.
  - 45 µl ELM zu jedem Well hinzufügen.
  - Die Foliendichtung auf der Indexadapterplatte für jede der geplanten Index-Wells mit einer P200 Mehrkanalpipette und neuen Pipettenspitzen durchstechen. Um eine Kontamination zu vermeiden, für jeden Well eine neue Pipettenspitze verwenden.

- e. Fügen Sie den entsprechenden Proben-Wells der LP1 gemäß den bei der Batchplanung gewählten Indizes mittels einer P-10- oder P-20- Mehrkanalpipette 5 µl Indexadapter hinzu.
2. LP1 versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.
3. LP1 8 Minuten lang in dem auf 47 °C vorgewärmten Mikroproben-Inkubator inkubieren.

**HINWEIS** Es ist mit leichter Kondensation an der Plattenversiegelung zu rechnen. Nicht zentrifugieren.

4. ELM während der Inkubation wieder gefroren aufbewahren.
5. Die Verschlussfolie entfernen und LP1 auf einem Magnetstativ platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (ca. 2 Minuten).
6. LP1 auf dem Magnetstativ belassen und mit einer auf 50 µl eingestellten Mehrkanalpipette den Überstand aus jedem Bibliotheks-Well ohne Berührung des Bead-Pellets entfernen und entsorgen.
7. Führen Sie Waschläufe für Beads wie folgt durch.
  - a. Mit einer Mehrkanalpipette 150 µl TWB2 auf die Beads in jedem Well geben.
  - b. LP1 versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.
  - c. Die Verschlussfolie entfernen und LP1 auf einem Magnetstativ platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (ca. 2 Minuten).
  - d. LP1 auf dem Magnetstativ belassen und mit einer auf 150 µl eingestellten Mehrkanalpipette den Überstand aus jedem Bibliotheks-Well ohne Berührung des Bead-Pellets entfernen und entsorgen.
8. Führen Sie einen **zweiten** Waschlauf für die Beads durch.
9. LP1 auf dem Magnetstativ belassen und mit einer auf 20 µl eingestellten Mehrkanalpipette den Überstand von TWB2 aus jedem Bibliotheks-Well ohne Berührung des Bead-Pellets entfernen und entsorgen.
10. 45 µl des zuvor vorbereiteten 0,2 N NaOH in jeden Well hinzugeben.
11. LP1 versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln. Fahren Sie dann mit dem nächsten Abschnitt fort.

## Größenauswahl und Bereinigung von Bibliotheken

In diesem Schritt werden die Größen von Bibliotheken zu beiden Seiten ausgewählt. Im ersten Schritt wird Cleanup Beads zu den eluierten Bibliotheken und den BLT-PF-Beads hinzugefügt. Anschließend wird der Überstand mit der eluierten einsträngigen Bibliothek auf eine neue Platte übertragen, wobei zu große Fragmente zurückbleiben. Im zweiten Schritt werden Cleanup Beads zu den übertragenen Bibliotheken hinzugefügt und zu kleine Fragmente entfernt. Anschließend werden die Bibliotheken eluiert und auf die abschließende Bibliotheksplatte (FLP) übertragen.

## Verbrauchsmaterialien

- 96-Well-MIDI-Platte
- Wannen (3)

- PCR-Platte
- CB (Cleanup Beads)
- RSB (Resuspension Buffer)
- Frisch zubereitetes Ethanol, 80 % (80 % EtOH)

## Vorbereitung

1. CB mit dem Vortexer mischen und anschließend bis zur vollständigen Resuspendierung invertieren.
2. CB-Wanne mit Volumen gemäß nachfolgender Tabelle vorbereiten und Wanne mit CB beschriften. Die Volumina reichen für beide Zugabeschritte aus und enthalten 1 ml Überschuss in der Wanne für das Totvolumen der Wanne. Zwischen den CB-Zugabeschritten muss nicht gemischt werden. Die Beads bleiben für die Dauer des Verfahrens dispergiert.

Reagenz	6 Proben (µl)	12 Proben (µl)	16 Proben (µl)	18 Proben (µl)	22 Proben (µl)	24 Proben (µl)
CB	1480	1960	2280	2440	2760	2920

## Verfahren

1. Entfernen Sie die Versiegelung und geben Sie 40 µl CB in die Wells der LP1 MIDI-Platte mit BLT-PF und 0,2 N NaOH.
2. LP1 versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.
3. LP1 vom Magnetstativ entfernen und 2 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Die Verschlussfolie entfernen und LP1 auf einem Magnetstativ platzieren und warten, bis die Flüssigkeit klar ist (ca. 5 Minuten).
5. Während die Platte inkubiert, eine neue 96-Well MIDI Platte LP2 beschriften.
6. 80 µl Überstand aus LP1 auf dem Magnetstativ mit einer Mehrkanalpipette in die entsprechenden Wells von LP2 *transferieren*.
7. 40 µl CB zu jedem Well der MIDI-Platte hinzufügen.
8. LP2 versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.
9. Die LP1-MIDI-Platte entsorgen.
10. LP2 vom Magnetstativ entfernen und 2 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubieren
11. Entfernen Sie die Versiegelung und platzieren Sie LP2 auf einem Magnetstativ und warten Sie, bis die Flüssigkeit klar ist (ca. 5 Minuten).
12. Belassen Sie LP2 auf dem Magnetstativ und entfernen und entsorgen Sie mit einer auf 120 µl eingestellten Mehrkanalpipette den Überstand aus jedem Well ohne eine Berührung des Bead-Pellets.
13. Bereits vorbereitetes 80 %iges EtOH in eine beschriftete Wanne gießen und wie folgt mit LP2 auf Magnet waschen.
  - a. Mit einer Mehrkanalpipette 180 µl 80 % EtOH zugeben.

- b. Warten Sie 30 Sekunden.
  - c. Stellen Sie eine Mehrkanalpipette auf 180 µl ein und entfernen und entsorgen Sie damit den Überstand aus jedem Well ohne Berührung des Bead-Pellets.
14. Führen Sie einen **zweiten** Waschlauf für die Beads durch.
  15. Belassen Sie LP2 auf dem Magnetstativ und entfernen und entsorgen Sie mit einer auf 20 µl eingestellten Mehrkanalpipette das restliche EtOH aus jedem Well ohne eine Berührung des Bead-Pellets.
  16. LP2 auf dem Magnetstativ 4 Minuten lang an der Luft trocknen lassen.
  17. Nicht verwendetes 80 % EtOH und Wanne entsorgen.
  18. RSB-Wanne mit Volumen gemäß nachfolgender Tabelle vorbereiten und Wanne mit RSB beschriften. Die Volumina umfassen einen Überschuss von 1 ml für das Totvolumen.

Reagenz	6 Proben (µl)	12 Proben (µl)	16 Proben (µl)	18 Proben (µl)	22 Proben (µl)	24 Proben (µl)
RSB	1390	1780	2040	2170	2430	2560

19. 65 µl RSB auf die Beads in jeder Vertiefung geben.
20. LP2 versiegeln und 1 Minute lang bei 1800 U/min schütteln.
21. LP2 bei Raumtemperatur 2 Minuten lang inkubieren.
22. Entfernen Sie die Versiegelung und platzieren Sie LP2 auf einem Magnetstativ und warten Sie, bis die Flüssigkeit klar ist (2 Minuten).
23. Beschriften Sie eine neue PCR-Platte FLP (Final Library Plate) mit dem Batchnamen, der bei der Lauferstellung verwendet wird.
24. 60 µl Überstand aus LP2 auf dem Magnetstativ mit einer Mehrkanalpipette in die entsprechenden Wells von FLP *transferieren*.



### VORSICHT

Der Überstand enthält die endgültige Bibliothek und wird während des Poolens und Denaturierens verwendet. Nicht entsorgen.

25. Entsorgen Sie alle Wannen zusammen mit nicht verwendeten Reagenzien in Wannen
26. Entsorgen Sie die LP2-MIDI-Platte.

### SICHERER HALTEPUNKT

Wenn Sie das Gerät anhalten, versiegeln Sie die abschließende Bibliotheksplatte (FLP) mit Microseal B und lagern diese bis zu 14 Tage bei -25 °C bis -15 °C.

## Poolen und Denaturieren von Bibliotheken

In diesem Abschnitt erstellen Benutzer die Pools, die in [Batchplanung und Lauferstellung auf Seite 16](#) geplant wurden, und verdünnen und denaturieren diese.

## Verbrauchsmaterialien

- HP3 (2N NaOH) oder 0,2 N NaOH, falls am selben Tag vorbereitet, vortexen und dann kurz zentrifugieren.
- NB (Neutralization Buffer): Mit dem Vortexer mischen und anschließend kurz zentrifugieren.
- RSB (Resuspension Buffer): Zum Mischen vortexen oder umdrehen.
- Mikrozentrifugenröhrchen (1 für die Reagenzienvorbereitung und 1 für jeden geplanten Bibliothekspool)
- NovaSeq 6000Dx-Bibliotheksröhrchen (Artikel-Nr. 20062290 oder 20062291) (1 Röhrchen für jeden geplanten Bibliothekspool)

## Vorbereitung

1. Mischen Sie folgende Volumen in einem Mikrozentrifugenröhrchen zur Vorbereitung von 0,2 N NaOH. Beschriften Sie das Röhrchen mit 0,2 N NaOH. Wenn zusätzliches 0,2 N NaOH während der Library Prep (Bibliotheksvorbereitung) vorbereitet wurde und das Protokoll am selben Tag durchgeführt wird, überspringen Sie diesen Schritt.

Um kleine Pipettierfehler zu vermeiden, wird ein zusätzliches Volumen vorbereitet.

Reagenz	Volumen für eine S2-Fließzelle (µl)	Volumen für eine S4-Fließzelle (µl)
HP3	5	10
RSB	45	90

2. Mit dem Vortexer mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

## Verfahren

1. Wenn die FLP-Platte gefroren gelagert wurde, bereiten Sie diese wie folgt vor. Andernfalls fahren Sie mit Schritt 2 fort.

FLP-Platte:

- a. 30 Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen lassen.
  - b. Zentrifugieren Sie 1 Minute lang bei 1.000 × g.
  - c. Entfernen Sie die Verschlussfolie von der FLP.
  - d. 5 bis 10 Mal unter Verwendung einer auf 30 µl eingestellten Multikanalpipette pipettieren.
  - e. Versiegeln und 1 Minute lang bei 1.000 × g zentrifugieren.
2. Wählen Sie eine der folgenden Optionen aus, um die Bibliotheken für jeden Satz von 6 oder 16 Proben, die für die Sequenzierung geplant sind, zu poolen, zu denaturieren und zu verdünnen.
 

**Option 1** 6 Bibliotheken auf S2-Fließzelle sequenzieren.

    - a. Für jeden Bibliothekspool ein neues Mikrozentrifugenröhrchen mit dem Poolnamen beschriften, z. B. gepoolte Bibliotheken (PL) 1, 2, 3 usw.

- b. Entfernen Sie die Verschlussfolie und übertragen Sie 25 µl jeder DNA-Bibliothek, die mit einem Barcode versehen ist, von einem bestimmten S2-Indexsatz aus der FLP-Platte in das PL-Röhrchen für jeden entsprechenden geplanten Lauf gemäß den Sequenzierungspools, die während der *Batchplanung und Lauferstellung auf Seite 16*. Kombinieren Sie beispielsweise Bibliotheken, die mit dem S2-Indexsatz 1 erstellt wurden, in das PL-Röhrchen.
- c. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der FLP-Platte an und lagern Sie diese ein.
- d. Fügen Sie jedem PL-Röhrchen 37 µl 0,2 N NaOH hinzu.
- e. Mischen Sie jedes PL-Röhrchen mit dem Vortexer. Zentrifugieren Sie kurz.
- f. Inkubieren Sie jedes PL-Röhrchen 8 Minuten lang bei Raumtemperatur.
- g. Fügen Sie jedem PL-Röhrchen 38 µl NB hinzu.
- h. Mischen Sie jedes PL-Röhrchen mit dem Vortexer. Zentrifugieren Sie kurz.
- i. Übertragen Sie 225 µl der denaturierten, verdünnten Bibliothek in ein sauberes NovaSeq 6000Dx-Bibliotheksröhrchen.

**VORSICHT**

Falls zuvor angegeben, wird die NovaSeq 6000Dx-Bibliotheksröhrchen-ID für die Erkennung und Zuordnung des geplanten Laufs verwendet. Stellen Sie sicher, dass die Bibliotheksröhrchen-ID, in die der Pool transferiert wird, dieselbe Bibliotheksröhrchen-ID ist, die bei Erstellung eines Laufs angegeben wurde, da sonst Probenergebnisse falsch zugeordnet werden können. Wenn die Bibliotheksröhrchen-ID im geplanten Lauf angegeben ist, bestätigen Sie, dass das richtige Röhrchen verwendet wird. Falls zuvor nicht angegeben, notieren Sie die verwendete Bibliotheksröhrchen-ID und überarbeiten Sie den geplanten Lauf. Andernfalls muss/müssen der/die zugehörige(n) geplante(n) Lauf/Läufe beim Laden des Geräts unter Verwendung des Laufnamens manuell ausgewählt werden.

**Option 2** 16 Bibliotheken auf S4-Fließzelle sequenzieren.

- a. Beschriften Sie ein neues Mikrozentrifugenröhrchen mit dem Poolnamen, z. B. gepoolte Bibliotheken (PL) 1, 2, 3 usw.
- b. Entfernen Sie die Verschlussfolie und übertragen Sie 18 µl jeder DNA-Bibliothek von der FLP-Platte in das PL-Röhrchen gemäß dem Sequenzierungspool, der während der *Batchplanung und Lauferstellung auf Seite 16* geplant wurde. Kombinieren Sie beispielsweise Bibliotheken mit S4-Indexsatz 1 im PL-Röhrchen.
- c. Bringen Sie selbsthaftende Verschlussfolie an der FLP-Platte an und lagern Sie diese ein.
- d. Fügen Sie dem PL-Röhrchen 22 µl RSB hinzu.
- e. Fügen Sie dem PL-Röhrchen 77 µl 0,2 N NaOH hinzu.
- f. Mischen Sie das PL-Röhrchen mit dem Vortexer. Zentrifugieren Sie kurz.
- g. Inkubieren Sie das PL-Röhrchen 8 Minuten lang bei Raumtemperatur.
- h. Fügen Sie dem PL-Röhrchen 78 µl NB hinzu.
- i. Mischen Sie das PL-Röhrchen mit dem Vortexer. Zentrifugieren Sie kurz.

- j. Übertragen Sie 465 µl der denaturierten, verdünnten Bibliothek in ein sauberes NovaSeq 6000Dx-Bibliotheksröhrchen.

**VORSICHT**

Falls zuvor angegeben, wird die NovaSeq 6000Dx-Bibliotheksröhrchen-ID für die Erkennung und Zuordnung des geplanten Laufs verwendet. Stellen Sie sicher, dass die Bibliotheksröhrchen-ID, in die der Pool transferiert wird, dieselbe Bibliotheksröhrchen-ID ist, die bei Erstellung eines Laufs angegeben wurde, da sonst Probenergebnisse falsch zugeordnet werden können. Wenn die Bibliotheksröhrchen-ID im geplanten Lauf angegeben ist, bestätigen Sie, dass das richtige Röhrchen verwendet wird. Falls zuvor nicht angegeben, notieren Sie die verwendete Bibliotheksröhrchen-ID und überarbeiten Sie den geplanten Lauf. Andernfalls muss/müssen der/die zugehörige(n) geplante(n) Lauf/Läufe beim Laden des Geräts unter Verwendung des Laufnamens manuell ausgewählt werden.

3. Fahren Sie direkt mit der Sequenzierung fort, wenn Sie planen, den Lauf am selben Tag zu starten.

**SICHERER HALTEPUNKT**

Wenn Sie den Vorgang stoppen, verschließen Sie das NovaSeq 6000Dx-Bibliotheks--Röhrchen mit der Kappe und lagern Sie es bis zu 30 Tage lang bei -25 °C bis -15 °C.

## Vorbereitung für die Sequenzierung

1. Befolgen Sie die Vorbereitungsanweisungen in der NovaSeq 6000Dx Instrument-Produktdokumentation (Dokument-Nr. 200010105) für die Verbrauchsmaterialien in dem für die Sequenzierung vorgesehenen Kit.
2. Wenn das NovaSeq 6000Dx-Bibliotheksröhrchen mit der gepoolten Bibliothek gefroren gelagert wurde, wie folgt vorbereiten. Wenn Sie direkt vom vorherigen Abschnitt fortfahren, fahren Sie mit **3** fort.
  - a. 30 Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen lassen.
  - b. Kappe entfernen und vorsichtig fünfmal mit einer P1000-Pipette auf 300 µl für den S4-Fließzell-Bibliothekspool oder einer P200-Pipette auf 145 µl für den S2-Fließzell-Bibliothekspool mischen.
  - c. Das NovaSeq 6000Dx-Bibliotheksröhrchen verschließen und alle Tropfen von Hand nach unten schütteln. Nicht vortexen oder zentrifugieren.
3. Verbrauchsmaterialien laden. Siehe NovaSeq 6000Dx Instrument-Produktdokumentation (Dokument-Nr. 200010105) für weitere Details dazu.

## Interpretation der Ergebnisse

TruSight Whole Genome ist für die Sequenzierung des menschlichen Gesamtgenom ausgelegt. Es gibt Varianten für Proben aus, die analytische Qualitätskontrollen (QC) bestehen, damit sie in nachgelagerten Keimbahnanwendungen für eine tertiären Analyse verwendet werden können.

- Ein Qualitätsergebnis in Bezug auf die Sequenzierung, FASTQ oder die Proben ist nur dann gültig, wenn die Qualitätsmetrik die definierte Spezifikation erfüllt oder übertreffen. Wenn die Qualitätsmetrik unter der definierten Spezifikation liegt, wird die Leistung als FAIL (fehlgeschlagen) ausgegeben und die Probe muss wiederholt werden. Informationen zu den Qualitätsmetrikspezifikationen, die zur Bestimmung der Gültigkeit von Proben verwendet werden, finden Sie unter [Qualitätskontrollen auf Seite 34](#).
- Bei Proben, die alle Qualitätsschwellenwerte übertreffen, wird von einer Leistung der Varianten-Calls ausgegangen, wie sie in der Genauigkeitsstudie beschrieben ist (siehe [Genauigkeit auf Seite 48](#)).
- Kleine Varianten werden basierend auf der erwarteten Leistung jedes Variantentyps mit hoher, mittlerer oder niedriger Konfidenz kommentiert (siehe [Bestimmung der Konfidenzstufe kleiner Varianten auf Seite 43](#)).
- Die Interpretation aller Informationen zu Varianten muss durch das Labor anhand der bereitgestellten Analyseausgabedateien validiert werden. Eine Beschreibung der Informationen in den Ausgabedateien finden Sie unter TruSight Whole Genome Analysis Application Handbuch (Dokument-Nr. 200049931).

## Qualitätskontrollen

Sequenzierungslauf und Probenvalidität werden automatisch mithilfe analytischer Kontrollen bestimmt und von der TruSight Whole Genome Analysis Application als Bericht ausgegeben (weitere Einzelheiten zu den Spezifikationen der Qualitätskontrollmetrik finden Sie in [Tabelle 8](#)). TruSight Whole Genome benötigt dafür keine externen Positivkontrollen.

- Die QC-Ergebnisse werden in einem konsolidierten Bericht, für alle Proben in einem Lauf, und als QC-Berichte für einzelne Proben berichtet. Die Software speichert die Berichte im Analyseordner. Siehe TruSight Whole Genome Analysis Application Handbuch (Dokument-Nr. 200049931) für den Speicherort des Analyseordners und des Laufordners.
- Durch das Fehlschlagen der Qualitätskontrollspezifikation des Sequenzierungslaufs wird der Sequenzierungslauf ungültig und die zusätzliche Analyse gestoppt.
- Durch das Fehlschlagen einer FASTQ- oder Bibliotheksspezifikation wird die Probenbibliothek ungültig und die Ausgabe der zugehörigen CRAM- oder VCF-Dateien wird verhindert.
- Es können weitere Qualitätskontrollmaßnahmen in Übereinstimmung mit den örtlichen, staatlichen und/oder bundesbehördlichen Vorschriften oder Zulassungsanforderungen erforderlich sein.

Weitere Informationen zur Wiederholung von Sequenzierungsläufen oder Bibliotheksvorbereitung finden Sie unter [Fehlerbehebung auf Seite 76](#).

Tabelle 8 TruSight Whole Genome Beschreibung der Qualitätskontrollmetriken

	<b>Metrik</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Beschreibung</b>
Sequenzierungslauf-QC	Gesamt % $\geq$ Q30	$\geq 85$	Messung der Basenqualität auf Lafebene. Es gibt eine spezifizierte Mindestanforderung, da zu niedrige %Q30-Läufe die Q30-Basen in der Probenbibliothek-QC nicht bestehen lassen.
FASTQ-QC	Ergebnis pro Probe (bps)	$\geq 90.000.000.000$	Das Minimum ist so eingestellt, dass es der ~26-fachen durchschnittlichen Autosomen-Coverage entspricht, für eine Triage der Proben, die die Bibliotheks-QC nicht bestehen, um die Analysezeit zu reduzieren.

	<b>Metrik</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Beschreibung</b>
Probenbibliotheks- QC	Durchschnittliche Autosomen-Coverage	≥ 35	Durchschnittliche Coverage der Autosomen. Es gibt eine spezifizierte Mindestanforderung, um die analytische Leistung sicherzustellen.

Metrik	Spezifikation	Beschreibung
Autosomen % mit einer Coverage über 20X	≥ 93,94	Maß für die Gleichförmigkeit der Coverage, mit dem Probleme erkannt werden, die nicht unbedingt mit dem GC-Bias zusammenhängen. Es gibt eine spezifizierte Mindestanforderung, um die analytische Leistung sicherzustellen.

Metrik	Spezifikation	Beschreibung
Normalisierte Coverage bei 60 % bis 79 % der GC-Klassen	$0,82 \leq x \leq 1,13$	Maß für die Gleichförmigkeit der Coverage, mit dem GC-Bias erkannt wird, insbesondere einen Verlust der Coverage in Bereichen des Genoms mit höherer %GC- und niedrigerer %AT-Basenzusammensetzung. Es gibt eine spezifizierte Mindest- und Maximalanforderung, um die analytische Leistung sicherzustellen.

Metrik	Spezifikation	Beschreibung
Normalisierte Coverage bei 20 % bis 39 % der GC-Klassen	$0,97 \leq x \leq 1,06$	Maß für die Gleichförmigkeit der Coverage, mit dem GC-Bias erkannt wird, insbesondere einen Verlust der Coverage in Bereichen des Genoms mit niedrigerer p%GC- und höherer %AT-Basenzusammensetzung. Es gibt eine spezifizierte Mindest- und Maximalanforderung, um die analytische Leistung sicherzustellen.
Durchschnittliche Mitochondrien-Coverage	$\geq 500$	Coverage des mitochondrialen Chromosoms. Es gibt eine spezifizierte Mindestanforderung, um die mitochondriale SNV-Nachweisgrenze sicherzustellen.
Prozent der Q30-Basen	$\geq 85$	Messwert zur Basenqualität. Es gibt eine spezifizierte Mindestanforderung, um die analytische Leistung sicherzustellen.
Geschätzte Probenkontamination	$\leq 0,005$	Erkennt kontaminierende Reads von anderen Proben. Es gibt eine spezifizierte maximale Anforderung, um die mitochondriale SNV-Nachweisgrenze (der Variantentyp mit der höchsten Empfindlichkeit für eine Kontamination) sicherzustellen.

## Leistungsmerkmale

Die folgenden Validierungsstudien wurden unter Verwendung des in der [Gebrauchsanweisung auf Seite 16](#) beschriebenen TruSight Whole Genome-Workflows durchgeführt und sind dafür ausgelegt, die Robustheit des Assays gegenüber häufigen Variationsquellen zu gewährleisten und Empfehlungen für eine konsistente

Leistung zu geben. In diesen Studien wurden die in [Tabelle 8](#) beschriebenen analytischen QC-Metrikspezifikationen als Benchmark für eine erfolgreiche Assay-Leistung und als Voraussetzung für die Festlegung der analytischen Varianten-Call-Leistung verwendet.

## Kreuzkontamination

In der Kreuzkontaminationsstudie wurde eine falsche Index-Read-Erkennung aufgrund von Well-zu-Well-Kontamination während der Vorbereitung der Probenbibliothek und einer Lauf-zu-Lauf-Kontamination zwischen aufeinanderfolgenden Sequenzierungsläufen bewertet. Zur Bewertung der Kreuzkontamination wurden 24 Blutproben verwendet. Insgesamt wurden 24 Bibliotheken von jeweils zwei Bedienern unter Verwendung der S2-Konfigurationsindexsätze 1–4 vorbereitet, dann wurden gepoolte Bibliotheken in der Reihenfolge des Indexsatzes auf einem NovaSeq 6000Dx Instrument sequenziert. 16 Bibliotheken wurden jeweils von zwei Bedienern unter Verwendung der S4-Konfigurationsindexsätze 1 und 2 in zwei Replikaten vorbereitet, und gepoolte Bibliotheken mit alternierenden Indexsätzen wurden auf demselben sequenziert NovaSeq 6000Dx.

Zur Beurteilung der Kreuzkontamination wurden die korrekten Indexwerte mit den Indexwerten von benachbarten Wells für Well-zu-Well-Kontamination und dem vorherigen Sequenzierungslauf für Lauf-zu-Lauf-Kontamination verglichen. Die prozentuale Lauf-zu-Lauf-Kontamination betrug  $\leq 0,003178\%$  für S2-Läufe und  $\leq 0,002487\%$  für S4-Läufe. Zur Bewertung der Probenkontamination wurde die QC-Metrik der Probenbibliothek für die geschätzte Probenkontamination herangezogen. Der Anteil der Probe-zu-Probe-Kontamination lag bei 0,001, dem niedrigsten von der Analysesoftware ausgegebenen Wert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein geringes Kontaminationsrisiko innerhalb der Bibliotheksvorbereitungs- und Sequenzierungsworkflows besteht.

## Anbruch- und Zwischenstabilität

Die Reagenzien zur Bibliotheksvorbereitung wurden während der Verwendung des Kits auf Stabilität untersucht, einschließlich mehrerer Einfrier-Auftau-Ereignisse und der Anbruchstabilität von geöffneten Röhren.

Für die Einfrier-Auftau-Zyklustests wurden die gefrorenen Komponenten fünf Einfrier-Auftau-Ereignissen unterzogen, die für ein Ereignis für das Auspacken und für vier Ereignisse für die Kitverwendung standen. Für die Anbruchstabilität wurde das zur Vorbereitung von sechs Probenbibliotheken erforderliche Volumen bei drei Einfrier-Auftau-Zyklen jeweils entfernt, um die Volumendepletion während des Gebrauchs zu simulieren, und die Komponenten wurden für weitere 31 Tage vor dem Test gelagert. Nach dem Test mit gDNA, die von sechs Blutspendern extrahiert wurde, bestanden alle Daten die analytischen Kontrollmetriken des Assays. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass gefrorene Bibliotheksvorbereitungsreagenzien mit bis zu vier Einfrier-Auftau-Zyklen und einer Anbruchstabilität von 30 Tagen verwendet werden können.

Die Zwischenstabilität wurde für die einzelnen Bibliotheken und die gepoolten und denaturierten Bibliotheken bewertet. Alle Daten bestanden analytische Assay-Kontrollmetriken, die für eine Stabilität von bis zu 14 Tagen

für die einzelnen Bibliotheken und für eine Stabilität von bis zu 30 Tagen für die gepoolten und denaturierten Bibliotheken bei gefrorener Lagerung (-25 °C bis -15 °C) sprechen, wie in den sicheren Haltepunkten angegeben.

## Entnahme und Aufbewahrung von Blutproben

Die Kompatibilität der Blutentnahmeröhrchen und die Lagerung der Proben wurden mit vier Spendern untersucht und Blut wurde in EDTA-Entnahmeröhrchen von drei verschiedenen Lieferanten entnommen. Die genomische DNA (gDNA) wurde bei Ankunft jeweils für den Null-Zeitpunkt extrahiert und dann erneut nach der Aufbewahrung des Blutes für 16, 33 bzw. 43 Tage bei 2 °C bis 8 °C. Die extrahierte gDNA wurde gefroren (-25 °C bis -15 °C) im elution buffer (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA, pH 9,0) gelagert und anschließend quantifiziert und zur Bibliotheksvorbereitung und Sequenzierung verwendet. Alle Daten bestanden die analytischen Kontrollmetriken des Assays und sprechen daher für eine Assay-Kompatibilität mit drei verschiedenen EDTA-Blutentnahmeröhrchen und Blut, das bis zu fünf Wochen bei 2 °C bis 8 °C gelagert wurde.

## Beurteilung der DNA-Extraktionsmethode

Drei kommerziell erhältliche Extraktionskits wurden hinsichtlich der Assayleistung untersucht. Zwei Kits verwendeten magnetische Beads, eines mit und eines ohne Festphasen- und Zellulose-basierter Bindung, und ein Kit verwendete eine auf Siliciumdioxidmembran basierende Nukleinsäure-Aufreinigungsmethode mit Spin-Säulen ([Tabelle 9](#)).

Die Bewertung wurde von zwei Bedienern mit einer Charge Extraktionsreagenzien pro Methode und Vollblut, das in EDTA-Röhrchen von vier mutmaßlich gesunden Spendern entnommen wurde, durchgeführt. Jede Blutprobe wurde viermal gemäß den Anweisungen des Herstellers an nicht aufeinanderfolgenden Tagen für insgesamt 16 Beobachtungen pro Kit entnommen. Die extrahierte gDNA wurde verwendet, um Bibliotheken für Sequenzierung und Analyse vorzubereiten.

Alle Beobachtungen (16/16) für jede Extraktionsmethode bestanden die analytischen Testkontrollmetriken. Die Assayleistung wurde durch die Wahl der gDNA-Extraktionsmethode der Probe nicht beeinflusst. Die analytischen Genauigkeits- und Reproduzierbarkeitsstudien verwendeten gDNA, die mit Kit 3 extrahiert wurde (Isolierung der Siliciumdioxidfiltersäule mit Spin-Säulen).

Tabelle 9 Auf TruSight Whole Genome-Leistung getestete Extraktionsmethoden

Kit	Extraktionsmethode
1	Extraktion mit magnetischen Beads mit reversibler Festphasenimmobilisierung (SPRI)
2	Extraktion mit magnetischen Beads mit mobiler Festphase- und Zellulose-basierter Bindung
3	Isolation mittels Kieselgelsäule mit Spinsäulen

## DNA-Zugabe-Sensitivität

Die für den Test pro Probe empfohlene Menge an gDNA-Zugabe beträgt 280 ng oder 350 ng, abhängig von den unter [Empfehlungen für DNA-Zugaben auf Seite 11](#).

Um die Leistung über einen Bereich von gDNA-Zugabekonzentrationen zu bestimmen, wurde die im Assay verwendete DNA-Menge bei Konzentrationen von  $\pm 28,6$  % der empfohlenen Zugabe getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass  $-25$  % der empfohlenen gDNA-Zugabe eine Untergrenze für den Assay ist. Der Assay funktioniert ordnungsgemäß mit gDNA-Zugaben von bis zu  $+28,6$  % der empfohlenen Zugabe.

Die Charakterisierung von drei verschiedenen Quantifizierungsmethoden zeigte, dass verschiedene Methoden unterschiedliche Variabilitätsgrade aufweisen und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Wenn eine andere Methode als die in den [Empfehlungen für DNA-Zugaben auf Seite 11](#) aufgeführten Methoden verwendet wird, muss möglicherweise die Ziel-gDNA-Zugabe optimiert werden. Es wird empfohlen, gDNA für Proben, die für einen bestimmten Bibliotheksvorbereitung-Batch und einen Sequenzierungslauf vorgesehen sind, zusammen zu quantifizieren, um eine Batch-to-Batch-Variabilität nach Möglichkeit auszuschließen, oder Prozesskontrollen zu verwenden, damit eine Batch-to-Batch-Variabilität von  $\leq 25$  % für die gDNA-Quantifizierung gewährleistet ist.

## Störende Substanzen

In dieser Studie wurde die Leistung sowohl mit endogenen als auch mit exogenen Substanzen im Zusammenhang mit humanem Blut und Blutentnahmeröhrchen beurteilt. Bilirubin, Hämoglobin und Triglyzeride wurden zur Beurteilung ausgewählt, um ikterische, hämolysierte bzw. lipämische Proben zu simulieren. Biotin und EDTA wurden aufgrund des Vorhandenseins in Blut- und Blutentnahmeröhrchen (BCTs) und aufgrund möglicher Auswirkungen auf die Assay-Chemie zur Beurteilung ausgewählt. Die Substanzen wurden den Spenderblutproben vor der Entnahme entweder direkt oder nach dem Lösen in Lösungsmittel zugesetzt. Die Testkonzentration und Angaben zum Zusatz (Spike) jeder Substanz sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 10 Auf TruSight Whole Genome-Leistung geprüfte störende Substanzen

Substanz	Testkonzentration	Lösungsmittel in Spike-Lösung	% Spike zu Blut hinzugefügt
Bilirubin (unkonjugiert)	40 mg/dl (0,4 mg/ml) <sup>1</sup>	DMSO	4 %
Hämoglobin	1000 mg/dl (10 mg/ml) <sup>1</sup>	N. z. – im Blut gelöst	N. z. – im Blut gelöst
Triglyceride	1500 mg/dl (15 mg/ml) <sup>1</sup>	100 % Ethanol	4 %
Biotin	0,00351 mg/ml <sup>2</sup>	Wasser	4 %
EDTA	5,4 mg/ml <sup>3</sup>	Wasser	3 %

<sup>1</sup> Die Konzentrationen wurden gemäß den „Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry, CLSI EP37-ED1:2018“ als die höchsten beobachteten Konzentrationen gewählt.

<sup>2</sup> Die Konzentration wurde als das Dreifache der „Höchsten Wirkstoffkonzentration unter therapeutischer Behandlung“ ausgewählt, die in „Supplemental Tables for Interference Testing in Clinical Chemistry, CLSI EP37-ED1:2018“ angegeben ist.

<sup>3</sup> Die Konzentration wurde basierend auf der EDTA-Konzentration gewählt, die in Blutentnahmeröhrchen von bis zu 1,8 mg/ml variiert, und um ein kurzes Füllereignis zu simulieren, wurde eine Blutentnahme von 33 % des nominalen BCT-Volumens durchgeführt, was zu einer dreimal höheren EDTA-Konzentration im Blut führte und 5,4 mg/ml entspricht.

Es wurde Blut von vier Spendern für die Tests verwendet. Für jede Störsubstanz wurde ein Aliquot Vollblut von jedem Spender mit der Störsubstanz versetzt und dann auf vier gDNA-Extraktionsreplikate aufgeteilt. Eine Kontrolle wurde auf ähnliche Weise ohne Substanzzugabe durchgeführt. Die gepaarten Test- und

Kontrollbedingungen wurden für jeden Spender innerhalb desselben Extraktionsereignisses verarbeitet, und die extrahierte gDNA wurde dann innerhalb eines einzigen Bibliotheksvorbereitungs- und Sequenzierungsereignisses verarbeitet. Es gab keine Auswirkungen auf die Assay-Leistung und keine Hinweise auf Interferenzen als Reaktion auf eine der getesteten Substanzen.

## Gleichwertigkeit der Probenindexierung

TruSight Whole Genome bietet eine Auswahl mit Konfigurationen von vier 6-Plex-Indexsätzen für S2-Läufe oder von zwei 16-Plex-Indexsätzen für S4-Sequenzierungsläufe. Es wurde gezeigt, dass der Assay eine gleichwertige Leistung liefert, wenn Bibliotheken entweder in den S2- oder S4-Sequenzierungslaufkonfigurationen von NovaSeq 6000Dx sequenziert werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sowohl die S2- als auch die S4-Laufkonfigurationen > 95 % der Probenbibliotheken mit einer mindestens 35,0-fachen Coverage erreichen, wenn sie mit den vorgeschriebenen Indexsätzen getestet wurden. Somit können verschiedene zur Sequenzierung auf den S2- und S4-Fließzellen verwendete Indexsätze und das Pooling wechselweise verwendet werden, um eine Skalierbarkeit zu erreichen, mit der Schwankungen im Probendurchsatz ausgeglichen und Flexibilität in Laborprozessen geboten werden.

## Analyseleistung

Es wurden anfängliche Charakterisierungsstudien durchgeführt, um die Konfidenzstufen-Schwellenwerte für kleine Varianten, Leerwertgrenze/Nachweisgrenze für mitochondriale SNVs und Größen-Schwellenwerte für die genaue Erkennung von STR-Expansionen bei Verwendung des TruSight Whole Genome-Workflows zu bestimmen. Proben, die die von TruSight Whole Genome bewerteten Variantenklassen repräsentieren, wurden in die Bewertung der analytischen Genauigkeit und Wiederholbarkeit einbezogen, einschließlich der Präzision innerhalb des Labors und der externen Reproduzierbarkeit. Die analytische Leistung wird für Sequenzierungsläufe und Proben berichtet, die alle Qualitätskontrollen bestanden haben, mit Ausnahme der konstruierten Gemischproben, die zur Beurteilung mitochondrialer SNVs an oder nahe der Nachweisgrenze verwendet wurden, die die Kontaminationsmetrik nicht erfüllten. Die Ergebnisse für jede dieser Studien werden in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

### Erste Charakterisierungsstudien

#### Bestimmung der Konfidenzstufe kleiner Varianten

Für diese Studie wurde ein logistisches Regressionsmodell an hochgradig reproduzierbaren und schlecht reproduzierbaren Variantenstellen aus 96 Replikaten von NA12878 trainiert, um Schwellenwerte für hohe, mittlere und niedrige Konfidenzstufen zu definieren.

Basen mit hoher Konfidenz für einen bestimmten Variantentyp sind diejenigen, bei denen die vorhergesagte Reproduzierbarkeit innerhalb des Labors für einen bestimmten Score-Schwellenwert 99 % erreicht oder übertrifft, und wenn der Prozentsatz der Nicht-N-Basen, die dieses Kriterium erfüllen, 30 % überschreitet. Wenn ein kleiner Variantentyp keinen Score-Schwellenwert hat, der diese Kriterien erfüllt, hat dieser Variantentyp keine hohe Konfidenzstufe. Basen mit mittlerer Konfidenz sind diejenigen, bei denen die

vorhergesagte Reproduzierbarkeit innerhalb des Labors 95 % für einen gegebenen Score-Schwellenwert und Variantentyp erreicht oder übertrifft. Basen mit niedriger Konfidenz sind diejenigen, bei denen die vorhergesagte Reproduzierbarkeit innerhalb des Labors für einen gegebenen Score-Schwellenwert und Variantentyp unter 95 % liegt. Varianten-Calls für einen bestimmten Variantentyp mit einer hohen oder mittleren Konfidenzstufe, sind die Mehrzahl der %Nicht-N-Basen (d. h. ohne Lücken) (siehe Tabelle 6) und zeigen eine hohe Leistung, wenn sie anhand kleiner Varianten-Referenzsätze und in umfangreichen Untersuchungen der laborinternen Präzision von NA12878-Replikaten bewertet werden.

Variantentyp	Konfidenzstufe	% Nicht-N-Basen
SNV	Hoch	89,14 %
	Mittel	3,30 %
	Niedrig	7,56 %
Kurze Deletionen (1-5 bp)	Hoch	90,88 %
	Mittel	2,45 %
	Niedrig	6,67 %
Mittlere Deletionen (6-15 bp)	Mittel	86,94 %
	Niedrig	13,06 %
Lange Deletionen ( $\geq 16$ bp)	Mittel	85,42 %
	Niedrig	14,58 %
Kurze Insertionen (1-5 bp)	Hoch	88,94 %
	Mittel	4,61 %
	Niedrig	6,45 %
Mittlere Insertionen (6-15 bp)	Mittel	89,37 %
	Niedrig	10,63 %
Lange Insertionen ( $\geq 16$ bp)	Mittel	48,92 %
	Niedrig	50,63 %

### Bestimmung der mitochondrialen SNV-Leerwertgrenze/Nachweisgrenze

Es wurden Studien zu Leerwertgrenze (LoB) und Nachweisgrenze (LoD) für mitochondriale SNV durchgeführt. Für die mitochondriale SNV-Studie wurde die LOB anhand von Loci beurteilt, von denen bekannt ist, dass sie keine Variante aufweisen (d. h. Referenz-Call). Die LoD ist definiert als die Allelfrequenz der mtDNA-SNV-Variante, für die die Nachweisrate dieser Variante 95 % beträgt.

Um die LoB und LoD für den Nachweis heteroplasmischer mtSNVs zu bestimmen, wurden in einer Titrationsstudie sorgfältig charakterisierte gDNA-Proben von zwei verschiedenen Blutspendern auf fünf Verdünnungsstufen mit 20 Replikaten pro Verdünnungsstufe gemischt. Die Verdünnungsstufen wurden so konzipiert, dass sie auf die prozentualen Anteile der mtSNV-Variante (1,2-6 % VAF) abzielen, um verschiedene

Stufen der mitochondrialen Heteroplasmie nachzuahmen. Gemischte gDNA-Proben wurden verarbeitet und ein Downsampling der Reads vorgenommen, um eine durchschnittlich 500-fache Mitochondrien-Coverage zu erreichen. Insgesamt wurden 42 konstruierte „heteroplasmische“ Stellen in der nachgelagerten Bewertung berücksichtigt. Anhand einer Regressionsanalyse wurden die erforderlichen Mischverhältnisse für eine Subgruppe von mtSNVs geschätzt, um 1x LoD und 2x LoD zu erreichen.

Positionen, an denen die gDNA aus beiden Blutproben Referenz-Allel-Genotypen aufweisen, wurden auf mtSNV-Calls untersucht, die den Filter mit einem Nicht-Referenz-Allel bestanden haben. Die falsch-positive Rate wurde mit 0,8 % berechnet, was einer Null-LOB-Annahme gemäß den „Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures, CLSI EP17-A2-ED1:2012“ entspricht. Jede der 42 Positionen wurde unabhängig mittels Probit-Regression analysiert. Der LoD-Wert wurde definiert als der erwartete VAF-Wert, der der Nachweisrate von 95 % (C95) entspricht. Der insgesamt berichtete LoD-Wert, definiert als das 95. Perzentil der LoD-Werte aus den Referenzstandorten, betrug 4,75 % VAF. Der Mittelwert der Verteilung der absoluten Unterschiede zwischen beobachtetem und erwartetem VAF für alle Beobachtungen wurde mit 0,83 % mit einer oberen 95%igen Konfidenzgrenze von 0,86 % VAF berechnet.

## Bestimmung des STR-Expansionsschwellenwerts

Aufgrund technischer Einschränkungen der umspannenden STRs, die die Read-Länge der Sequenzierung (~135 bp) überschreiten, ist die mit TruSight Whole Genome beobachtete STR-Länge oft eine Unterschätzung der wahren Länge. Sobald die echte STR-Länge die mediane Fragmentlänge (~330 bp) überschreitet, stabilisiert sich die STR-Längenschätzung. Aus diesem Grund beurteilt TruSight Whole Genome einen Satz von Zielloci, für die der Assay STRs mit beobachteten Längen innerhalb der normalen Variation genau von solchen unterscheiden kann, deren Längen größer sind als in einer mutmaßlich gesunden Population („expandiert“ sind) (siehe [Tabelle 2](#) für eine Liste der Loci, die von TruSight Whole Genome beurteilt wurden).

Um eine negative prozentual Übereinstimmung (NPA) gesamt von 95 % über alle STR-Standorte hinweg zu gewährleisten, die von TruSight Whole Genome bewertet wurden, wurden die Schwellenwerte pro Loci für den Aufruf einem erweiterten STR an diesem Standort auf durchschnittlich 99,94 % NPA pro Standort festgelegt. Um die inhärente Variabilität der STR-Größenschätzungen innerhalb einer vermeintlich gesunden Population zu berücksichtigen, wurden Schwellenwerte basierend auf der Verteilung der unabhängig beobachteten STR-Längen im vermeintlich gesunden Datensatz des 1000 Genomes Project festgelegt (2.504 Proben aus verschiedenen Populationen, die mit DRAGEN 3.7.5 und ExpansionHunter 4.0.2 verarbeitet wurden).<sup>4</sup>

Um die mithilfe des 1000 Genomes Project-Datensatzes festgelegten Schwellenwerte zu bestätigen, wurde die extrahierte gDNA aus 16 Zelllinien-Referenzproben (aus dem Center for Disease Control's Genetic Testing Reference Material [Get-RM]-Programm) mit einer Vielzahl von unabhängig geschätzten STR-Größen mit TruSight Whole Genome verarbeitet. 10 Bibliotheksreplikate für jede der 16 Proben wurden von sechs Bedienern für insgesamt 960 Beobachtungen vorbereitet und getestet, und STR-Größen wurden unabhängig für jedes Replikat geschätzt. Die beobachtete falsch-positive Rate auf Probenebene über alle Zielloci betrug 0,35 %.

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde für die 28 STR-Zielloci geschätzt, wobei die Zelllinien auf der Grundlage der mit TruSight Whole Genome beobachteten Allelgrößen und der erwarteten Allelgrößen auf der Grundlage einer vorherigen unabhängigen Charakterisierung getestet wurden ([Tabelle 11](#)). Für ausgewählte Loci wurde eine

Nachweisgrenze für mehr als ein STR am gleichen Standort für insgesamt 35 STRs bestimmt. Die LoD ist die geschätzte Größe, bei der die erwartete STR-Expansion für 95 % der Allele anhand eines Probit-Modells mit den bestätigten Schwellenwerten zur Unterscheidung normaler und erweiterter STR-Größen nachgewiesen wird. Die Daten über alle Standorte mit bekannten Allelgrößen wurden gepoolt, um LoD-Schätzungen für jeden Standort basierend auf dem standortspezifischen Schwellenwert für einen erweiterten STR zu erhalten. Die FMR1-Repeat-Länge wurde im Vergleich zu anderen STRs systematisch unterschätzt und erforderte ein benutzerdefiniertes Modell, um die LoD richtig zu schätzen.

Bestätigte standortspezifische Schwellenwerte für erweiterte STRs, geschätzte erwartete und beobachtete LoD für bestimmte Standorte und die Krankheitsschwelle basierend auf der verfügbaren Literatur (nur zur Veranschaulichung) für bestimmte STR-Standorte sind in [Tabelle 11](#) angegeben. Bei STR-Expansionen, die länger sind als der Schwellenwert, der durch die Read-Länge vorgegeben ist und bei denen die erwartete Länge nicht direkt beobachtet werden kann, entspricht eine beobachtete Länge einer durchschnittlichen Länge, die über mehrere Sequenzierungsläufe zu beobachten wäre. Bei STR-Expansionen, die kürzer sind als der Schwellenwert, der durch die Read-Länge vorgegeben ist, sind die erwarteten und beobachteten Längen gleich.

**Tabelle 11** Zusammenfassung der geschätzten Nachweisfähigkeit für bestimmte TruSight Whole Genome-STR-Standorte

Ziellocus <sup>a</sup>	Erweiterter STR-Schwellenwert (bp) basierend auf dem 1000 Genomes Project-Datensatz	Geschätzte LoD (erwartete Länge, bp)	Geschätzte LoD (beobachtete Länge, bp)	Krankheitsschwelle (wahre Länge, 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>
ATXN7_GCC	93	101	101	N. z.
ATXN8OS	200	298	233	237 <sup>7,8</sup>
ATXN8OS_CTA	90	92	92	N. z.
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>

Ziellocus <sup>a</sup>	Erweiterter STR-Schwellenwert (bp) basierend auf dem 1000 Genomes Project-Datensatz	Geschätzte LoD (erwartete Länge, bp)	Geschätzte LoD (beobachtete Länge, bp)	Krankheitsschwelle (wahre Länge, bp) <sup>b</sup>
CNBP_CA	102	102	102	N. z.
CNBP_CAGA	68	80	80	N. z.
CSTB	200	298	233	348 <sup>12,13</sup>
DIP2B	200	298	233	N. z.
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	N. z.
GLS	111	115	115	270 <sup>17</sup>
HTT	108	115	115	120 <sup>18</sup>
HTT_CCG	42	42	42	N. z.
JPH3	99	101	101	123 <sup>19</sup>
NIPA1	33	33	33	N. z.
NOP56	84	84	84	3900 <sup>20,21</sup>
NOP56_CGCCTG	24	24	24	N. z.
NOTCH2NL	129	175	174	213 <sup>22,23</sup>
PABPN1	27	27	27	N. z.
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 mit alternativen STRs werden durch LOCI\_<ALTERNATE\_REPEAT> (z. B. ATXN7\_GCC) annotiert.

<sup>b</sup> Krankheitsschwellen, die nur zur Veranschaulichung genannt werden, basieren auf veröffentlichter Literatur; N. z. (Nicht zutreffend) in dieser Spalte zeigt an, dass die STR möglicherweise nicht mit einer veröffentlichten pathogenen Expansion assoziiert ist.

<sup>c</sup> 100 % der Replikate von NA23378 wiesen eine STR-Expansion in C9ORF72 nach, was auf eine zuvor nicht charakterisierte Expansion an diesem Standort in dieser Probe hindeutet. Diese Zelllinienprobe wurde von der Analyse ausgeschlossen.

<sup>d</sup> Mittlere Expansionen können auch mit einem Phänotyp assoziiert sein.

Diese Studie zeigte ähnliche Präzisions- und Genauigkeitsprofile für STR-Größenschätzungen über verschiedene Zielloci hinweg, wobei die Nachweisgrenze für STR-Expansionen weitgehend durch den ausgewählten Schwellenwert (basierend auf der Größenverteilung in der Population des 1000 Genomes Project) und nicht durch Unterschiede in der Nachweisfähigkeit über Standorte hinweg bestimmt wurde. Alle geschätzten LoD-Werte in der erwarteten Längenskala waren größer als die Längen, die bei mutmaßlich gesunden Populationen beobachtet wurden, und niedriger als viele veröffentlichte Krankheitsschwellenwerte;

somit können die mit der STR-Expansion assoziierten Calling-Schwellenwerte herangezogen werden, um die Wiederholung an einem bestimmten Locus als potenziell erweitert zu markieren. Die hier berichteten Schwellenwerte wurden verwendet, um die Genauigkeit des STR-Expansionsnachweises zu beurteilen.

## Genauigkeit

Die analytische Genauigkeit wurde bestimmt, indem TruSight Whole Genome-Varianten-Calls mit Ergebnissen verglichen wurden, die mit alternativen Methoden erzielt wurden. Referenzmethoden wurden auf der Grundlage eines beträchtlichen Unterschieds im Vergleich zum TruSight Whole Genome gewählt, das die Nextera™ Bibliotheksvorbereitung mit Bead-gebundenen Transposons, zweifarbige Sequenzierungsschemie auf dem NovaSeq 6000Dx und den Server DRAGEN 3.9.5 für Varianten-Calls verwendet. Ein repräsentativer Ansatz zur Validierung von TruSight Whole Genome wurde mit Proben aus klassenübergreifenden Varianten durchgeführt, die in der Assayausgabe enthalten sind. Insgesamt wurden 459 eindeutige Proben verwendet, die die analytische QC bestanden, um mit ihnen die Genauigkeit von TruSight Whole Genome zu messen. Die Proben wurden über drei Chargen von Reagenzien und Verbrauchsmaterialien zur Bibliotheksvorbereitung, vier Chargen von S4-Sequenzierungskits, acht Bediener, fünf NovaSeq 6000Dx Instrument-Geräte und zwei interne Standorte getestet. 31 unabhängige Bibliothekspools wurden vorbereitet und sequenziert.

Folgende Tabelle enthält die Definitionen der in den unterschiedlichen Studien berechneten Metriken.

Begriff	Definition
Niedrigeres Konfidenzniveau (LCL)	Einseitige 95 %ige untere Konfidenzgrenze laut Wilson-Methode.
Übereinstimmung negativer Ergebnisse in Prozent (NPA) <sup>1</sup>	Prozentualer Anteil der negativen Stellen, wie durch die Referenzmethode definiert, die übereinstimmend mit TruSight Whole Genome als negativ identifiziert werden.
Übereinstimmung positiver Ergebnisse in Prozent (PPA) <sup>2</sup>	Prozentsatz der in der Referenzmethode aufgerufenen Varianten, die übereinstimmend mit TruSight Whole Genome aufgerufen werden.
Technischer positiver Vorhersagewert (TPPV) <sup>3</sup>	Prozentsatz der mit TruSight Whole Genome aufgerufenen Varianten, die übereinstimmend mit der Referenzmethode aufgerufen werden.

<sup>1</sup> Für die Genauigkeit der STR-Expansionsdetektion und der SMN1-Alleldetektion, NPA = negativ / (negativ + falsch positiv).

<sup>2</sup> Für die Genauigkeit der STR-Expansionsdetektion und die Genauigkeit der SMN1-Alleldetektion, PPA = positiv / (positiv + falsch negativ).

<sup>3</sup> Für die Genauigkeit der STR-Expansionsdetektion und die Genauigkeit der SMN1-Alleldetektion, TPPV = positiv / (positiv + falsch positiv).

## Genauigkeit der kleinen Variante

Die Genauigkeit der Calls kleiner Varianten wurde anhand genomischer DNA beurteilt, die aus peripherem Vollblut von 195 mutmaßlich gesunden Spendern extrahiert wurde. TruSight Whole Genome-Varianten-Calls wurden mit Varianten-Calls aus einem klinisch validierten Gesamtgenomsequenzierungstest verglichen, der im

CLIA-Labor von Illumina Laboratory Services (ILS) als Referenzmethode durchgeführt wurde. Der Workflow der Referenzmethode für die Sequenzierung des gesamten Genoms verwendet eine Ligase-basierte TruSeq™ PCR-freie Bibliotheksvorbereitung, vierfarbige Sequenzierungschemie auf dem HiSeq™ Sequencing System und DRAGEN 3.8.4 für Varianten-Calls. Insertionen und Deletionen > 31 bp wurden in dieser Studie nicht charakterisiert, da sie nicht in der Referenzmethode validiert wurden.

Eine Zusammenfassung der Genauigkeit für alle kleinen Varianten-Calls ist in [Tabelle 12](#) und [Tabelle 13](#) dargestellt.

**Tabelle 12** TruSight Whole Genome Assay Genauigkeit für kleine Varianten, stratifiziert nach Konfidenzstufe und Größe (mit putativ gesunden Blutproben)

Variante Subtyp	Konfidenzstufe	Referenzmethode Konkordante Calls	Referenzmethode Exklusive Calls	Assay Konkordante Calls	Assay Exklusive Calls	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNVs	Hoch	261 728 580	1 573 877	261 603 149	208 639	99,4 % (99,4 %)	99,9 % (99,9 %)
	Mittel	6 677 589	421 718	6 519 811	151 128	94,1 % (94,0 %)	97,7 % (97,7 %)
	Niedrig	6 864 840	3 251 709	6 649 756	2 151 388	67,9 % (67,8 %)	75,6 % (75,5 %)
Kurze Deletion (1–5 bp)	Hoch	11 978 745	201 783	12 246 922	67 277	98,3 % (98,3 %)	99,5 % (99,5 %)
	Mittel	2 875 258	45 290	3 050 170	47 593	98,4 % (98,4 %)	98,5 % (98,5 %)
	Niedrig	1 802 544	228 582	1 966 974	221 449	88,7 % (88,7 %)	89,9 % (89,8 %)
Mittlere Deletion (6–15 bp)	Mittel	858 673	20 079	860 493	18 361	97,7 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Niedrig	145 618	28 300	157 398	41 824	83,7 % (83,6 %)	79,0 % (78,9 %)
Lange Deletion (16–31 bp)	Mittel	344 168	14 334	336 976	31 165	96,0 % (95,9 %)	91,5 % (91,5 %)
	Niedrig	54 444	23 438	53 835	47 272	69,9 % (69,6 %)	53,2 % (53,0 %)

Variante Subtyp	Konfidenzstufe	Referenzmethode Konkordante Calls	Referenzmethode Exklusive Calls	Assay Konkordante Calls	Assay Exklusive Calls	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Kurze Insertion (1–5 bp)	Hoch	11 212 366	164 651	11 380 307	49 776	98,6 % (98,5 %)	99,6 % (99,6 %)
	Mittel	1 015 324	41 890	988 512	36 051	96,0 % (96,0 %)	96,5 % (96,5 %)
	Niedrig	639 663	198 700	576 797	180 458	76,3 % (76,2 %)	76,2 % (76,1 %)
Mittlere Insertion (6–15 bp)	Mittel	790 968	18 163	798 572	17 111	97,8 % (97,7 %)	97,9 % (97,9 %)
	Niedrig	76 105	24 188	88 389	35 819	75,9 % (75,7 %)	71,2 % (71,0 %)
Lange Insertion (16–31 bp)	Mittel	159 927	3 135	159 432	8 639	98,1 % (98,0 %)	94,9 % (94,8 %)
	Niedrig	102 552	22 199	103 892	55 724	82,2 % (82,0 %)	65,1 % (64,9 %)

Tabelle 13 Zusammenfassung der TruSight Whole Genome-NPA von Calls mit kleinen Varianten, stratifiziert nach Konfidenzstufe

Konfidenzstufe	Konkordante negative Calls	Referenzmethode Exklusive negative Calls	NPA (LCL)
Hoch	202 276 243 790	127 465 816	99,9 %, (99,9 %)
Mittel	3 307 740 675	77 650 177	97,7 % (97,7 %)
Niedrig	3 653 569 580	439 038 662	89,3 %, (89,3 %)

Eine zusätzliche Genauigkeitsstudie wurde durchgeführt, um den Nachweis kleiner Varianten mit kommerziell erhältlichen Referenzzelllinien-DNA-Proben (Coriell Institute for Medical Research) mit gut charakterisierten Call-Sätzen zu beurteilen, die vom Genome in a Bottle (GIAB)-Konsortium generiert wurden. Für diese Studie wurden die GIAB-Call-Sätze als Referenzmethode verwendet. Der Referenzsatz in diesen Proben umfasst Insertionen und Deletionen von mehr als 31 bp, sodass größere Insertionen und Deletionen in diese Bewertung einbezogen wurden. Diese Proben umfassten HG001-005 und NA24695 mit den in [Tabelle 14](#) aggregierten Ergebnissen.

Tabelle 14 TruSight Whole Genome Assay Genauigkeit für kleine Varianten, stratifiziert nach Konfidenzstufe und Größe (gut charakterisierte Zelllinienproben)

Variante Subtyp	Konfidenzstufe	GIAB Konkordante Calls	GIAB Exklusive Calls	Assay Konkordante Calls	Assay Exklusive Calls	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
SNVs	Hoch	21 431 369	2 552	21 439 303	3 954	> 99,9 % (> 99,9 %)	> 99,9 % (> 99,9 %)
	Mittel	908 172	1 259	910 058	2 175	99,9 % (99,9 %)	99,8 % (99,8 %)
	Niedrig	720 717	59 691	722 180	28 721	92,4 % (92,3 %)	96,2 % (96,1 %)
Kurze Deletion (1–5 bp)	Hoch	1 080 383	690	1 090 370	730	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Mittel	423 547	788	437 019	606	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Niedrig	263 828	2 624	281 217	2 088	99,0 % (99,0 %)	99,3 % (99,2 %)
Mittlere Deletion (6–15 bp)	Mittel	142 671	238	144 997	167	99,8 % (99,8 %)	99,9 % (99,9 %)
	Niedrig	86 174	812	91 710	546	99,1 % (99,0 %)	99,4 % (99,4 %)
Lange Deletion (≥ 16 bp)	Mittel	34 414	315	34 580	55	99,1 % (99,0 %)	99,8 % (99,8 %)
	Niedrig	9 985	393	10 212	106	96,2 % (95,9 %)	99,0 % (98,8 %)
Kurze Insertion (1–5 bp)	Hoch	927 288	221	925 787	271	> 99,9 % (> 99,9 %)	> 99,9 % (> 99,9 %)
	Mittel	158 346	294	137 081	250	99,8 % (99,8 %)	99,8 % (99,8 %)
	Niedrig	93 857	2 402	75 687	1 427	97,5 %, (97,4 %)	98,1 % (98,1 %)
Mittlere Insertion (6–15 bp)	Mittel	91 117	116	89 054	60	99,9 % (99,9 %)	99,9 % (99,9 %)
	Niedrig	37 925	745	36 670	406	98,1 % (98,0 %)	98,9 % (98,8 %)

Variante Subtyp	Konfidenzstufe	GIAB Konkordante Calls	GIAB Exklusive Calls	Assay Konkordante Calls	Assay Exklusive Calls	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
Lange Insertion ( $\geq$ 16 bp)	Mittel	11 081	46	11 110	17	99,6 %, (99,5 %)	99,8 % (99,8 %)
	Niedrig	14 086	607	14 312	262	95,9 % (95,6 %)	98,2 % (98,0 %)

## Genauigkeit der Kopienzahlvariante

Die Genauigkeit der CNV-Calls wurde mit der gleichen Referenzmethode und mutmaßlich gesunden Blutspenderproben (195) beurteilt, die zur Beurteilung der Genauigkeit der Calls bei kleinen Varianten verwendet wurden. Jede CNV gilt im Callsatz als nachgewiesen, wenn mindestens 50 % dieser CNV durch die Gesamtheit der CNV-Calls desselben Typs (GAIN/LOSS) im abgeglichenen Callsatz abgedeckt sind. TruSight Whole Genome definiert einen Satz genomischer Regionen, die von CNV-Calls ausgeschlossen sind, basierend auf einer Bewertung von Probanden von 1000 Genomen und 77 mutmaßlich gesunden Blutspendern unter Verwendung von Metriken hinsichtlich Ausreißer bei Coverage-Tiefe, Ausreißer bei Coveragevarianz und Coveragelücken, um die Regionen des Genoms zu bestätigen, die für CNV nicht zu berichten sind. CNV-Calls wurden nur über genomische Regionen ausgewertet, die sowohl für die Referenzmethode als auch für TruSight Whole Genome üblich waren. Eine Zusammenfassung der Genauigkeit für alle CNV-Calls ist in [Tabelle 15](#) und [Tabelle 16](#) dargestellt.

Tabelle 15 TruSight Whole Genome Assay Genauigkeit für CNVs, stratifiziert nach Größe und Typ

Größe	Typ	Referenzmethode Konkordante Calls	Referenzmethode Exklusive Calls	Assay Konkordante Calls	Assay Exklusive Calls	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
10–25 kbp	ZUNAHME	443	98	342	56	81,89 % (79,01 %)	85,93 % (82,82 %)
	VERLUST	4 162	457	4 155	679	90,11 % (89,36 %)	85,95 % (85,11 %)
25–50 kbp	ZUNAHME	355	117	370	76	75,21 % (71,81 %)	82,96 % (79,83 %)
	VERLUST	1 587	16	1 622	7	99,00 % (98,50 %)	99,57 % (99,21 %)
50–100 kbp	ZUNAHME	228	0	187	20	> 99,99 % (98,83 %)	90,34 % (86,42 %)
	VERLUST	723	5	697	6	99,31 % (98,60 %)	99,15 % (98,36 %)

Größe	Typ	Referenzmethode Konkordante Calls	Referenzmethode Exklusive Calls	Assay Konkordante Calls	Assay Exklusive Calls	PPA (LCL)	TPPV (LCL)
≥ 100 kbp	ZUNAHME	371	1	335	5	99,73 % (98,80 %)	98,53 % (97,01 %)
	VERLUST	541	23	569	1	95,92 % (94,32 %)	99,82 % (99,22 %)
Insgesamt (alle CNVs ≥ 10 kbp)	ZUNAHME	1 397	216	1 234	157	86,61 % (85,15 %)	88,71 % (87,24 %)
	VERLUST	7 013	501	7 043	693	93,33 % (92,84 %)	91,04 % (90,49 %)

Tabelle 16 Zusammenfassung der TruSight Whole Genome-NPA von CNV-Calls

Größe	Typ	Konkordante negative Calls	Referenzmethode Exklusive negative Calls	Assay Exklusive Calls	NPA (LCL)
Insgesamt (alle CNVs ≥ 10 kbp)	ZUNAHME	548 478 033 220	5 701 311	6 400 382	> 99,99 % (> 99,99 %)
	VERLUST	548 591 794 675	11 719 913	8 543 877	> 99,99 % (> 99,99 %)

## Genauigkeit von Homozygotie-Läufen

Der technische positive prädiktive Wert (TPPV) für ROH-Calls wurde mit der gleichen Referenzmethode und den gleichen mutmaßlich gesunden Blutspenderproben (195) beurteilt, die für die Beurteilung der Genauigkeit von kleiner Variante und CNV verwendet wurden. ROH-Ereignisse wurden bestimmt, indem Regionen im Genom identifiziert wurden, die eine Sequenz homozygoter SNV-Calls ohne heterozygote SNV oder lange Lücken ohne Varianten enthielten. Solche Seed-Regionen wurden dann nach links und rechts verlängert und auf umliegende homozygote Calls oder das Vorhandensein heterozygoter SNVs untersucht. Von TruSight Whole Genome erkannte ROH-Ereignisse wurden mit SNV-Calls der Referenzmethode verglichen. Eine Zusammenfassung der TPPV-Werte für ROH-Calls ist in [Tabelle 17](#) dargestellt.

Tabelle 17 TruSight Whole Genome Genauigkeit von ROH-Ereignissen, stratifiziert nach Größe

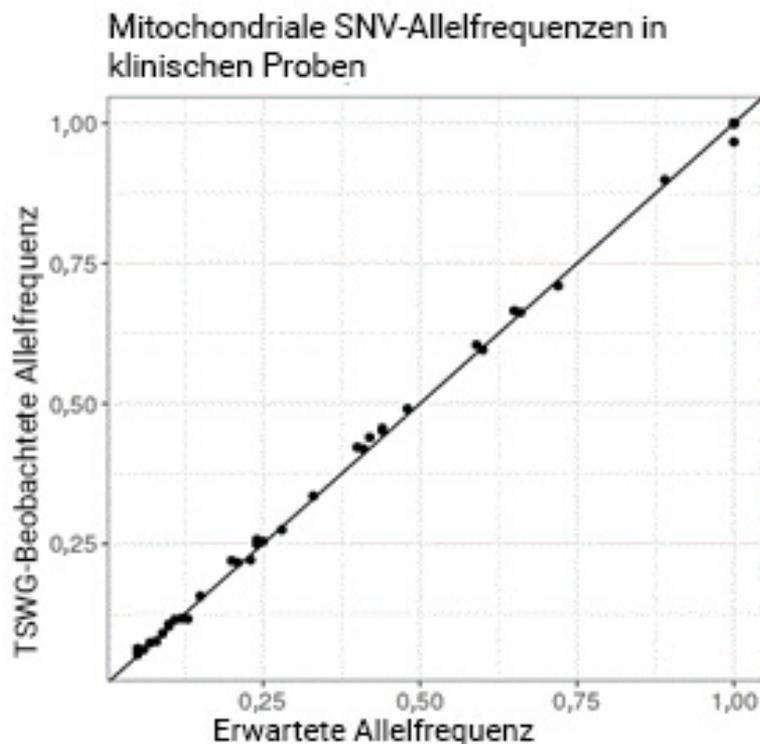
Größe	TPPV Mittelwert	TPPV LCL
10–25 kbp	81,44 %	80,77 %
25–50 kbp	82,14 %	81,82 %
50–100 kbp	81,77 %	81,55 %
100–500 kbp	82,19 %	81,98 %
≥ 10 kbp	82,07 %	81,94 %
≥ 500 kbp	85,47 %	84,66 %

Die positive prozentuale Übereinstimmung (PPA) für den ROH-Nachweis wurde mittels extern beschaffter klinischer Proben bestimmt, indem TruSight Whole Genome-Calls mit ROH-Calls aus orthogonalen Methoden, einschließlich chromosomalem Microarray und PCR-basierter Beurteilung, verglichen wurden. Ein ROH-Ereignis galt als nachgewiesen, wenn mindestens 50 % der Region, die mittels orthogonaler Methode als ROH gemeldet wurde, mit der Gesamtmenge von ROH-Ereignissen überlappte, die von TruSight Whole Genome aufgerufen wurden. Die PPA zwischen der TruSight Whole Genome Assay-Methode und der orthogonalen Methode betrug 34/34 (100 %) für alle erwarteten ROH-Ereignisse ( $\geq 4$  MB).

### Heteroplasmische mitochondriale SNV-Genauigkeit

Die Genauigkeit des mtSNV-Callings wurde an 41 zuvor konservierten klinischen Proben von externen Standorten beurteilt. Jede klinische Probe enthielt eine zuvor berichtete mtSNV an einer definierten Stelle mit einem definierten Grad an Heteroplasmie basierend auf der mtDNA Targeted Known Analysis with Heteroplasmy (MITOP). Die nach TruSight Whole Genome geschätzten Allelfrequenzen korrelierten stark mit den erwarteten Frequenzen, wie von MITOP vorhergesagt. Alle erwarteten mtDNA-SNV wurden nachgewiesen, was zu einer PPA von 100 % führte (41/41).

Abbildung 3 TruSight Whole Genome Beobachtete mitochondriale SNV-Allelfrequenzen im Vergleich zu erwarteten Allelfrequenzen



Eine zusätzliche mtSNV-Genauigkeitsstudie wurde mit den gleichen 195 Blutproben und der gleichen Referenzmethode durchgeführt, die in den kleinen Varianten- und CNV-Genauigkeitsstudien beschrieben wurden. Der negative Referenzsatz wurde als zuversichtliche nicht-variante Calls (PASS[BESTANDEN]-Filter)

und der positive Referenzsatz als mtSNV-Calls mit einer Allelfrequenz > 2,5 % definiert. Positionen mit entweder Nicht-Bestanden-Filter oder Nicht-SNV-Varianten-Call wurden ausgeschlossen. Eine Zusammenfassung der Genauigkeit für mtSNVs ist in [Tabelle 18](#) dargestellt.

Tabelle 18 TruSight Whole Genome Genauigkeit von mtDNA SNV-Calls

Genauigkeitsmetrik	Referenzmethode oder konkordant positiv	Referenzmethode oder exklusiv positiv	Assay exklusiv positiv	Referenzmethode oder konkordant negativ	Referenzmethode oder exklusiv negativ	Assay exklusiv negativ	Metrischer Genauigkeitswert (LCL)
PPA	6875	0	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.	> 99,99 % (99,96 %)
TPPV	6875	N. z.	6	N. z.	N. z.	N. z.	99,91 % (99,83 %)
NPA	N. z.	N. z.	N. z.	3171049	24268	2056 4	99,24 % (99,23 %)

## Genauigkeit des STR-Expansionsnachweises

Die Genauigkeit des STR-Expansionsnachweises basierte auf 160 Gesamtproben, die durch Extraktion von gDNA von klinisch betroffenen Personen mit Expansionen an bestimmten Stellen bestätigt wurden, die mittels PCR/Repeat-Primed (RP)-PCR oder in einem CLIA-Labor durchgeführten Southern Blot erstellt worden waren. Die in [Tabelle 11](#) festgelegten Schwellenwerte wurden verwendet, um den STR-Status eines Allels an einem bestimmten Locus als normal (geschätzte STR-Größe kleiner oder gleich dem Schwellenwert) oder erweitert (größer als der Schwellenwert) zu definieren.

Die PPA wurde nur mit klinisch bestätigten Proben berechnet, die NPA wurde nur mit individuellen vermeintlich gesunden Blutproben berechnet und der TPPV wurde über beide Probengruppen hinweg berechnet. Für Allele, bei denen keine klinisch bestätigte Probe verfügbar war, konnte die PPA nicht berechnet werden. Zusätzlich konnte für Allele, bei denen keine klinisch bestätigte Probe verfügbar war und keine falsch-positiven Calls vorlagen, der TPPV nicht berechnet werden. Die NPA wurde für alle STR-Expansionen berechnet. Die Anzahl der klinischen Proben, die für eine bestimmte STR-Expansion und Genauigkeitsmetriken getestet wurden, ist in [Tabelle 19](#) angegeben.

Tabelle 19 TruSight Whole Genome Genauigkeitsmetriken für STR-Expansionen

STR-Expansion	Getestete klinische Proben	PPA	TPPV	NPA
AFF2	0	N. z.	N. z.	> 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	N. z.	N. z.	> 99,99 %

STR-Expansion	Getestete klinische Proben	PPA	TPPV	NPA
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	N. z.	N. z.	> 99,99 %
ATXN8OS	0	N. z.	0,00 %	99,74 %
ATXN8OS_CTA	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
C9ORF72	21	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
CACNA1A	5	> 99,99 %	83,33 %	99,74 %
CBL	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
CNBP	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
CNBP_CA	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
CNBP_CAGA	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
CSTB	0	N. z.	0,00 %	99,74 %
DIP2B	0	N. z.	0,00 %	99,74 %
DMPK	42	> 99,99 %	> 99,99 %	> 99,99 %
FMR1	47	> 99,9 %	> 99,99 %	> 99,99 %
FXN	0	N. z.	0,00 %	99,74 %
FXN_A	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
GLS	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
HTT	10	> 99,99 %	83,33 %	99,49 %
HTT_CCG	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
JPH3	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
NIPA1	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
NOP56	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
NOP56_CGCCTG	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
NOTCH2NL	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
PABPN1	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
PHOX2B	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
PPP2R2B	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
TBP	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
<b>ALLE</b>	<b>160</b>	<b>98,12 %</b>	<b>92,35 %</b>	<b>99,94 %</b>

Die Beurteilung der Gesamt-PPA des STR-Expansionsnachweises über alle Loci stellt bei Verwendung der verfügbaren klinischen Proben eine gute Annäherung an die locusspezifischen PPA dar. Die Bewertung der PPA speziell für den FMR1-Locus kann als untere Grenze für die PPA von Loci dienen, die aufgrund ihres großen Schwellenwerts für die STR-Größenanomalie nicht direkt profiliert wurden.

## Genauigkeit des SMN1-Allelnachweises

Die Genauigkeit des Nachweises eines Fehlens des C-Allels in SMN1 (NM\_000344.3:c.840C) wurde in 26 klinischen Proben von Fällen mit der Diagnose Spinale Muskelatrophie (SMA) und homozygotem Verlust von Exon 7 in SMN1, bestätigt anhand einer digitalen Tröpfchen-PCR oder MLPA, beurteilt. Die Genauigkeit des Nachweises eines Vorhandenseins des SMN1 c.840C-Allels wurde in vermeintlich gesunden Einzelblutproben beurteilt. Jeder Probe wurde eine einzelne statistische Metrik (positiv [TP], falsch-positiv [FP], falsch-negativ [FN] oder negativ [TN]) zugewiesen, basierend auf dem nachgewiesenen Vorhandensein (negativer SMA-Status) oder Fehlen (positiver SMA-Status) des C-Allels an der Position c.840 des SMN1-Gens im Vergleich zum erwarteten Status. PPA-, TPPV- und NPA-Schätzungen wurden sowohl für den positiven als auch für den negativen Probensatz vorgenommen (siehe [Tabelle 20](#)).

Tabelle 20 Genauigkeitsmetriken zum Nachweis des Fehlens von SMN1 c.840C-Allelen

Genauigkeitsmetrik	TP	FP	TN	FN	Metrischer Genauigkeitswert
PPA	26	N. z.	N. z.	0	> 99,99 %
TPPV	26	0	N. z.	N. z.	> 99,99 %
NPA	N. z.	0	195	N. z.	> 99,99 %

## Wiederholbarkeit

### Präzision im Labor

Die Präzision innerhalb des Labors wurde anhand extrahierter gDNA mit einer Vielzahl bekannter Varianten im gesamten Genom bewertet. Dazu zählten mtSNVs nahe der und deutlich über der LoD, Proben, die das SMN1 c.840C-Allel enthielten, und Proben mit FMR- und HTT1-Repeat-Expansionen in Längen nahe der und deutlich über der LoD. Die Proben wurden unter neun eindeutigen Bedingungen getestet, die mit drei Bedienern, drei Reagenzienchargen für die Bibliotheksvorbereitung, drei Chargen für Sequenzierungsverbrauchsmaterialien und drei Sequenzierungsgeräten entwickelt wurden.

Jede Probe wurde im gleichen Lauf doppelt auf laufinterne Variation beurteilt, und jeder Testfall wurde zweimal für zwei Läufe pro Bedingung auf laufinterne Variation getestet. Jede Probe wurde anhand von 36 Beobachtungen beurteilt, und das Design bot 18 Freiheitsgrade für die Beurteilung der Wiederholbarkeit. Die Liste der Panel-Mitglieder, Probentyp und bewerteten Varianten pro Panel-Mitglied ist in [Tabelle 21](#) dargestellt. Die Proben 1-4 und 9-12 wurden sowohl von Männern als auch von Frauen abgeleitet, die nach eigenen Angaben weißer, afrikanischer und asiatischer Abstammung waren, um ein vielfältiges Probenset bereitzustellen.

Tabelle 21 Probenzusammensetzung des Panels, das für die Laborpräzisionsstudie verwendet wird

Panel	Proben-Nr.	Probentyp	Varianten
A	1	gDNA aus Blut	Kleine Varianten, CNV, ROH, STR nicht erweitert, Vorhandensein von SMN1 c.840C
	2	gDNA aus Blut	Kleine Varianten, CNV, ROH, STR nicht erweitert, Vorhandensein von SMN1 c.840C
	3	gDNA aus Blut	Kleine Varianten, CNV, ROH, STR nicht erweitert, Vorhandensein von SMN1 c.840C
	4	gDNA aus Blut	Kleine Varianten, CNV, ROH, STR nicht erweitert, Vorhandensein von SMN1 c.840C
	5	Konstruierte gDNA-Mischung aus Blut	Mitochondriale SNV niedrigem LoD-Niveau
	6	Konstruierte Zelllinie NA20241 <sup>1</sup>	STR erweitert in FMR1-Loci niedrigem LoD-Niveau
	7	Konstruierte Zelllinie NA20208	STR erweitert in HTT-Loci mit niedrigem LoD-Niveau
	8	Konstruierte Zelllinie NA23686	Abwesenheit von SMN1 c.840C

Panel	Proben-Nr.	Probentyp	Varianten
B	9	gDNA aus Blut	Kleine Varianten, CNV, ROH, STR nicht erweitert, Vorhandensein von SMN1 c.840C
	10	gDNA aus Blut	Kleine Varianten, CNV, ROH, STR nicht erweitert, Vorhandensein von SMN1 c.840C
	11	gDNA aus Blut	Kleine Varianten, CNV, ROH, STR nicht erweitert, Vorhandensein von SMN1 c.840C
	12	gDNA aus Blut	Kleine Varianten, CNV, ROH, STR nicht erweitert, Vorhandensein von SMN1 c.840C
	13	Konstruierte gDNA-Mischung aus Blut	mtSNVs mit hohem LoD-Niveau
	14	Konstruierte Zelllinie NA07862	STR erweitert in FMR1-Loci mit hohem LoD-Niveau
	15	Konstruierte Zelllinie NA20253	STR erweitert in HTT-Loci mit hohem LoD-Niveau
	16	Konstruierte Zelllinie NA03814	Abwesenheit von SMN1 c.840C

Hohes LoD-Niveau: Variante Allelfrequenz ca. bei 2,0x – 4,0x LoD.

Niedriges LoD-Niveau: Variante Allelfrequenz ca. bei 1,0x – 1,5x LoD.

<sup>1</sup> Die Ergebnisse für NA20241 wurden nicht in Endzahlen berichtet, da festgestellt wurde, dass sie signifikant unter dem 1,0-fachen LoD liegen und somit die Probenanforderungen nicht erfüllten.

In der qualitativen Bewertung werden Metriken zur Wiederholbarkeit berichtet, die die Varianten als qualitative Entitäten behandeln (Variante vorhanden oder Variante nicht vorhanden). Für jeden Variantentyp wurden unterschiedliche Definitionen positiver oder negativer Calls und unterschiedliche qualitative Metriken bewertet und berichtet ([Tabelle 22](#)). Bei der Beurteilung der Reproduzierbarkeit von Small-Variant-, CNV- und ROH-Calls wurden die in einem Charakterisierungslauf-Replikat getätigten Varianten-Calls für jede Probe verwendet, die als Vergleichspunkt für alle anderen Replikate dieser Probe in der Studie diente.

Tabelle 22 Zusammenfassung der qualitativen Beurteilung der Wiederholbarkeit für jeden Variantentyp

Variantentyp	Positiv	Negativ	Art des Vergleichs	Qualitative Metriken
Kleine Varianten	Filter für das Bestehen von Varianten-Calls	Homozygoter Referenz-Call, der Filter besteht	Konkordanz mit dem Call-Satz aus den ersten Charakterisierungsläufen	Durchschnittliche positive Übereinstimmung (APA) und Durchschnittliche negative Übereinstimmung (ANA)
CNVs	CNV-Call besteht Filter	Genomische Positionen, die sich nicht mit einem CNV-Call überlappen	Konkordanz mit dem Call-Satz aus den ersten Charakterisierungsläufen	APA und ANA
ROH	ROH-Anruf	Genomische Positionen, die sich nicht mit einem ROH-Call überlappen	Konkordanz mit dem Call-Satz aus den ersten Charakterisierungsläufen	APA und ANA
STR-Expansion	Probe mit STR-Expansion in mindestens einem Ziellocus	Probe ohne Expansionen in einem der Zielorte	Übereinstimmung mit dem Probenstatus, definiert durch Charakterisierung der Probe mittels orthogonalem Assay	Prozentsatz positiver Calls (PPC) und Prozentsatz negativer Calls (PNC)
SMN1 c.840C-Nachweis	Probe ohne C-Allel an c.840-Position von SMN1 (SMA positiv)	Probe mit mindestens einer Kopie des C-Allels an der c.840-Position von SMN1 (SMA negativ)	Übereinstimmung mit dem Probenstatus, definiert durch Charakterisierung der Probe mittels orthogonalem Assay	PPC und PNC
mtSNV	Mitochondrialer SNV-Call besteht Filter	Nicht-Varianten-Position in mitochondrialen Chromosomen, die Filter bestehen	Konkordanz mit Varianten- und Nichtvarianten-Calls in unverdünnten Proben	PPC und PNC

Die quantitative Bewertung der verschiedenen Variantentypen beinhaltet eine Bewertung der Variabilität entweder von quantitativen Metriken, die die qualitativen Calls stützen, oder, im Falle kleiner Varianten, von Übereinstimmungsmetriken relativ zu einem Referenz-Call-Satz. Diese Studie führte sowohl eine Bewertung der Gesamtvariabilität der quantitativen Metriken über Replikate hinweg durch und beurteilte auch den Beitrag verschiedener Faktoren zur Variabilität bei solch quantitativen Metriken anhand einer Varianzkomponentenanalyse. [Tabelle 23](#) fasst die quantitativen Metriken zusammen, die bei der Analyse jedes Variantentyps verwendet wurden, sowie die Faktoren, die hinsichtlich ihres Beitrags zur Variabilität in der quantitativen Metrik beurteilt wurden.

**Tabelle 23** Zusammenfassung der zur Bewertung der Genauigkeit unterschiedlicher Variantentypen herangezogener quantitativen Metriken

Variantentyp	Quantitative Metriken	Auf ihren Beitrag zur Variabilität bewertete Faktoren
Kleine Varianten	APA und ANA	Bediener, Bibliotheksvorbereitungskit-Charge, Gerät, Sequenzierungsverbrauchsmaterial-Charge, Varianten-Subtyp, genomischer Kontext
CNVs	Normalisierte Tiefe der Coverage über CNV-Region	Bediener, Bibliotheksvorbereitungskit-Charge, Gerät, Sequenzierungsverbrauchsmaterial-Charge, Varianten-Subtyp, Variantenlänge
ROH	ROH-Score über ROH-Region	Bediener, Bibliotheksvorbereitungskit-Charge, Gerät, Sequenzierungsverbrauchsmaterial-Charge, Varianten-Subtyp, Variantenlänge
STR-Expansion	Schätzung der STR-Größe	Bediener, Bibliotheksvorbereitungskit-Charge, Gerät, Sequenzierungsverbrauchsmaterial-Charge, STR-Stelle, STR-Länge
SMN1 c.840C-Nachweis	Log-Likelihood-Verhältnis für das Vorhandensein des Referenzallels (C) an der Zielposition	Bediener, Bibliotheksvorbereitungskit-Charge, Gerät, Sequenzierungsverbrauchsmaterial-Charge, SMA-Status
Mitochondriale SNV	Variantenallelfrequenz	Bediener, Bibliotheksvorbereitungskit-Charge, Gerät, Sequenzierungsverbrauchsmaterial-Charge, Varianten-Position, erwartete Variantenallelfrequenz

Die Ergebnisse für die Varianzkomponentenanalyse sind in [Tabelle 24](#) dargestellt. Bei kleinen Varianten wurde der Großteil der Varianz auf Restfehler zurückgeführt und nicht durch die im Design enthaltenen assaybezogenen Faktoren erklärt, einschließlich Sequenzierungskit-Charge, Sequenzierungsgerät, Bibliotheksvorbereitungskit-Charge, Bediener und Lauf zu Lauf. Die eine Ausnahme wurde für SNVs in Regionen mit mittlerer Konfidenz beobachtet, für die der Großteil der Varianz der Sequenzierungskitcharge zugeschrieben wurde. Im Allgemeinen wurde eine höhere Varianzmenge Assay-bezogenen Faktoren für kleine Varianten in Regionen mit niedriger Konfidenz des Genoms zugeschrieben. Bei allen anderen Variantentypen wurde der Großteil der Varianz auf Restfehler und nicht auf assaybezogene Faktoren zurückgeführt. Diese

Studie zeigt, dass für die meisten kleinen Varianten-Subtypen eine Filterung nach Regionen mit hoher und mittlerer Konfidenz im Genom verwendet werden kann, um die Wiederholbarkeit zu erhöhen und die Variabilität des Assays zu verringern. Die [Externe Reproduzierbarkeit auf Seite 70](#) bietet eine umfassende Analyse der Wiederholbarkeit des Assays.

Tabelle 24 Ergebnisse der Varianzkomponentenanalysenstudie

Metrik	Variante Subtypen	Konfidenzstufe	Residual	Sequenzierungskit-Charge	Lauf-zu-Lauf	Instrument	Bibliotheksvorbereitungskit-Charge	Bediener
APA	Kurze Deletion (1-5 bp)	Hoch	79,36 %	17,52 %	0,00 %	0,00 %	3,13 %	0,00 %
		Mittel	76,97 %	18,59 %	1,53%	0,00 %	2,91 %	0,00 %
		Niedrig	67,85 %	24,87 %	4,4 %	0,00 %	2,88 %	0,00 %
	Mittlere Deletion (6-15 bp)	Mittel	61,17 %	29,06 %	7,42 %	0,00 %	2,35 %	0,00 %
		Niedrig	59,33 %	31,76 %	6,38 %	0,17 %	2,35 %	0,00 %
	Lange Deletion (16-31 bp)	Mittel	52,93 %	33,72 %	11,67 %	0,17 %	1,51 %	0,00 %
		Niedrig	49,10 %	37,01 %	11,08 %	1,42 %	1,39 %	0,00 %
	Kurze Insertion (1-5 bp)	Hoch	89,93 %	7,32 %	1,76%	0,00 %	0,99 %	0,00 %
		Mittel	74,52 %	19,96 %	3,44 %	0,00 %	2,08 %	0,00 %
		Niedrig	60,64 %	29,72 %	8,49 %	0,00 %	1,15%	0,00 %
	Mittlere Insertion (6-15 bp)	Mittel	81,76 %	15,78 %	0,00 %	0,00 %	2,41 %	0,06 %
		Niedrig	51,28 %	35,07 %	12,07 %	0,00 %	1,58 %	0,00 %
	Lange Insertion (16-31 bp)	Mittel	87,59 %	9,83 %	1,18 %	0,00 %	1,40 %	0,00 %
		Niedrig	52,47 %	35,32 %	10,14 %	0,23 %	1,85 %	0,00 %
	SNV	Hoch	78,01 %	17,45 %	0,00 %	0,13 %	1,23 %	3,17 %
		Mittel	79,71 %	16,95 %	0,77 %	0,20 %	1,29 %	1,09 %
		Niedrig	56,63 %	36,08 %	6,97 %	0,22 %	0,00 %	0,09 %

Metrik	Variante Subtypen	Konfidenzstufe	Residual	Sequenzierungskit-Charge	Lauf-zu-Lauf	Instrument	Bibliotheksvorbereitungskit-Charge	Bediener
ANA	SNV	Hoch	55,07 %	21,84 %	21,07 %	1,80 %	0,21 %	0,00 %
		Mittel	28,53 %	49,08 %	20,11 %	1,27 %	1,00 %	0,00 %
		Niedrig	51,78 %	36,04 %	9,76 %	2,42 %	0,00 %	0,00 %

Metrik	Variante Subtypen	Konfidenzstufe	Residual	Sequenzierungskit-Charge	Lauf-zu-Lauf	Instrument	Bibliotheksvorbereitungskit-Charge	Bediener
Tiefe	CNV-ZUNAHME (10 kbp, 25 kbp)	N. z.	73,28 %	2,87 %	0,00 %	0,00 %	1,01 %	0,00 %

Metrik	Variante Subtypen	Konfidenzstufe	Residual	Sequenzierungskit-Charge	Lauf-zu-Lauf	Instrument	Bibliotheksvorbereitungskit-Charge	Bediener
	CNV-ZUNAHME (25 kbp, 50 kbp)	N. z.	72,99 %	5,25 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,56 %

Metrik	Variante Subtypen	Konfidenzstufe	Residual	Sequenzierungskit-Charge	Lauf-zu-Lauf	Instrument	Bibliotheksvorbereitungskit-Charge	Bediener
	CNV-ZUNAHME (50 kbp, 100 kbp)	N. z.	66,40 %	5,16 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV-ZUNAHME (100 kbp, 500 kbp)	N. z.	43,51 %	14,92 %	14,01 %	0,20 %	0,00 %	15,72 %
	CNV-VERLUST (10 kbp, 25 kbp)	N. z.	83,41 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV-VERLUST (25 kbp, 50 kbp)	N. z.	84,67 %	1,20 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV-VERLUST (50 kbp, 100 kbp)	N. z.	84,16 %	2,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNV-VERLUST (100 kbp, 500 kbp)	N. z.	81,25 %	5,22 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,55 %

Metrik	Variante Subtypen	Konfidenzstufe	Residual	Sequenzierungskit-Charge	Lauf-zu-Lauf	Instrument	Bibliotheksvorbereitungskit-Charge	Bediener
Punktzahl über Region	ROH (1 kbp, 10 kbp)	N. z.	74,32 %	1,65 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,52 %
	ROH (10 kbp, 25 kbp)	N. z.	84,78 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (25 kbp, 50 kbp)	N. z.	84,92 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (50 kbp, 100 kbp)	N. z.	85,63 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (100 kbp, 500 kbp)	N. z.	85,76 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ROH (≥ 500 kbp)	N. z.	84,81 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %

Metrik	Variante Subtypen	Konfidenzstufe	Residual	Sequenzierungskit-Charge	Lauf-zu-Lauf	Instrument	Bibliotheksvorbereitungskit-Charge	Bediener
Größenschätzung für STR-Loci <sup>1</sup>	AFF2	N. z.	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ATXN7	N. z.	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	ATXN7_GCC	N. z.	99,43 %	0,57 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP	N. z.	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CNBP_CA	N. z.	95,45 %	4,55 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	CSTB	N. z.	96,45 %	0,87 %	2,57 %	0,00 %	0,00 %	0,11 %
	DIP2B	N. z.	100 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	FMR1	N. z.	71,02 %	10,06 %	0,00 %	17,33 %	0,64 %	0,95 %
	FXN_A	N. z.	94,52 %	1,37 %	0,00 %	1,37 %	1,37 %	1,37 %
	HTT	N. z.	82,23 %	0,00 %	11,99 %	3,81 %	0,00 %	1,97 %
	HTT_CCG	N. z.	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
	NOTCH2NL	N. z.	99,43 %	0,00 %	0,00 %	0,29 %	0,29 %	0,00 %
	TBP	N. z.	90,91 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
Log-Likelihood-Quotient	c.840C in NA03814	N. z.	65,71 %	18,98 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	15,32 %
	c.840C in NA23686	N. z.	87,64 %	0,00 %	0,00 %	5,90 %	0,00 %	6,46 %
VAF	mtSNVs nahe LOD	N. z.	83,13 %	0,37 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,05 %

<sup>1</sup> Für Loci, bei denen keine Varianz beobachtet wurde, wurde keine Varianzkomponentenanalyse durchgeführt.

## Packungsbeilage

### Externe Reproduzierbarkeit

Die externe Reproduzierbarkeit wurde mit einer einzigen Charge von Reagenzien zur Bibliotheksvorbereitung und Sequenzierung an drei externen Prüfzentren mit zwei Bedienern an jedem Prüfzentrum bestimmt. In der Reproduzierbarkeitsstudie wurden mit einer Ausnahme die gleichen Proben verwendet, die in der Studie [Präzision im Labor auf Seite 57 \(Tabelle 21\)](#) verwendet wurden: Die Probe NA20241 wurde durch NA20239 ersetzt, um die FMR1 loci STR-Expansion auf einem niedrigen LoD zu bewerten. Insgesamt wurden 16 einzelne Proben von jedem Bediener an jedem Standort als zwei Subpanels (Panel A und Panel B) mit jeweils acht eindeutigen Proben getestet. Es wurden drei Sequenzierungsläufe für doppelte Bibliotheken jedes Subpanels durchgeführt, was insgesamt 36 Sequenzierungsläufe pro eindeutiger Probe ergab.

Die Bestehensrate der Probendurchläufe in 576 Probenbibliotheken mit gültigen Sequenzierungsläufen, definiert als die Anzahl der Proben, die beim ersten Versuch QC-Metriken der Probenbibliothek bestanden, betrug 99,1 % (571/576; 95 %-KI: 98,0 %, 99,6 %). Alle Testergebnisse basieren auf Ersttests.

Die Reproduzierbarkeit von SNVs, Insertionen, Deletionen, CNVs und ROH wurde durch Vergleich der Daten mit einem Referenz-Call-Satz basierend auf der üblichen Leistung über drei Charakterisierungsläufe hinweg ([Tabelle 25](#) und [Tabelle 26](#)) bewertet. Die Reproduzierbarkeit von STR-Expansionen, das Fehlen des SMN1 c.840C-Allels und der mtSNVs wurde anhand des Vergleichs der Daten mit dem bekannten Status beurteilt ([Tabelle 27](#)).

Tabelle 25 Reproduzierbarkeit von SNVs, CNVs und ROH mittels TruSight Whole Genome

Variantentyp – Stratifizierung	Konkordante positive Calls <sup>1</sup> / Positive Calls <sup>2</sup>			Durchschnittliche positive Übereinstimmung (%) (95 %-KI) <sup>3</sup>
	Standort 1	Standort 2	Standort 3	
<b>Kleine Varianten (hohe Konfidenz)</b>				
SNVs	687 996 150 /	666 509 635 /	688 001 697 /	99,9
	688 770 402	667 253 493	688 766 887	(99,9–99,9)
Insertionen — 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)
Deletionen — 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>Kleine Varianten (mittlere Konfidenz)</b>				
SNVs	42 238 226 /	40 920 370 /	42 236 751 /	98,8
	42 737 228	41 391 560	42 725 827	(98,8–98,9)
Insertionen — 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)
Insertionen — 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)
Insertionen — ≥ 16 bp	611 952 /	593 114 /	612 222 /	96,8
	632 214	612 877	632 498	(96,8–96,8)
Deletionen — 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)
Deletionen — 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)
Deletionen — ≥ 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>Kleine Varianten (niedrige Konfidenz)</b>				
SNVs	78 507 103 /	76 365 789 /	78 863 977 /	81,2
	96 859 682	94 066 720	97 058 652	(81,2–81,2)
Insertionen — 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)

Variantentyp – Stratifizierung	Konkordante positive Calls <sup>1</sup> / Positive Calls <sup>2</sup>			Durchschnittliche positive Übereinstimmung (%) (95 %-KI) <sup>3</sup>
	Standort 1	Standort 2	Standort 3	
Insertionen — 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))
Insertionen — ≥ 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)
Deletionen — 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)
Deletionen — 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)
Deletionen — ≥ 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)
CNVs — Zunahmen ≥ 10 kbp	7 883 /	7 664 /	7 916 /	95,5
	8 275	8 012	8 282	(95,2–95,8)
CNVs — Verluste ≥ 10 kbp	11 517 /	11 248 /	11 516 /	95,3
	12 089	11 777	12,113	(95,1–95,5)
ROH — ≥ 500 kbp	6 641 /	6 519 /	6 616 /	98,0
	6 765	6 663	6 756	(97,8–98,2)

<sup>1</sup> Gesamtzahl der konkordanten positiven Calls = Query Concordant Positive (QCP) + Reference Concordant Positive (RCP).

<sup>2</sup> Gesamtzahl der positiven Calls = Query Concordant Positive (QCP) + Query Exclusive Positive (QEP) + Reference Concordant Positive (RCP) + Reference Exclusive Positive (REP).

<sup>3</sup> Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Tabelle 26 Reproduzierbarkeit von ANA, SNVs, CNVs und ROH mittels TruSight Whole Genome

Variantentyp – Stratifizierung	Konkordante negative Calls <sup>1</sup> / Negative Calls <sup>2</sup>			Durchschnittliche negative Übereinstimmung (%) (95 %-KI) <sup>3</sup>
	Standort 1	Standort 2	Standort 3	
Kleine Varianten (hohe Konfidenz)	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 %)
Kleine Varianten (mittlere Konfidenz)	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)

Variantentyp – Stratifizierung	Konkordante negative Calls <sup>1</sup> / Negative Calls <sup>2</sup>			Durchschnittliche negative Übereinstimmung (%) (95 %-KI) <sup>3</sup>
	Standort 1	Standort 2	Standort 3	
Kleine Varianten (niedrige Konfidenz)	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)
CNVs — Zunahmen ≥ 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 %)
CNVs — Verluste ≥ 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> Gesamtzahl konkordanter negativer Calls = 2 × konkordant negativ (CN).

<sup>2</sup> Gesamtzahl negativer Calls = 2 × konkordant negativ (CN) + Referenz exklusiv negativ (REN) + Abfrage exklusiv negativ (QEN).

<sup>3</sup> Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

Tabelle 27 Reproduzierbarkeit von STRs, SMN1 und mtSNVs mittels TruSight Whole Genome

Variantentyp – Stratifizierung	Erwartete positive Calls insgesamt	Positive Calls			Erwartete negative Calls insgesamt	Negative Calls			Prozentsatz positiver Calls (%) (95 %-KI) <sup>1</sup>	Prozentsatz negativer Calls (%) (95 %-KI) <sup>1</sup>
		Standort 1	Standort 2	Standort 3		Standort 1	Standort 2	Standort 3		
<b>STR-Expansionen – Hohe Nachweisgrenze (2x-4x LOD)</b>										
STR- Expansionen – FMR1	35	12	11	12	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.	100 (90,1– 100)	N. z.
STR- Expansionen – HTT	36	12	12	12	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.	100 (90,4– 100)	N. z.
STR- Expansionen – FMR1 und HTT kombiniert	71	24	23	24	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.	100 (94,9– 100)	N. z.
<b>STR-Expansionen – Niedrige Nachweisgrenze (1x-1,5x LOD)</b>										
STR- Expansionen – FMR1	36	11	10	11	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.	88,9 (74,7– 95,6)	N. z.
STR- Expansionen – HTT	36	12	12	12	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.	100 (90,4– 100)	N. z.
STR- Expansionen – FMR1 und HTT kombiniert	72	23	22	23	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.	94,4 (86,6– 97,8)	N. z.

Variantentyp – Stratifizierung	Erwartete positive Calls insgesamt	Positive Calls			Erwartete negative Calls insgesamt	Negative Calls			Prozentsatz positiver Calls (%) (95 %-KI) <sup>1</sup>	Prozentsatz negativer Calls (%) (95 %-KI) <sup>1</sup>
		Standort 1	Standort 2	Standort 3		Standort 1	Standort 2	Standort 3		
STR- Expansionen – 28 Haupt- Target-STR- Loci kombiniert	N. z.	N. z.	N. z.	N. z.	285	96	93	96	N. z.	100 (98,7– 100)
Abwesenheit von SMN1 c.840C	71	24	24	23	285	96	93	96	100 (94,9– 100)	100 (98,7– 100)
mtSNVs – hohe Nachweisgrenz e (2x–4x LOD)	1080	360	360	360	457 524	152 491	152 489	152 484	100 (99,6– 100)	> 99,9 (> 99,9 – > 99,9 %)
mtSNVs – niedrige Nachweisgrenz e (1x–1,5x LOD)	1080	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> Nach der Wilson-Score-Methode berechnetes zweiseitiges Konfidenzintervall von 95 %.

# Fehlerbehebung

In der folgenden Tabelle finden Sie Hinweise zur Behebung von Fehlern im Workflow. Wenn ein Sequenzierungslauf oder eine Bibliotheksvorbereitung für eine Probe zweimal fehlschlägt, sind möglicherweise weitere Schritte zur Fehlerbehebung erforderlich. Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
Problem mit Lauferstellung	Der zugehörige geplante Lauf kann nach dem Laden von Verbrauchsmaterialien in NovaSeq 6000Dx Control Software nicht manuell ausgewählt werden	Bei der Laufplanung wurde eine falsche Bibliotheksröhrchen-ID angegeben	Siehe den Abschnitt „Run Revision“ (Laufwiederholung) in TruSight Whole Genome Analysis Application Handbuch (Dokument-Nr. 200049931).

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
Sequenzierungsfehler	Sequenzierung zeigt Fehlerstatus im Illumina Run Manager an	Der Sequenzierungslauf wurde durch NovaSeq 6000Dx abgebrochen oder konnte aufgrund eines Problems mit der Handhabung von Verbrauchsmaterialien während der Sequenzierung nicht abgeschlossen werden	Weitere Informationen finden Sie im NovaSeq 6000Dx Instrument-Produktdokumentation (Dokument-Nr. 200010105).  Nach der Behebung des Problems kann die Bibliothek bis zu einmal (aufgrund des Volumens) erneut gepoolt und sequenziert werden.

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
		<p>Lauf abgeschlossen, aber ohne Cluster. Mögliches NovaSeq 6000Dx-Problem, Sequenzierungsproblem bei der Handhabung von Verbrauchsmaterialien oder katastrophaler Fehler bei der Vorbereitung der Bibliothek aufgrund eines Problems mit der Handhabung von Reagenzien oder eines Bedienerfehlers (z. B. weil ein Schritt übersprungen wurde oder weil ein Überstand bei der Größenauswahl verworfen und nicht übertragen wurde)</p>	<p>Bewerten Sie die individuellen Bibliotheksergebnisse in FLP mittels qPCR für <math>\geq 0,94</math> nM (unter der Annahme einer Insert-Größe von 450 bp), um Probleme mit der Bibliotheksvorbereitung gegenüber sequenzierungsbezogenen Problemen auszuschließen.</p> <p>Wenn Probleme bei der Bibliotheksvorbereitung ausgeschlossen werden und ein sequenzierungsbezogenes Problem vermutet wird, siehe NovaSeq 6000Dx Instrument-Produktdokumentation (Dokument-Nr. 200010105).</p> <p>Wenn ein Problem mit der Bibliotheksvorbereitung vermutet wird, lesen Sie die <a href="#">Tipps und Techniken auf Seite 13</a> sowie die <a href="#">Gebrauchsanweisung auf Seite 16</a> durch bevor Sie die Bibliotheksvorbereitung und -sequenzierung wiederholen. Bei wiederholten Fehlern wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.</p>

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
Sequenzierungsdaten können nicht auf den Server übertragen werden	Fehlerstatus in Illumina Run Manager bei der Sequenzierung der Dateiübertragung für die Analyse	Netzwerkverbindungsproblem oder Unterbrechung der Geräte- oder Serverleistung während der Datenübertragung	<p>Überprüfen Sie, ob die Stromversorgung unterbrochen ist oder die Netzwerkverbindung des Geräts unterbrochen wurde. Warten Sie, bis das System im Leerlauf ist (Sequenzierung abgeschlossen), und gehen Sie dann zu Geräteeinstellungen, IVD SETTINGS (IVD-Einstellungen), um die Verbindung mit dem angegebenen Ausgabespeicherort mithilfe der Funktion Browse (Durchsuchen) zu bestätigen.</p> <p>Wenn weitere Fehlerbehebungen erforderlich sind, siehe NovaSeq 6000Dx Instrument-Produktokumentation (Dokument-Nr. 200010105). Wenn nach der Behebung von Verbindungs- oder Stromversorgungsproblemen die Dateiübertragung nicht neu gestartet und abgeschlossen wird, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.</p>

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
Analyse startet nicht	„Analyse nicht gestartet“- Status in Illumina Run Manager obwohl Sequenzierungsdateiübertragung für Analyse abgeschlossen	Kopplung oder Verbindung zwischen Gerät und DRAGEN Server for NovaSeq 6000Dx verloren gegangen oder DRAGEN- Lizenz abgelaufen.	<p>Warten Sie, bis das System im Leerlauf ist (Sequenzierung abgeschlossen), und gehen Sie dann zu DRAGEN, um zu bestätigen, dass die DRAGEN-Lizenz gültig ist. Wenn die Lizenz abgelaufen ist, kontaktieren Sie Illumina. Wenn die Lizenz gültig ist, wählen Sie <b>Run Self-Test</b> (Selbsttest ausführen). Wenn der Test fehlschlägt oder wenn die Option zum Ausführen eines Selbsttests nicht verfügbar ist, melden Sie sich bei dem Gerät an, um nach einem Fehler im Zusammenhang mit der Serverkopplung zu suchen. Siehe Abschnitt Systemkonfiguration in NovaSeq 6000Dx Instrument-Produktdokumentation (Dokument-Nr. 200010105).</p> <p>Die Analyse sollte automatisch beginnen, nachdem das Problem behoben wurde. Verlassen Sie die Seite und navigieren Sie zur Seite Active Runs (Aktive Läufe), um zu bestätigen, dass die Analyse in Bearbeitung ist. Wenn das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an Illumina.</p>

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
Analyse bleibt stecken	„Analyse läuft“-Status in Illumina Run Manager dauert viel länger als erwartet	Die Netzwerkkonnektivität oder die Geräte- oder Serverleistung kann während der Analyse unterbrochen worden sein, wodurch die Analyse blockiert wurde	<p>Die Analyse abbrechen und auf Stromunterbrechung oder Verlust der Gerätenetzwerkverbindung prüfen.</p> <p>Warten Sie, bis sich das System im Leerlauf befindet (Sequenzierung abgeschlossen), gehen Sie dann zu Geräteeinstellungen (IVD SETTINGS) und bestätigen Sie die Verbindung zum angegebenen Ausgangsort. Wenn eine weitere Fehlerbehebung erforderlich ist, siehe NovaSeq 6000Dx Instrument-Produktdokumentation (Dokument-Nr. 200010105).</p> <p>Nachdem Sie das Problem behoben haben, stellen Sie die Analyse ohne Änderungen erneut in die Warteschlange ein. Siehe TruSight Whole Genome Analysis Application Handbuch (Dokument-Nr. 200049931).</p>

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
Analysedateien konnten nicht übertragen werden	„Übertragung der Analysedatei an den Speicher“-Status in Illumina Run Manager fehlgeschlagen	Netzwerkverbindungsproblem oder Unterbrechung der Geräte- oder Serverleistung während der Analysedatei-Übertragung	<p>Die Analyse abbrechen und auf Stromunterbrechung oder Verlust der Gerätenetzwerkverbindung prüfen.</p> <p>Warten Sie, bis sich das System im Leerlauf befindet (Sequenzierung abgeschlossen), gehen Sie dann zu Geräteeinstellungen (IVD SETTINGS) und bestätigen Sie die Verbindung zum angegebenen Ausgangsort. Wenn eine weitere Fehlerbehebung erforderlich ist, siehe NovaSeq 6000Dx Instrument-Produktdokumentation (Dokument-Nr. 200010105).</p> <p>Nachdem Sie das Problem behoben haben, stellen Sie die Analyse ohne Änderungen erneut in die Warteschlange ein. Siehe TruSight Whole Genome Analysis Application Handbuch (Dokument-Nr. 200049931).</p>
Analyse schlägt bei Warteschlange fehl	Analyse nach Warteschlange fehlgeschlagen	Wenn die Analyse erneut in die Warteschlange gestellt wird, wurde der ursprüngliche Lauf möglicherweise gelöscht oder archiviert und befindet sich nicht mehr an einem für den externen Speicherort angegebenen Ort	Überprüfen Sie, ob sich der ursprüngliche Lauf noch am externen Speicherort befindet. Wenn er archiviert wurde, stellen Sie ihn aus dem Archiv wieder her und führen Sie die Analyse erneut durch.

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
Sequenzierungsqualitätssicherung fehlgeschlagen	QC-Ergebnis der Sequenzierung gesamt im konsolidierten Bericht ist FAIL (fehlgeschlagen)	„Total % $\geq$ Q30“ liegt unter der analytischen Spezifikation aufgrund einer Fehlhandhabung von Sequenzierungsverbrauchsmaterialien (nicht vollständig aufgetaut oder nach dem Auftauen zum Mischen invertiert)	Weitere Informationen finden Sie im NovaSeq 6000Dx Instrument-Produktokumentation (Dokument-Nr. 200010105). Nach der Behebung des Problems kann die Bibliothek bis zu einmal (aufgrund des Volumens) erneut gepoolt und sequenziert werden.
FASTQ QC schlägt für alle Proben fehl	Das QC-Ergebnis für FASTQ gesamt und das QC-Ergebnis für die Probenbibliothek gesamt ist FAIL (fehlgeschlagen), wobei die QC-Metrikergebnisse der einzelnen Bibliothek als ND (nicht bestimmt) ausgegeben wurden, für alle Proben im konsolidierten Bericht mit QC-Ergebnis der Sequenzierung gesamt als PASS (bestanden)	Das Indexadapterkit, das während Create Run (Lauferstellung) angegeben wurde, ist nicht mit dem Kit aligniert, das während der Bibliotheksvorbereitung verwendet wurde	Überprüfen Sie bei den Proben die Indexinformationen, die in der Analyse in IRM verwendet wurden. Wenn eine Korrektur erforderlich ist, siehe Requeue Analysis (Analyse erneut in die Warteschlange stellen) in TruSight Whole Genome Analysis Application Handbuch (Dokument-Nr. 200049931).

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
FASTQ QC schlägt bei einer oder mehreren Proben ohne niedrigen Laufertrag fehl; nicht indiziertes Gesamtergebnis (GB) $\geq$ 2800 GB auf S4 oder $\geq$ 1000 GB auf S2	Das QC-Ergebnis für FASTQ gesamt und das QC-Ergebnis für die Probenbibliothek gesamt ist FAIL (fehlgeschlagen), wobei die QC-Metrikergebnisse der einzelnen Bibliothek als ND (nicht bestimmt) ausgegeben wurden, für einen oder mehrere, aber nicht für alle Proben im konsolidierten Bericht ohne niedriges Laufergebnis	Verwendungsfehler bei der Bibliotheksvorbereitung oder beim Poolen	<p>Bewerten Sie das/die verbleibende (n) Volumen auf der abschließenden Bibliotheksplatte (FLP), um zu bestätigen, dass Proben aus gepoolten Bibliotheken nicht verwendet wurden. Mit dem Volumen kann der Bediener bis zu einmal erneut poolen und sequenzieren. Alternativ können Sie fehlgeschlagene Proben im nächsten Bibliotheksvorbereitungs-Batch erneut in die Warteschlange stellen und nach Durchlesen der <a href="#">Gebrauchsanweisung auf Seite 16</a> ausführen.</p> <p>Optional können Sie die Ergebnisse einzelner Bibliotheken in FLP mittels qPCR auf <math>\geq</math> 0,94 nM (unter der Annahme einer Insertionsgröße von 450 bp) bewerten, um Probleme im Zusammenhang mit der Bibliotheksvorbereitung ein-/auszuschließen. Stellen Sie fehlgeschlagene Proben im nächsten Bibliotheksvorbereitungs-Batch erneut in die Warteschlange und führen diese nach Lesen der <a href="#">Gebrauchsanweisung auf Seite 16</a> aus.</p> <p>Es wird nicht empfohlen, Bibliotheken über Bibliotheksvorbereitungs-Batches hinweg zu poolen, da die Batch-to-Batch-Ergebnisse Schwankungen aufweisen, die zu einem höheren %CV und einer höheren Inzidenz von Fehlschlägen der „durchschnittlichen Autosomen-Coverage“ führen können.</p>

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
FASTQ QC schlägt bei einigen, nicht bei allen Proben mit geringem Laufertrag fehl; nicht indiziertes Gesamtergebnis (GB) niedrig, < 2800 GB auf S4 oder < 1000 GB auf S2	Das QC-Ergebnis für FASTQ gesamt und das QC-Ergebnis für die Probenbibliothek gesamt ist FAIL (fehlgeschlagen), wobei die QC-Metrikergebnisse der einzelnen Bibliothek als ND (nicht bestimmt) ausgegeben wurden, für einen oder mehrere, aber nicht für alle Proben im konsolidierten Bericht mit niedrigem Laufergebnis	Kann auf ein Bibliotheksvorbereitungs- oder Sequenzierungsproblem hinweisen	<p>Bewerten Sie die individuellen Bibliotheksergebnisse in FLP mittels qPCR für <math>\geq 0,94</math> nM (unter der Annahme einer Insertionsgröße von 450 bp), um Probleme in Bezug auf die Bibliotheksvorbereitung im Vergleich zu sequenzierungsbezogenen Problemen ein-/auszuschließen.</p> <p>Bei Verdacht auf ein Sequenzierungsproblem siehe NovaSeq 6000Dx Instrument-Produktdokumentation (Dokument-Nr. 200010105). Nach der Behebung des Problems können die Bibliotheken bis zu einmal (aufgrund des begrenzten Volumens) erneut gepoolt und sequenziert werden.</p> <p>Wenn ein Problem mit der Bibliotheksvorbereitung vermutet wird, lesen Sie die <a href="#">Tipps und Techniken auf Seite 13</a> sowie die <a href="#">Gebrauchsanweisung auf Seite 16</a> durch bevor Sie die Bibliotheksvorbereitung und -sequenzierung wiederholen. Bei wiederholten Fehlern wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.</p>

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
Bibliotheks-QC schlägt aufgrund geringer Coverage fehl	Zusammenfassung des QC-Ergebnisses der Probenbibliothek für eine oder mehrere Proben im konsolidierten Bericht aufgrund der durchschnittlichen Autosomen-Coverage und/oder des prozentualen Autosomen-Anteils mit einer Coverage über 20X und/oder der durchschnittlichen Mitochondrien-Coverage über das Genom, das die analytische Spezifikation nicht erfüllt	Problem(e) mit der Probenqualität oder der Bibliotheksvorbereitung	<p>Führen Sie eine erneute Quantifizierung mit Prozesskontrollen durch, um Probleme im Zusammenhang mit der DNA-Zugabe auszuschließen.</p> <p>Lesen Sie die <a href="#">Tipps und Techniken auf Seite 13</a> und die <a href="#">Gebrauchsanweisung auf Seite 16</a> durch, bevor Sie die fehlgeschlagenen Probe(n) im nächsten Bibliotheksvorbereitungs-Batch erneut in die Warteschlange stellen und durchlaufen lassen. Wenn es wiederholte Fehler für dieselbe Probe(n) gibt, kann dies auf Qualitätsproblem(e) der Probe hinweisen.</p> <p>Wenn ein Fehler wiederholt beobachtet wird, aber bei verschiedenen Proben, kann dies auf ein Problem im Zusammenhang mit der Bibliotheksvorbereitung in Bezug auf Bediener, Reagenz, Verbrauchsmaterial oder Ausrüstung hinweisen. Falls das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.</p>

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
Bibliotheks-QC schlägt aufgrund von GC-Bias fehl	Zusammenfassung des QC-Ergebnisses der Probenbibliothek für eine oder mehrere Proben im konsolidierten Bericht aufgrund der normalisierten Coverage bei 60 % bis 79 % der GC-Klassen und/oder der normalisierten Coverage bei 20 % bis 39 % der GC-Klassen, die die analytische Spezifikation nicht erfüllen	Übermäßiges ELM-Verschleppen oder übersprungenes Waschen führt zu GC-Verzerrung in der Coverage	Lesen Sie die <a href="#">Tipps und Techniken auf Seite 13</a> und die <a href="#">Gebrauchsanweisung auf Seite 16</a> durch, bevor Sie die fehlgeschlagenen Probe(n) im nächsten Bibliotheksvorbereitungs-Batch erneut in die Warteschlange stellen und durchlaufen lassen.
Bibliotheks-QC schlägt aufgrund von Kontamination für eine oder mehrere, aber nicht alle Proben im Lauf fehl	Das QC-Ergebnis gesamt der Probenbibliothek für eine oder mehrere, aber nicht alle Proben im konsolidierten Bericht lautet FAIL (fehlgeschlagen), da die geschätzte Probenkontamination die analytische Spezifikation nicht erfüllt	Kontaminierte Probe(n) oder keine Spitzenwechsel während der Proben- oder Bibliotheksvorbereitung	Lesen Sie die <a href="#">Tipps und Techniken auf Seite 13</a> und die <a href="#">Gebrauchsanweisung auf Seite 16</a> durch, bevor Sie die fehlgeschlagenen Probe(n) im nächsten Bibliotheksvorbereitungs-Batch erneut in die Warteschlange stellen und durchlaufen lassen. Bei wiederholtem Versagen(en) derselben Probe(n) kann die Proben-DNA kontaminiert sein.

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
Bibliotheks-QC schlägt aufgrund von Kontamination für alle Proben im Lauf fehl	QC-Ergebnis gesamt der Probenbibliothek für alle Proben im konsolidierten Bericht lautet FAIL (fehlgeschlagen), da die geschätzte Probenkontamination die analytische Spezifikation nicht erfüllt	Kontaminiertes Reagenz oder keine Spitzenwechsel während der Proben- oder Bibliotheksvorbereitung	Lesen Sie die <a href="#">Tipps und Techniken auf Seite 13</a> zur Vermeidung von Kontamination durch. Stellen Sie fehlerhafte Proben im nächsten Bibliotheksvorbereitung-Batch erneut in die Warteschlange und lassen Sie mit frischen Probenverdünnungen und Bibliotheksvorbereitungskit durchlaufen.
Ergebnis für Ploidie gesamt ND	Zusammenfassendes Ploidieergebnis als ND (nicht bestimmt) im konsolidierten Bericht ausgegeben	Das Geschlecht wurde während Create Run (Lauferstellung) als unbekannt aufgeführt	Bestätigen Sie im konsolidierten Bericht, dass „Provided sex chromosome ploidy“ (angegebene Geschlechtschromosomenploidie) „Unknown“ (Unbekannt) war. Es wird empfohlen, das Geschlecht in den Beispieldaten als „Male“ (männlich) oder „Female“ (weiblich) anzugeben, wenn es während Create Run (Lauferstellung) bekannt ist.
		DRAGEN gab ein anderes Geschlechtsplodie-Ergebnis aus als XX oder XY, wie z. B. XO oder XXY	Überprüfen Sie die Ausgabe „Ploidy estimation“ (Ploidie-Bestimmung) von DRAGEN im konsolidierten Bericht.

Problemtyp	Problem	Mögliche Ursache	Empfohlene Aktion
Ergebnis für Ploidie gesamt DISCORDANT (diskordant)	Zusammenfassendes Ploidieergebnis als DISCORDANT (diskordant) im konsolidierten Bericht ausgegeben	Potenzielles Problem beim Probentausch	Überprüfen Sie, ob die während Create Run (Laufstellung) einggegebenen Probendaten korrekt waren. Waren diese falsch, reihen Sie die Analyse mit Änderungen in die Warteschlange ein. Waren sie korrekt und es wird ein Problem mit dem Probenaustausch vermutet, wird empfohlen, die DISCORDANT-Probe(n) im nächsten Bibliotheksvorbereitungs-Batch in die Warteschlange zu stellen und auszuführen, um die Meldung falscher Ergebnisse zu vermeiden. Probensoftware erzwingt keinen Fehler für eine Probe mit einem DISCORDANT Summary Ploidy Result.

## Quellen

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. Apr. 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. Feb. 2010 PMID: 20179748; PMCID: PMC2987480.
8. Perlman S. Hereditary Ataxia Overview. 28. Okt. 1998 [aktualisiert 16. Nov. 2023]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., eds. *GeneReviews*. Seattle (WA): University of Washington, 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. Okt. 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. Sept. 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. Nov. 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. Mai. 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. Sept. 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. Sept. 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. Erratum in: *Nat Genet* 2002 Jan;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. Jun. 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/Gehirn/aws069. Epub 3. Apr. 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. Jul. 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. Jul. 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. Mär. 2003 PMID: 12640453.

# Anhang A

## S4-Indexsatz 1

Indexplatten-Well-ID	Index-Name	i7-Basen	i5-Basen
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 Indexsatz 2

Indexplatten-Well-ID	Index-Name	i7-Basen	i5-Basen
A03	UDP0081	TGTCGCTGGT	TCGTCTGACT
B03	UDP0082	ACCGTTACAA	CTCATAGCGA
C03	UDP0083	TATGCCTTAC	AGACACATTA
D03	UDP0084	ACAAGTGGAC	GCGCGATGTT
E03	UDP0085	TGGTACCTAA	CATGAGTACT
F03	UDP0086	TTGGAATTCC	ACGTCAATAC
G03	UDP0087	CCTCTACATG	GATACCTCCT

Indexplatten-Well-ID	Index-Name	i7-Basen	i5-Basen
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-Indexsatz 1

Indexplatten-Well-ID	Index-Name	i7-Basen	i5-Basen
A01	UDP0037	TGTAATCGAC	GATCACCGCG
B01	UDP0038	GTGCAGACAG	TACCATCCGT
C01	UDP0039	CAATCGGCTG	GCTGTAGGAA
D01	UDP0040	TATGTAGTCA	CGCACTAATG
E01	UDP0041	ACTCGGCAAT	GACAAC TGAA
F01	UDP0042	GTCTAATGGC	AGTGGTCAGG

## S2-Indexsatz 2

Indexplatten-Well-ID	Index-Name	i7-Basen	i5-Basen
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-Indexsatz 3

Indexplatten-Well-ID	Index-Name	i7-Basen	i5-Basen
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-Indexsatz 4

Indexplatten-Well-ID	Index-Name	i7-Basen	i5-Basen
A04	UDP0089	GTCCGTAAGC	CGTGTATCTT
B04	UDP0090	ACTTCAAGCG	GAACCATGAA
C04	UDP0091	TCAGAAGGCG	GGCCATCATA
D04	UDP0092	GCGTTGGTAT	ACATACTTCC
E04	UDP0093	ACATATCCAG	TATGTGCAAT
F04	UDP0094	TCATAGATTG	GATTAAGGTG

## Anhang B

Zusätzliche Berechnungen für Option 1: 280 ng DNA-Zugabe für Breitband-Quantifizierungsmethoden mit Quant und Qubit

### **Berechnung der Konzentrationsgrenzen für die DNA-Bestandskonzentration von 11,2 bis 154,0 ng/μl:**

Die Mindestkonzentration basiert auf  $280,0 \text{ ng DNA-Zugabe} / 25,0 \text{ μl Volumen} = 11,2 \text{ ng/μl}$ .

Ausgehend von einem Mindestpipettiervolumen von  $2,0 \text{ μl}$  beträgt die maximale Konzentration  $280 \text{ ng} \cdot 1,1$  (10 % Überschuss) /  $2,0 \text{ μl} = 154,0 \text{ ng/μl}$ , in einem Gesamtvolumen von  $27,5 \text{ μl}$ .

### **Beispielberechnungen mit 280,0 ng DNA-Zugabe**

Beispiel für DNA-Bestandskonzentration =  $95,0 \text{ ng/μl}$ :

- DNA-Bestandsvolumen (μl) =  $280,0 \text{ ng} \times 1,1 / 95,0 \text{ ng/μl} = 3,242 \text{ μl}$ , gerundet auf  $3,24 \text{ μl}$  für genaues Pipettieren mit P-10.
- Das Gesamtvolumen der verdünnten DNA wird auf  $27,5 \text{ μl}$  festgelegt.
- Volumen RSB (μl) =  $27,5 \text{ μl} - 3,24 \text{ μl} = 24,26 \text{ μl}$ , gerundet auf  $24,3 \text{ μl}$  für genaues Pipettieren mit P-200.

Beispiel für DNA-Bestandskonzentration =  $308,0 \text{ ng/μl}$ :

- Das DNA-Bestandsvolumen (μl) ist auf  $2,0 \text{ μl}$  festgelegt.
- Gesamtvolumen der verdünnten DNA (μl) =  $308,0 \text{ ng/μl} \times 2,0 \text{ μl} / 11,2 \text{ ng/μl} = 55,0 \text{ μl}$
- Volumen RSB (μl) =  $55,0 \text{ μl} - 2,0 \text{ μl} = 53,0 \text{ μl}$

Zusätzliche Berechnungen für Option 2: 350 ng DNA-Zugabe für die Accuclear Ultra hochempfindliche Quantifizierungsmethode

### **Berechnung der Konzentrationsgrenzen für DNA-Bestandskonzentrationen von 14,0 bis 192,5 ng/μl:**

Die Mindestkonzentration basiert auf  $350,0 \text{ ng DNA-Zugabe} / 25,0 \text{ μl Volumen} = 14,0 \text{ ng/μl}$ .

Ausgehend von einem Mindestpipettiervolumen von  $2,0 \text{ μl}$  beträgt die maximale Konzentration  $350 \text{ ng} \cdot 1,1$  (10 % Überschuss) /  $2,0 \text{ μl} = 192,5 \text{ ng/μl}$ .

### **Beispielberechnungen mit 350,0 ng DNA-Zugabe**

Beispielrechnung für eine DNA-Bestandskonzentration =  $118,75 \text{ ng/μl}$ :

- DNA-Bestandsvolumen (μl) =  $350,0 \text{ ng} \times 1,1 / 118,75 \text{ ng/μl} = 3,242 \text{ μl}$ , gerundet auf  $3,24 \text{ μl}$  für genaues Pipettieren mit P-10
- Das Gesamtvolumen der verdünnten DNA wird auf  $27,5 \text{ μl}$  festgelegt.

- Volumen RSB ( $\mu\text{l}$ ) =  $27,5 \mu\text{l} - 3,24 \mu\text{l} = 24,26 \mu\text{l}$ , gerundet auf  $24,3 \mu\text{l}$  für genaues Pipettieren mit P-200.

Beispiel für DNA-Bestandskonzentration =  $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l}$ :

- Das DNA-Bestandsvolumen ( $\mu\text{l}$ ) ist auf  $2,0 \mu\text{l}$  festgelegt.
- Gesamtvolumen verdünnter DNA ( $\mu\text{l}$ ) =  $308,0 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 2,0 \mu\text{l} / 14,0 \text{ ng}/\mu\text{l} = 44,0 \mu\text{l}$
- Volumen RSB ( $\mu\text{l}$ ) =  $44,0 \mu\text{l} - 2,0 \mu\text{l} = 42,0 \mu\text{l}$

## Versionsverlauf

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 200050132 v00.1	Mai 2024	Zugabemenge für die Accuclear Ultra hochempfindliche Quantifizierungsmethode korrigiert.
Dokument-Nr. 200050132 v00	April 2024	Erste Version.

## Packungsbeilage

### Patente und Marken

Dieses Dokument und sein Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. sowie deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit der Verwendung des hier beschriebenen Produkts/der hier beschriebenen Produkte und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Dokument und sein Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina zu keinem anderen Zweck verwendet oder verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichem Recht bzw. ähnlichen Rechten an Drittparteien.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Verwendung des Produkts/der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTE ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN UND JEGLICHE FÜR DAS PRODUKT/DIE PRODUKTE GELTENDE GEWÄHRLEISTUNG ERLISCHT.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

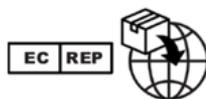
© 2024 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

### Kontaktinformationen



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
92122 San Diego, Kalifornien, USA  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

#### Australischer Sponsor

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

### Produktkennzeichnungen

Die vollständige Referenz der Symbole, die auf der Produktverpackung und -beschriftung verwendet werden, finden Sie im Symbolschlüssel unter „support.illumina.com“ auf der Registerkarte *Documentation* (Dokumentation) für Ihr Kit.