

## MOS v4 бар құралдарға арналған бума кірістіру

IN VITRO ДИАГНОСТИКАЛЫҚ ҚОЛДАНУ ҮШІН. ТЕК ЭКСПОРТТАУ ҮШІН.

## Қолдану мақсаты

MiSeqDx құралы *in vitro* диагностикалық (IVD) талдауларымен бірге пайдаланылған кезде перифериялық жаңа алынған қаннан немесе формалинде бекітілген, парафинге ендірілген (FFPE) тіннен алынған адамның геномдық ДНҚ ішіндегі ДНҚ кітапханаларының мақсатты секвендеуіне арналған. MiSeqDx құралы толық геномға немесе *de novo* секвенирлеуге арналмаған. MiSeqDx құралы тіркелген және тізімделген, тазартылған немесе мақұлданған IVD реагенттерімен және аналитикалық бағдарламалық құралмен бірге қолданылуы керек.

## Процедураның принциптері

Illumina MiSeqDx құралы перифериялық толық қаннан, эмбриондық тіннен немесе тіркелген және тізімде көрсетілген FFPE үлгілерінен алынған адам ДНҚ-сынан дайындалған Illumina көмегімен секвенирлеуші шығын материалдары мен кітапханаларды, тазартылған немесе бекітілген IVD реагенттерін пайдаланып, адам ДНҚ-ның мақсатты қайта секвенциясына арналған. Кітапханалар мақсаттарды күшейту және үлгі индекстері мен түсіру ретін қосу арқылы дайындалады. Үлгі кітапханалары ағын ұяшығына түсіріледі және синтез химиясы бойынша секвенирлеу (SBS) арқылы құралда реттелген. SBS химиясы бір нуклеотидті негіздерді анықтау үшін қайтымды-терминатор әдісін пайдаланады, өйткені олар өсіп келе жатқан ДНҚ тізбектеріне енгізілген. Real-Time Analysis (RTA) бағдарламалық құралы кескінді талдауды және негізгі шақыруды орындайды және әр реттілік циклі үшін әр негізге сапа ұпайын тағайындайды. Негізгі талдау аяқталған кезде, MiSeqDx құралындағы қосымша талдау негізгі шақыруларды өңдейді.

Өңдеу әдетте демультимплекстеуді, FASTQ файлын жасауды, теңестіруді, нұсқаны шақыруды және анықтамалық геномның нақты позицияларында табылған нұсқалар туралы ақпаратты қамтитын нұсқалық шақыру пішімі (VCF) файлдарын генерациялауды қамтиды. MiSeqDx жұмыс процесіне байланысты қосымша талдау үшін әртүрлі модульдерді пайдаланады.

## Қос жүктеу конфигурациясы

Қос жүктеу конфигурациясы MiSeqDx құралына *in vitro* диагностикалық (IVD) және тек зерттеуге арналған (RUO) реттілік талдауларын орындауға мүмкіндік беретін аппараттық құралды, бағдарламалық құралды және орнату процедураларын қамтиды. Қосарлы жүктеу конфигурациясы пайдаланушыға құралдың диагностикалық режимінен аспаптық зерттеу режиміне ауысуға мүмкіндік береді. Реттеу шығыс материалдарындағы радиожилілік идентификациялары (RFID) RUO реттілігі реагенттерін диагностикалық реттілікте пайдалануды болдырмайды.

## Процедураның шектеулері

- *In vitro* диагностикалық пайдалану үшін.
- Таңбалауда ұсынылған нәтижелер перифериялық толық қанды немесе ұрық сызығының өнімділігі үшін жасуша линияларын және сипатталған реагенттер мен бағдарламалық модульдермен соматикалық өнімділікке арналған FFPE ұлпасын немесе FFPE жасуша желілерін қолданатын репрезентативті талдау тақталарымен алынды. Germline Variant және Somatic Variant модульдері репрезентативті талдаулармен өнімділікті бағалау мақсатында әзірленген. Өнімділік сипаттамалары тек ақпараттық мақсаттар үшін берілген. Ұсынылған валидация сынағы, жоғары өткізу қабілеттілігін көрсету үшін қызмет етеді және қандай да бір нақты мәлімдемелерге қатысты құралдың мүмкіндіктерін немесе жарамдылығын белгілемейді. Осы құралда пайдалану үшін әзірленген барлық диагностикалық сынақтар өнімділіктің барлық аспектілері үшін толық тексеруді қажет етеді.
- Бұл өнім мыналарды жеткізумен шектеледі:
  - 2 x 150 бит оқу ұзындығында реттілік шығысы  $\geq 5$  Гб
  - Оқулар өту сүзгісі  $\geq 15$  миллион оқу ұзақтығы 2 x 150 бит
  - 2 x 150 bp оқу ұзақтығы кезінде Q30  $\geq 80\%$  жоғары негіздер  
Базалардың тең немесе 80%-дан астамында Phred шкаласының сапа ұпайлары 30-дан жоғары, бұл негізгі шақырудың 99,9%-дан жоғары дәлдігін көрсетеді.
- MiSeqDx құралы перифериялық толық қан немесе FFPE тінінен алынған адам ДНҚ кітапханаларының ретін келтіру үшін ғана расталған. Басқа үлгі түрлерінен жасалған кітапханаларды *in vitro* диагностикалық пайдалану үшін осы құралмен бірге пайдаланбау керек. Бұл құралдың клиникалық үлгілерден микробтық немесе вирустық нуклеин қышқылдарын секвенирлеуге арналған өнімділігі анықталмаған.
- MiSeqDx тіркелген және тізімделген, тазартылған немесе мақұлданған IVD реагенттері немесе талдауларымен *in vitro* диагностикалық пайдалануға арналған. Осы бумада сипатталған реагент шектеулері мен өнімділік сипаттамалары репрезентативті талдаулар мен бағдарламалық модульдерге негізделген. IVD талдаулары үшін мақсатты пайдалану, анықталған нұсқалар және үлгі түрі үшін талдауға арналған арнайы бума қосымшасын қараңыз.
- Ұзындығы 25 бит-тен асатын Indel (енгізулер, жоюлар және олардың комбинациялары) контенті талдау бағдарламалық құралымен тураланбайды. Демек, 25 бит-тен асатын ұзындықтағы индекстерді талдау бағдарламалық құралы анықтамайды.
- Жүйе Germline және Somatic Variant модулінің бағдарламалық жасақтамасымен пайдаланылған кезде бір нуклеотидтік нұсқаларды (SNV) және 25 битке дейін жоюларды және 24 бит енгізулерді анықтау үшін расталған. Соматикалық шақыру үшін 0,05 нұсқа жиілігінде 25 bp жою және 18 бит енгізу анықталды.
- Төтенше нұсқа контенті бар ампликон көрсеткіштері талдау бағдарламалық құралымен тураланбауы мүмкін, нәтижесінде аймақ жабайы түр ретінде хабарланады. Мұндай экстремалды контентке мыналар кіреді:

- Құрамында үш көрсеткіштен көп оқылатындар.
- SNV контенті ампликонның жалпы мақсатты ұзындығының 4%-дан жоғары (зонд аймақтарын қоспағанда) кемінде 30 бит ұзындықтағы көрсеткіштер.
- SNV контенті ампликонның жалпы ұзындығының 10%-дан жоғары (зонд аймақтарын қоса алғанда) ұзындығы 30 бит-тен аз көрсеткіштер.
- Көп нуклеотидті нұсқаларды (MNV) және үлкен индекстерді қоса алғанда, үлкен нұсқалар шығыс VCF файлында бөлек кішірек нұсқалар ретінде хабарлануы мүмкін.
- Жою нұсқалары сүзгіден өтуі немесе екі тақтайшалы ампликондарды қамтитын кезде өткізіп жіберуі мүмкін, егер жою ұзындығы плиткалы ампликондар арасындағы қабаттасудан үлкен немесе оған тең болса.
- Жүйе индельдерді анықтай алмайды, егер олар праймерге тікелей іргелес болса және қабаттасатын ампликон болмаса. Қайталанатын ампликондары бар аймақтар үшін қабаттасу аймағы анықталатын жою өлшемінен кішірек болғанда талдау жоюларды анықтай алмайды. Мысалы, егер екі көршілес ампликондар арасындағы қабаттасу аймағы екі (2) негіз болса, талдау сол негіздердің екеуін қоса алғанда ешбір жоюды анықтай алмайды. Осы негіздердің кез келгенінде бір негізді жоюды анықтауға болады.
- Кез келген гибридизацияға негізделген кітапхананы дайындау жұмыс үрдісіндегі сияқты, олигонуклеотидтерді байланыстыратын аймақтардағы негізгі полиморфизмдер, мутациялар, кірістірулер немесе жоюлар зерттелетін аллельдерге әсер етуі мүмкін. Демек, реттілік кезінде жасалған шақыруларға да әсер етеді. Мысалы:
  - Праймер аймағындағы нұсқасы бар фазадағы нұсқа күшейтілмеуі мүмкін, нәтижесінде жалған теріс болады.
  - Праймер аймағындағы нұсқалар гомозиготалық нұсқаны дұрыс емес шақыруға әкелетін анықтамалық аллельдің күшейтілуіне жол бермеуі мүмкін.
  - Праймер аймағындағы Indel нұсқалары праймерге іргелес оқудың соңында жалған оң шақыруды тудыруы мүмкін.
- Егер олар бір оқудың соңына жақын орын алса және туралау кезінде жұмсақ кесілген болса, жолақтардың қисаюына байланысты сүзгілеуге болады.
- Шағын MNV расталмаған.
- Көшіру санының нұсқалары немесе біріктіру немесе транслокация сияқты құрылымдық нұсқалар расталмаған.
- Жыныс жолына тән шектеулер:
  - Germline Variant Module пайдаланатын MiSeqDx жүйесі ұрық сызығының нұсқасын шақыру (яғни, гомозиготалы, гетерозиготалы, жабайы тип) үшін сапалы нәтижелерді беруге арналған.
  - Germline Variant Module бірге пайдаланылған кезде нақты нұсқаны шақыру үшін қажет әр ампликонның минималды қамтуы 150x құрайды. Үлгілердің саны және мақсатты негіздердің жалпы саны қамтуға әсер етеді. GC контенті және басқа геномдық контент қамтуына әсер етуі мүмкін.

- Көшірме санының вариациясы нұсқаның гомозиготалы немесе гетерозиготалы екеніне әсер етуі мүмкін.
- Белгілі бір қайталанатын контексттегі нұсқалар VCF файлдарында сүзіледі. RMxN қайталау сүзгісі нұсқа позициясына іргелес сілтеме геномында нұсқа ретінің барлығы немесе бір бөлігі қайта-қайта болса, нұсқаларды сүзу үшін пайдаланылады. Тұқымдық сызығының нұсқасын шақыру үшін сүзгіден өтетін нұсқа үшін анықтамадағы кемінде 9 қайталау қажет және ұзындығы 5 битке дейінгі қайталаулар ғана қарастырылады (R5x9).
- Соматикалық спецификалық шектеулер:
  - Соматикалық нұсқа модулін пайдаланатын MiSeqDx жүйесі соматикалық нұсқаны шақыру үшін сапалы нәтижелерді жеткізуге арналған (яғни, 0,05 анықтау шегімен 0,026-дан жоғары немесе оған тең нұсқа жиілігі бар соматикалық нұсқаның болуы).
  - Соматикалық нұсқа модулімен бірге пайдаланылған кезде нақты нұсқаны шақыру үшін қажет ампликонның минималды қамтуы әр олигонуклеотид пулына 450x құрайды. Үлгілердің саны және мақсатты негіздердің жалпы саны қамтуға әсер етеді. GC контенті және басқа геномдық контент қамтуына әсер етуі мүмкін.
  - Белгілі бір қайталанатын контексттегі нұсқалар VCF файлдарында сүзіледі. RMxN қайталау сүзгісі нұсқа позициясына іргелес сілтеме геномында бірнеше рет бар нұсқа реттілігінің барлық немесе бір бөлігіндегі нұсқаларды сүзу үшін пайдаланылады. Соматикалық нұсқаны шақыру үшін сүзгіден өтетін нұсқа үшін анықтамадағы кемінде 6 қайталау қажет және ұзындығы 3 битке дейінгі қайталаулар ғана қарастырылады (R3x6).
  - Соматикалық нұсқа модулі ұрық сызығы мен соматикалық нұсқаларды ажырата алмайды. Модуль нұсқа жиіліктерінің диапазонындағы нұсқаларды анықтауға арналған, бірақ соматикалық нұсқаларды ұрық сызығының нұсқаларынан ажырату үшін нұсқа жиілігін пайдалану мүмкін емес.
  - Үлгідегі қалыпты тін нұсқаларды анықтауға әсер етеді. Анықтаудың хабарланған шегі ісік пен қалыпты тіннен алынған жалпы ДНҚ-ға қатысты нұсқа жиілігіне негізделген.

## Өнімнің құрамдас бөліктері

Illumina MiSeqDx мыналардан тұрады:

MiSeqDx Құрал (Каталог № DX-410-1001)

Келесі бағдарламалық құрал компоненттері MiSeqDx құралының жұмысы және деректерді талдау үшін қажет:

Бағдарламалық қамтамасыз ету қолданбасы	Функция	Сипаттама
MiSeq операциялық бағдарламалық құралы (MOS)	Құралдың жұмысын басқарады	MOS бағдарламалық құрал қолданбасы реттілік кезінде құралдың жұмысын басқарады және Real-Time Analysis (RTA) бағдарламалық құралымен пайдалану үшін кескіндерді жасайды. Қосымша ақпаратты <i>MOS v4 үшін MiSeqDx құралының анықтамалық нұсқаулығы (құжат № 200010452)</i> бөлімінен қараңыз.
Real-Time Analysis (RTA)	Бастапқы талдауды орындайды	RTA бағдарламалық жасақтамасы MOS арқылы жасалған кескіндерді тізбеудің әр циклі үшін Local Run Manager талдау модульдерінің кірістері болып табылатын негізгі шақыру файлдарына түрлендіреді. RTA бағдарламалық құралының қолданбасында пайдаланушы интерфейсі жоқ.
Local Run Manager	Модуль таңдауға арналған интерфейс	Local Run Manager бағдарламалық құралы пайдаланушыны басқаруға, қосымша талдауды орындауға және статусты бақылауға арналған құралдағы біріктірілген шешім болып табылады. Қосымша ақпаратты <i>MiSeqDx үшін Local Run Manager v4 бағдарламалық құралының анықтамалық нұсқаулығы (құжат №200046657)</i> бөлімінен қараңыз.

## Сақтау және өңдеу

Элемент	Техникалық сипаттама
Температура	Тасымалдау және сақтау: -10°C - 40°C (14°F - 104°F) Жұмыс шарттары: 19°C - 25°C (66°F - 77°F)
Ылғалдылық	Тасымалдау және сақтау: Конденсацияланбайтын ылғалдылық Жұмыс шарттары: 30–75% салыстырмалы ылғалдылық (конденсацияланбайтын)

Қажет жабдықтар және материалдар, бірге берілмейді

## Шығын материалдарының реттілігі

MiSeqDx Reagent Kit v3 (Каталог № 20037124)

MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro (Каталог № 20063860)

## Пайдаланушы беретін шығын материалдары

Іске қосуды бастамас бұрын келесі пайдаланушы қамтамасыз ететін шығын материалдарының қолжетімді екеніне көз жеткізіңіз.

Тұтынылатын	Мақсат
Алкогольді майлықтар, 70% изопропил немесе Этанол, 70%	Ағын ұяшығы шынысын және сатысын тазалау
Зертханалық тін, төмен талшықты	Ағындық жасуша сатысын тазалау
Объективті қағаз, 4 x 6 дюйм.	Ағын ұяшығын тазалау
20 аралығы	Құралды жуу
Пинцет, төртбұрышты пластик (міндетті емес)	Ағын ұяшығын ағын ұяшығы тасымалдау контейнерінен шығару
Су, зертханалық	Құралды жуу

## Зертханалық дәрежедегі суға арналған нұсқаулық

Құрал процедураларын орындау үшін әрқашан зертханалық суды немесе ионсыздандырылған суды пайдаланыңыз. Құбыр суын ешқашан пайдаланбаңыз.

Судың тек келесі сорттарын немесе баламаларын пайдаланыңыз:

- Деионизацияланған су
- Illumina PW1
- 18 мегаом (MΩ) су
- Milli-Q суы
- Super-Q су
- Молекулалық биология деңгейіндегі су

## Ескертулер мен сақтық шаралары



### ЕСКЕРТУ

**Бұл реагенттер жинағында ықтимал қауіпті химиялық заттар бар. Дене жарақаты демді ішке тарту, жұту, теріге тию және көзге тию нәтижесінде орын алуы мүмкін. Желдету реагенттердегі қауіпті материалдармен жұмыс істеуге сәйкес болуы керек. Әсер ету қаупіне сәйкес көзілдірік, қолғап және зертханалық халат секілді қорғаныш құралдарын киіңіз. Қолданылған реагенттерді химиялық қалдық ретінде өңдеңіз және қолданыстағы аймақтық, ұлттық және жергілікті заңдар мен ережелерге сәйкес тастаңыз. Қоршаған ортаны қорғау, денсаулық және қауіпсіздік туралы қосымша ақпаратты [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html) сайтындағы SDS бөлімінен қараңыз.**

- Барлық қан үлгілерін адамның иммун тапшылығы вирусы (АИТВ), адамның В гепатиті вирусы (HBV) және қан арқылы тасымалданатын басқа қоздырғыш агенттері (әмбебап сақтық шаралары) үшін жұқпалы екені белгілі болғандай ұстаңыз.

- Көрсетілгендей процедураларды орындамау қате нәтижелерге немесе үлгі сапасының айтарлықтай төмендеуіне әкелуі мүмкін.
- Қалыпты зертханалық сақтық шараларын қолданыңыз. Тамшуырды ауызға тамызуға болмайды. Белгіленген жұмыс орындарында тамақ, сусын ішпеңіз немесе темекі шекпеңіз. Үлгілер мен жинақ реагенттерімен жұмыс істегенде бір рет қолданылатын қолғап пен зертханалық халат киіңіз. Үлгілер мен жинақ реагенттерімен жұмыс істегеннен кейін қолды мұқият жуыңыз.
- ПТР өнімдерінің реагенттерді, құралдарды және геномдық ДНҚ үлгілерін ластануы үшін тиісті зертханалық тәжірибелер мен орынды зертханалық гигиенаны ұстану қажет. ПТР ластануы дәл емес және сенімсіз нәтижелерге әкелуі мүмкін.
- Ластанудың алдын алу үшін күшейтуге дейінгі және кейінгі күшейту аймақтарында арнайы жабдық пен шығыс материалдары (мысалы, тамшуырлар, тамшуыр ұштары, жылу блоктары, құйындылар және центрифугалар) бар екеніне көз жеткізіңіз.
- Қажет болса, индекс-үлгі жұптамасы басып шығарылған пластинаның орналасуына дәл сәйкес келуі керек. Local Run Manager модульге енгізілген кезде үлгі атауларымен байланысты индекс праймерлерін автоматты түрде толтырады. Пайдаланушыға тізбектеуді іске қосуды бастамас бұрын индекс праймерлерінің үлгілермен байланысын тексеру ұсынылады. Үлгі мен пластинаның орналасуы арасындағы сәйкессіздіктер оң үлгіні сәйкестендіруді жоғалтуға және нәтиже туралы қате есеп беруге әкеледі.
- Компьютерді вирустардан қорғау үшін пайдаланушы ұсынатын антивирустық бағдарламалық құралды орнату ұсынылады. Орнату нұсқауларын пайдаланушы нұсқаулығынан қараңыз.
- Панельдердің ешқайсысын алып тастаған кезде MiSeqDx құрылғысын пайдаланбаңыз. Аспапты панельдердің кез келгенін алып тастап жұмыс істеу желідегі кернеу мен тұрақты кернеудің ықтимал әсерін тудырады.
- Ағын ұяшығы бөлігіндегі ағын ұяшығының күйіне қол тигізбеңіз. Бұл бөліктегі қыздырғыш 22°C және 95°C аралығында жұмыс істейді және күйіп қалуға әкелуі мүмкін.
- Құралдың салмағы шамамен 126 фунт. құлап кетсе немесе дұрыс ұстамаса ауыр жарақатқа әкелуі мүмкін.
- Осы өнімге қатысты кез келген ауыр оқиғалар туралы дереу Illumina және пайдаланушы мен емделуші орналасқан мүше мемлекеттердің құзыретті органдарына хабарлаңыз.

## Пайдалану нұсқаулары

MiSeqDx құралын пайдалану бойынша келесі нұсқаулар MiSeqDx Reagent Kit v3 бөлімінде берілген реагенттерді қажет етеді.

## Local Run Manager көмегімен іске қосуды жасау

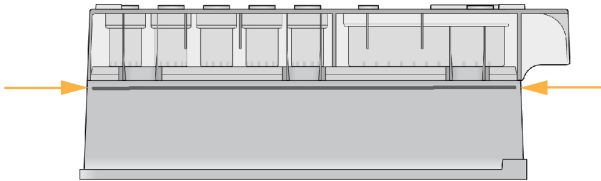
Орындауды жасау бойынша толық нұсқауларды *MiSeqDx үшін Local Run Manager v4 бағдарламалық құралының анықтамалық нұсқаулығы* (құжат №200046657) бөлімінен және сіз пайдаланатын талдау Local Run Manager модулінің нұсқаулығынан қараңыз.

## Реагент картриджді дайындаңыз

Төмендегі нұсқаулар бөлме температурасындағы су ваннасын пайдаланып реагенттерді еріту жолын сипаттайды.

1. Реагент картриджді  $-15^{\circ}$ -тан  $-25^{\circ}\text{C}$ -қа дейін алып тастаңыз.
2. Реагент картриджді реагент картридждің негізін реагент картридждіңде басылған су сызығына дейін батыру үшін жеткілікті бөлме температурасында ионсыздандырылған суы бар су моншасына салыңыз. Судың максималды су құбырынан асып кетуіне жол бермеңіз.

1-сурет Максималды су құбыры



3. Реагент картриджді бөлме температурасындағы су ваннасында шамамен 60–90 минут немесе толығымен ерігенше ерітуге рұқсат етіңіз.
4. Картриджді су моншасынан алыңыз да, картриджді түбінен суды шығару үшін оны орындыққа ақырын түртіңіз. Картридждің негізін құрғатыңыз. Реагент картридждің үстіне су шашырамағанын тексеріңіз.

## Реагент картриджді тексеріңіз

1. Ерітілген реагенттерді араластыру үшін реагент картриджді он рет төңкеріңіз, содан кейін барлық позициялардың ерігенін тексеріңіз.
2. 1, 2 және 4 позицияларындағы реагенттерді тексеріп, олардың толық араласқанына және тұнбалардың жоқтығына көз жеткізіңіз.

**ЕСКЕРТУ** Картридждегі реагенттер дұрыс реттілікке кепілдік беру үшін мұқият еріту және араластыру өте маңызды.

3. Реагенттердегі ауа көпіршіктерін азайту үшін орындықтағы картриджді ақырын түртіңіз.

**ЕСКЕРТУ** MiSeqDx сорғыш түтіктері реагенттерді сору үшін әр резервуардың түбіне түседі, сондықтан резервуарларда ауа көпіршіктері болмауы маңызды.



4. Реагент картриджін мұзға салыңыз немесе 2°C–8°C (алты сағатқа дейін) жұмысты орнатуға дайын болғанша қалдырыңыз. Ең жақсы нәтижелерге қол жеткізу үшін үлгіні жүктеуге және іске қосуды орнатуға тікелей өтіңіз.

## Үлгілерді реттілікке дайындаңыз

Кітапхананы сұйылтуды және біріктіруді қоса, реттілікке үлгі кітапханаларды дайындау туралы нұсқауларды кітапхананы дайындау бумасы кірістірмесінің «Пайдалану нұсқаулары» бөлімін қараңыз.

Үлгі кітапханаларының сұйылтуы олигонуклеотидтік пулдардың күрделілігіне байланысты. MiSeqDx бойынша кластер тығыздығын оңтайландыру қажет және оңтайлы кластер тығыздығы кітапхананы дайындаудың нақты талдауына байланысты өзгереді.

## Үлгі кітапханаларын картриджге жүктеңіз

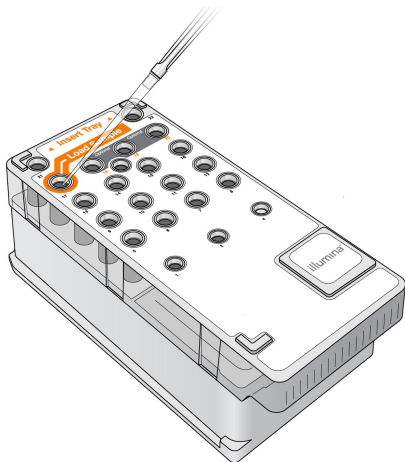
Реагент картриджі толығымен еріген кезде және пайдалануға дайын болғанда, үлгілерді картриджге салуға дайынсыз.

1. **Load Samples** (Үлгілерді жүктеу) деп белгіленген реагент картриджіндегі резервуардың үстіндегі фольга тығыздағышын тесу үшін бөлек, таза және бос 1 мл тамшуыр ұшын пайдаланыңыз.

**ЕСКЕРТУ** Басқа реагент орындарын теспеңіз. Басқа реагент позициялары іске қосу кезінде автоматты түрде тесіледі.

2. 600 мкл тамшуырмен дайындалған сұйылтылған ампликон кітапханасы (DAL) үлгі кітапханаларын **Load Samples** (Үлгілерді жүктеу) резервуарына салыңыз. Фольга тығыздағышына қол тигізбеңіз.
3. Үлгіні жүктегеннен кейін резервуарда ауа көпіршіктерінің бар-жоғын тексеріңіз. Ауа көпіршіктері болса, көпіршіктерді босату үшін орындықтағы картриджді ақырын түртіңіз.

2-сурет Кітапханаларды жүктеңіз



4. MiSeq операциялық бағдарламалық құралы (MOS) интерфейсін пайдаланып тікелей іске қосу орнату қадамдарына өтіңіз.

## Орнатуды іске қосыңыз

Толық іске қосу орнату нұсқауларын *MOS v4 үшін MiSeqDx құралының анықтамалық нұсқаулығы (құжат № 200010452)* бөлімінен қараңыз.

1. MiSeqDx жүйесіне Local Run Manager бағдарламалық құралының құпиясөзі арқылы кіріңіз.
2. MOS бағдарламалық құралының негізгі экранынан **Sequence** (Реттілік) тармағын таңдаңыз.
3. Тізімнен іске қосуды таңдап, **Next** (Келесі) опциясын таңдаңыз.  
Орнату экрандарының қатары келесі ретпен ашылады: Ағын ұяшығын жүктеңіз, реагенттерді жүктеңіз, қарап шығыңыз және жұмысты алдын ала тексеріңіз.
4. Ағын ұяшығын жүктеу экраны пайда болғанда, ағын ұяшығын тазалап, содан кейін жүктеңіз.
5. Ағын ұяшығының ысырмасын және ағын ұяшығы бөлігінің есігін жабыңыз.  
Іске қосуды бастамас бұрын ысырма мен бөліктің есігі жабылуы керек. Ағын ұяшығы жүктелген кезде бағдарламалық құрал RFID оқиды және жазады. RFID сәтті оқылғанын растау экранның төменгі оң жақ бұрышында пайда болады.
6. MiSeqDx SBS Solution (PR2) бөтелкесін салу үшін бағдарламалық құрал нұсқауларын орындаңыз, қалдық бөтелкенің бос екеніне көз жеткізіңіз және реагент картриджін салыңыз.  
MiSeqDx SBS Solution (PR2) бөтелкесі мен реагент картриджі жүктелгенде, бағдарламалық құрал RFID-ді оқиды және жазады. RFID сәтті оқылғанын растау экранның төменгі оң жақ бұрышында пайда болады.
7. Орындау басталған кезде Секвенция экраны ашылады. Бұл экран қарқындылық пен сапа ұпайларын (Q-баллдары) қоса, орындалып жатқан жұмыстың көрнекі көрінісін береді.

## Нәтижелер

Real-Time Analysis (RTA) — кескін талдауын және негізгі шақыруды орындайтын және әр реттілік циклі үшін әр негізге сапа ұпайын тағайындайтын біріктірілген бағдарламалық құрал. Бастапқы талдау аяқталғанда, 1-беттегі *Local Run Manager көмегімен іске қосуды жасау* 8-бетте MiSeqDx құралдағы модуль қосымша талдауды бастайды. Басқа жұмыс процестері үшін талдауға арналған құжаттаманы қараңыз.

## Сапаны бақылау процедуралары

MiSeqDx бағдарламалық құралы әр іске қосуды, үлгіні және негізгі шақыруды сапа бақылау көрсеткіштеріне қарсы бағалайды. Қажет болған жағдайда, кітапхананы дайындауға енгізілген оң және теріс бақылаулар күтілетін нәтижелер үшін де бағалануы керек.

## Өнімділік сипаттамалары

Барлық зерттеулер MiSeqDx бойынша орындалды.

Гермлиндік зерттеулерде кітапхананы дайындау үшін MiSeqDx муковисцидоз 139-вариант талдауы немесе TruSeq Custom Amplicon Kit Dx реагенттері пайдаланылды. Екі жинақ бірдей кітапхананы дайындау реагенттерін пайдаланады және жұмыс процесінің бір ғана айырмашылығы бар: полимеразды тізбекті реакция (ПТР) циклдарының саны (тиісінше 25 және 28). Қосымша ПТР циклдері TruSeq Custom Amplicon Kit Dx көмегімен ДНҚ енгізу зерттеуінде көрсетілгендей, MiSeqDx муковисцидоз 139-нұсқа талдауына (250 нг) қатысты TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (50 нг) көмегімен төменірек ДНҚ енгізуіне мүмкіндік береді. MiSeqDx цистикалық фиброз 139-нұсқа талдауымен дайындалған кітапханалар жинақтағы ілеспе секвенирлеу реагенттерімен реттелген. TruSeq Custom Amplicon Kit Dx көмегімен дайындалған кітапханалар MiSeqDx Reagent Kit v3 арқылы реттелген. Соңғы реттілік реагенттері MiSeqDx муковисцидоз 139-вариант талдауындағыларға қарағанда өнімділікті арттырды.

Сынақ MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro қолдайтын үлгі өткізу ауқымдарын қамтиды. MiSeqDx талдауға байланысты 1–96 үлгі/іске қолдау көрсете алады. MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro таңдалған талдаулар үшін осы ауқымдағы үлгінің төменгі өткізу қабілетін қолдауға арналған.

Соматикалық зерттеулер TruSeq Custom Amplicon Kit Dx көмегімен MiSeqDx Reagent Kit v3 пайдаланылды.

Кітапханаларды реттілікке дайындау үшін TruSeq Custom Amplicon Kit Dx үшін сипатталған ұрық сызығы немесе соматикалық жұмыс ағындары екі ерекшелікті қоспағанда, тиісінше Germline Variant Module немесе Somatic Variant Module арқылы талдау жүргізілді. Бір генді (ұрық сызығының өнімділігі; MiSeqDx цистикалық фиброз 139-нұсқа талдауы) немесе екі генді (соматикалық өнімділік) репрезентативті мутация панелі ретінде пайдаланатын зерттеулер талдауға арнайы жұмыс үрдістері мен талдау модульдерін пайдаланды.

**ЕСКЕРТУ** Ампликонның геномдық контенті реттелген геномдық тізбекке қатысты қорытындыланады.

Минус тізбекке қарсы жасалған ампликондар үшін сілтеме геномының контенті кері комплемент болып табылады (мысалы, минус тізбекті ампликондардағы PolyA аймақтары сілтеме геномындағы PolyT аймақтарына сәйкес келеді).

## Өнімділік сипаттамаларында қолданылатын есептеулердің анықтамалары

- Позитивті пайыздық келісім (PPA) талдау арқылы дұрыс хабарланған анықтамалық әдіс бойынша нұсқалар ретінде жіктелген локустардың үлесі ретінде есептеледі.
  - (# нұсқа локус талдау арқылы дұрыс есептелген) / (нұсқа локустарының жалпы # саны)Анықтамалық әдіске сәйкес талдау арқылы хабарланған нұсқалық локустар шынайы позитивті болып табылады (TP). Анықтамалық шақырулар немесе талдау арқылы әртүрлі нұсқа

шақырулары ретінде хабарланған нұсқа локустары жалған негативтер (FNs) болып табылады

- Теріс пайыздық келісім (NPA) талдау арқылы дұрыс хабарланған анықтамалық әдіс бойынша жабайы түр ретінде жіктелген локустардың үлесі ретінде есептеледі.
  - (# жабайы типті локус талдау арқылы дұрыс хабарланған)/ (жалпы # жабайы типті локус)  
Анықтамалық әдіспен сәйкес келетін талдау арқылы хабарланған жабайы типті локустар шынайы теріс (TN) болып табылады. Талдау арқылы нұсқалар ретінде хабарланған жабайы типті локустар жалған позитивтер (FPs) болып табылады.
- Жалпы пайыздық келісім (OPA) анықтамалық әдіске қатысты талдау арқылы дұрыс хабарланған локустардың үлесі ретінде есептеледі.
  - ((талдау арқылы дұрыс хабарланған локустар саны) + (талдау арқылы дұрыс хабарланған жабайы типті локустар саны)) / ((нұсқа локустарының жалпы саны) + (жабайы типті локустардың жалпы саны))
- Нұсқаларды шақыру қолданбалары үшін PPA, NPA және OPA есептеулері ешқандай қоңырауларды қамтымайды (нұсқа немесе анықтамалық локустар бір немесе бірнеше сапа сүзгілеріне сәйкес келмейді). Екі зерттеу арнайы «% дұрыс шақыру» көрсеткішінде ешқандай шақыруды қамтымайды және бұл шақырулардың жоқтығы тиісті кестелер үшін ескерілмеген.
- Шақыру жылдамдығы 1-22 хромосомалар үшін реттелген позициялардың жалпы санына бөлінген локустар өтетін сүзгілердің жалпы саны ретінде есептеледі. X және Y хромосомалары алынып тасталды. Бұл көрсеткіш сілтеме әдісімен шақырулардың келісімін қарастырмайды.

Алдын ала талдау факторларына қатысты өнімділік сипаттамалары үшін (мысалы, экстракция әдістері немесе ДНҚ енгізуі) тиісті кітапхананы дайындау әдісі үшін буманың қосымшасын қараңыз.

## Үлгі индекстеу

Кітапхананы дайындау кезінде қосылған үлгі индексінің праймерлері әр үлгі ДНҚ-ға бірегей реттілік тағайындайды, бұл бірнеше үлгілерді бір реттілік іске қосуға біріктіруге мүмкіндік береді. Үлгіні индекстеу герминальды және соматикалық жұмыс ағындары үшін сыналған.

Барлығы 96 үлгі индексі талдаудың әр түрлі индекстеу праймері арқылы берілген үлгіге генотиптеу шақыруын дәйекті түрде жасау мүмкіндігін тексеру үшін адамның барлық 23 хромосомалары бойынша бір жіпке 12 588 негізді қамтитын әртүрлі гендерді сұрауға арналған репрезентативті талдаумен сыналған. комбинациялар. Y хромосомасында сенімді аймақтар жоқ және бағаланбаған. Сегіз бірегей үлгі бір үлгіде 12 түрлі индекстеу праймер комбинациясы арқылы сыналған. Germline талдау модулінен алынған үлгі нәтижелері Platinum Genomes 2016-01 нұсқасымен салыстырылды. PPA (SNV және индекстер) 96 индекс комбинациясының әрқайсысы үшін 97%-дан асты (шынайы оң шақырулар SNV үшін кемінде 70, кірістіру үшін 38, жою үшін 36 болды) және NPA 100% (индекс комбинациясы үшін кемінде 23 440 анықтамалық позиция) болды. MiSeqDx Reagent Kit v3 секвенирлеу химиясының сегізден аз үлгіні қолдайтынын тексеру үшін бір индекс тәуелсіз түрде тексерілді (MiSeqDx Universal Kit 1.0 ішіндегі алдыңғы химия ең аз сегіз үлгімен шектелген). Жалғыз индекстің PPA мәндері SNV үшін 98,9% (180/182), кірістірулер үшін 100% (38/38) және жоюлар үшін 100% (46/46) болды. NPA 100% құрады (23 856/23 856).

Үлгінің он екі репликасы (24 кітапхана) 0,05-0,10 жиіліктегі соматикалық нұсқалармен индекс дәлдігін өлшеу үшін Соматикалық Вариант модулін (соматикалық шақыруларды жасау үшін әр репликада екі индекс комбинациясы пайдаланылады) пайдалана отырып сынады. SNV (64/64), кірістіру (11/11) және жою (19/19) үшін PPA 100% болды. Барлық индекс комбинациялары үшін NPA 100% болды (әр индекс комбинациясы үшін кемінде 11590 анықтамалық позиция).

## Үлгіні тасымалдау

MiSeqDx құралының жұмыс процесі кітапхананы дайындауды және бірнеше үлгілердің ретін және бір уақытта өңделген басқару элементтерін қамтиды. Үлгіні тасымалдау зерттеуі сынама кітапханасын дайындау кезінде ұңғыдан ұңғымаға ластануға байланысты жалған оң нәтижелерді бағалау үшін жүргізілді, сондай-ақ дәйекті секвенирлеу жұмыстарын жүргізу арасындағы ластануды іске қосу, әсер ету сынағы нәтижелері. Соматикалық нұсқалар пайдаланылды, өйткені олар ұрық сызығының нұсқаларына қарағанда төмен аллель жиілігі оқиғаларында анықталуы мүмкін.

Үлгілер жасуша линияларынан алынған төрт геномдық ДНҚ үлгілерінен тұрды, олардың әрқайсысында екі гендік репрезентативті талдауда әртүрлі панельдік мутациялар бар. Үлгілер бір позициядағы мутация басқаларында анықтамалық (жабайы типті) реттілікке ие болатындай болды.

Ұңғыдан ұңғымаға тасымалдау қолмен өңдеу қадамдарымен (тамшуырлау, үлгіні араластыру және т.б.). Бір сынама ұңғымасынан екіншісіне өтуді бағалау үшін екі сынақ жүргізілді:

- 1-ші гендегі мутация бар жоғары кіріс геномдық ДНҚ (gDNA) үлгісінің шахмат тақтасындағы схемасы, 2-гендегі мутант бар төмен кірісті гДНҚ үлгісімен кезектеседі.
- 1-ші гендегі мутация бар төмен кірісті гДНҚ үлгісімен кезектесетін 2-гендегі мутация бар жоғары кірісті гДНҚ үлгісінің шахмат тақтасының схемасы.

Әр іске қосуда жалпы 12 репликация жалған позитивтерге бағаланды (мысалы, Ген 2 мутантты үлгісі ретінде белгіленген ұңғымада хабарланған ген 1 мутациясы немесе керісінше).

Орындау үшін тасымалдау алдыңғы ретті іске қосудың қалдықтарымен ықтимал жасалған сәтсіздік режимі ретінде анықталады. Тізбектелген жұмыстардың арасында тасымалдау бар-жоғын анықтау үшін әрқайсысында жоғары кірісті гДНҚ-ның жалғыз бірегей үлгісінің 11 көшірмесін және бос үлгіні қамтитын екі пластина дайындалды және бір MiSeqDx құралда дәйекті түрде реттелген және жалған позитивтерге бағаланды. Бірінші орында ген 2 мутантты үлгісінің 11 репликасы және бір бланк болды. Екінші орында ген 1 мутант үлгісінің 11 репликасы плюс 1 бланк болды. Ген 2 мутантты үлгі кітапханасы алдымен реттелген, содан кейін Ген 1 мутанттық үлгі кітапханасымен келесі реттілік іске қосылды, содан кейін Ген 2 мутанттық үлгі кітапханасының басқа қайталанатын реттілігі іске қосылды. Егер қандай да бір Ген 2 мутациялары тек 1-ген мутантты жұмысында байқалса және керісінше болса, бұл тасымалдауды көрсетеді.

ұңғымаға ұңғымаға ауысуына байланысты нөлдік жалған позитивтер (0/24, 0%) хабарланды. Барлық күтілетін мутациялар анықталды. Нөлдік жалған позитивтер (0/24, 0%) іске қосу тасымалдауына байланысты хабарланды. Барлық күтілетін мутациялар анықталды. Жалпы тасымалдауға байланысты (ұңғымадан ұңғымаға және тасымалдауға іске қосумен біріктірілген) нөлдік жалған позитивтер (0/48, 0%) хабарланды.

## Germline өнімділік сипаттамалары

Мұнда сипатталған зерттеулер, талдауға арнайы модуль пайдаланылған бір гендік панельді пайдаланатын зерттеулерді қоспағанда, реттілік деректерін талдау үшін Germline Variant Module пайдаланылды.

### Дәлдік

MiSeqDx Reagent Kit v3 және жоғары сапалы ДНҚ бар MiSeqDx құралының дәлдігін бағалау үшін келесі зерттеу жүргізілді. Зерттеу 150 ампликонды пайдаланып 23 түрлі хромосомадағы 12 588 негізді қамтитын әртүрлі гендерді сұрауға арналған өкілдік талдауды пайдаланды. Ү хромосомасында сенімді аймақтар жоқ және бағаланбаған. Бұл зерттеуде пайдаланылған 12 бірегей үлгілер бір отбасынан алынған - екі ата-ана және 10 бала - жиі бірнеше зертханалар мен реттілік әдістемелері арқылы реттелген. Әйелдерден бес және еркектерден жеті үлгі бар. Үлгілердің әрқайсысы екі данада сыналған. SNV, кірістіру және жою үшін дәлдік зерттеу деректерін жақсы сипатталған анықтамалық дерекқормен салыстыру арқылы анықталды. Анықтамалық дерекқор тізбегі (Platinum Genomes нұсқасы 2016-01) бірнеше реттілік әдістемелерінің, жалпыға қолжетімді деректердің және тұқым қуалайтын ақпараттың тіркесімінен алынды. Сенімді геномдық аймақтар, егер басқаша көрсетілмесе, осы анықтамалық әдіс негізінде анықталды. Үлгілер барлығы сегіз рет орындалды, дәлдікті көрсету үшін ұсынылған кестелер бірінші іске қосу деректеріне негізделген.

**1-кесте** әр үлгі бойынша оң және теріс пайыздық келісіммен ұсынылған зерттеу деректерін қамтиды, мұнда нұсқа нәтижелері PPA есептеулері үшін жақсы сипатталған композиттік анықтамалық әдіспен салыстырылады. Үш нұсқа түрі (SNV, кірістіру және жою) біріктірілген. Анықтамалық әдіс тек жалғыз нуклеотидтік нұсқалар мен кірістіру/делецияларға арналған нәтижелерді қамтамасыз ететіндіктен, вариантты емес базалық нәтижелер NPA есептеулері үшін адам геномының сілтеме тізбегі hg19 құрастыруымен салыстырылады.

1-кесте Әр үлгі бойынша MiSeqDx құралының негізгі шақыру нәтижелерінің келісімі

Үлгі	Орташа шақыру жылдамдығы	Барлығы # нұсқа	Барлығы # TP нұсқасы	Барлығы # FN нұсқалары	Жалпы шақырусыз #	Барлығы # TN шақыруы	PPA	NPA	OPA
NA12877	> 99,9	152	152	0	4	24024	100	100	100
NA12878	> 99,9	270	266	0	4	23856	100	100	100
NA12879	> 99,9	192	190	1	1	24054	99,5	100	> 99,9

Үлгі	Орташа шақыру жылдамдығы	Барлығы # нұсқа	Барлығы # TP нұсқасы	Барлығы # FN нұсқалары	Жалпы шақырусыз #	Барлығы # TN шақыруы	PPA	NPA	OPA
NA12880	> 99,9	222	220	0	6	24052	100	100	100
NA12881	> 99,9	250	247	1	2	23862	99,6	100	> 99,9
NA12882	> 99,9	200	196	2	2	23962	99,0	100	> 99,9
NA12883	> 99,9	226	224	0	6	23870	100	100	100
NA12884	> 99,9	228	226	1	1	23942	99,6	100	> 99,9
NA12885	> 99,9	244	240	2	2	23942	99,2	100	> 99,9
NA12886	> 99,9	230	228	1	1	23888	99,6	100	> 99,9
NA12888	> 99,9	216	216	0	4	24002	100	100	100
NA12893	> 99,9	236	234	0	2	23810	100	100	100

Өкілдік талдау әртүрлі геномдық контентті қамтуға арналған 150 ампликоннан тұрды. Ампликондардың ГК контенті 26-87% аралығында болды. Сондай-ақ ампликондарда бір нуклеотидтер (мысалы, PolyA, PolyT), динуклеотидтер және тринуклеотидтер қайталанады. Деректер геномдық құрамның % дұрыс шақыруларға әсерін анықтау үшін әр ампликон негізінде құрастырылды (2-кесте). % дұрыс шақырулар нұсқалық және анықтамалық шақырулардан тұрады және қате немесе жоқ шақырулар болса, 100%-дан аз болады. Нұсқалық шақырулар үшін бір немесе бірнеше сүзгілер орындалмаған кезде шақырулар болмайды (мысалы, қамту жеткіліксіз).

2-кесте сегіз FN нұсқаларының жетеуі полиА гомополимері мен 0,29 GC құрамын қамтитын ампликон 111-ге 1 бит енгізу арқылы орын алды. Қалған 1 FN (дұрыс емес шақыру) гомозиготалы нұсқа деп аталатын GC контенті 0,68 болатын 125 ампликонында күтілетін гетерозиготалы SNV салдарынан болды. SNV нұсқасының жиілігі 0,71 болды, бұл гомозиготалы нұсқа ретінде жіктеу үшін 0,70 шегінен жоғары. Ең төмен % дұрыс шақырулары бар ампликон (98,2%) 40 шақырусыз және АТ қайталанулары және 27% GC контенті бар ампликон 17 болды.

2-кесте MiSeqDx құралына арналған күшейткіш деңгейінің дәлдігі

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	2232	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), индекс	0,38	1896	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	2184	0	0	100
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	2208	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1944	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), индекс	0,39	1680	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA (3), индекс	0,27	2112	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	2160	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1920	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Қолданылмайды	0,65	1944	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1800	0	0	100
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	2112	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), индекс	0,31	2088	0	0	100
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), индекс	0,3	2184	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Қолданылмайды	0,43	2232	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), индекс	0,42	1752	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), индекс	0,27	2192	0	40	98,2
18	3	46620561	46620643	83	83	Қолданылмайды	0,43	1992	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), индекс	0,49	1680	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	2112	0	0	100
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1774	0	2	99,9
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1872	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	2328	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Қолданылмайды	0,29	1872	0	0	100
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), индекс	0,36	1488	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1656	0	0	100



Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), индекс	0,27	1488	0	0	100
28	5	1882081	1882158	78	75	Қолданылмайды	0,78	1800	0	0	100
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	2016	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Қолданылмайды	0,39	1536	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), индекс	0,3	1992	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1608	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	2184	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1800	0	0	100
35	6	6318713	6318814	10	10	PolyG (6)	0,68	2448	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	2208	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), индекс	0,61	2244	0	12	99,5
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	2352	0	0	100
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	2280	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	2064	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), индекс	0,61	2256	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	2184	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Қолданылмайды	0,44	1752	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	2112	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	2088	0	0	100
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	2040	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), индекс	0,62	2160	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	2184	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Қолданылмайды	0,31	1584	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	2232	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Қолданылмайды	0,42	1992	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), индекс	0,61	2113	0	23	98,9

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1608	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	2352	0	0	100
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	1560	0	0	100
56	9	107620823	107620918	96	96	Қолданылмайды	0,49	2304	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1992	0	0	100
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), индекс	0,68	2328	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), индекс	0,47	1872	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	2184	0	0	100
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1896	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	2160	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	2280	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), индекс	0,42	2102	0	10	99,5
65	10	101611250	101611329	80	80	Қолданылмайды	0,49	1920	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Қолданылмайды	0,51	1944	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Қолданылмайды	0,45	2304	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1680	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Қолданылмайды	0,65	2400	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	1488	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Қолданылмайды	0,59	2448	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1752	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Қолданылмайды	0,42	2040	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	2184	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	2040	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), индекс	0,34	2040	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	2040	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), индекс	0,52	2016	0	0	100
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	2232	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Қолданылмайды	0,49	1944	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1704	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	2280	0	0	100
83	13	24167504	24167576	73	73	Қолданылмайды	0,52	1752	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), индекс	0,22	2112	0	0	100
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	2136	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1848	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1608	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Қолданылмайды	0,25	1992	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), индекс	0,19	1727	0	1	99,9
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1944	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	2184	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	1584	0	0	100
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	2256	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	2304	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1632	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), индекс	0,68	2232	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	2280	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1704	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Қолданылмайды	0,36	2184	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1680	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Қолданылмайды	0,27	1512	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	2280	0	0	100
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	2088	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	2496	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), индекс	0,37	2184	0	0	100
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	2136	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), индекс	0,67	2088	0	0	100
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	2184	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	2232	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	2136	0	0	100
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), индекс (x2)	0,29	1944	7	17	98,8
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	2184	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	2208	0	0	100
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1887	0	9	99,5
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	2064	0	0	100
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	2016	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1608	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Қолданылмайды	0,37	2184	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1656	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), индекс	0,37	1800	0	0	100
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), индекс	0,47	1944	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), индекс	0,45	2040	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Қолданылмайды	0,48	1560	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Қолданылмайды	0,59	2376	0	0	100
125	19	18121418	18121491	74	74	Қолданылмайды	0,68	1775	1	0	99,9
126	19	18186574	18186643	70	70	Қолданылмайды	0,64	1680	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Қолданылмайды	0,61	2256	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1968	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1824	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), индекс	0,46	1680	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	2424	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1608	0	0	100
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	2112	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	2088	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	1584	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	2352	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индекс	0,39	2088	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), индекс	0,32	1656	0	0	100
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	2160	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	2400	0	0	100
141	22	32439233	32439329	97	97	Қолданылмайды	0,68	2328	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	2328	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Қолданылмайды	0,6	2376	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	2208	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1656	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1656	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Қолданылмайды	0,52	1704	0	0	100
148	Ы	2655397	2655461	65	0	Қолданылмайды	0,55	0	0	0	Қолданылмайды
149	Ы	2655519	2655609	91	0	Қолданылмайды	0,48	0	0	0	Қолданылмайды
150	Ы	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Қолданылмайды

Шақырулар болмаған нұсқалар [3-кесте](#) жинақталған. Шақырулардың болмауына әкелген нақты сүзгілер кестеде берілген. Ампликон 111-дегі кірістіру 16 көріністің тоғызы үшін сүзілді, қалған жеті көрініс анықтамалық деп аталады, сондықтан FN болып табылады.

3-кесте Нұсқалардың қысқаша қорытындысы: шақырулар жоқ

Ампликон №	Chr: Поз	Нұсқа	Сәйкес ампликон контенті	Сүзгі	Қабылданбаған нұсқалар	Күтілетін нұсқалар	FN шақырулары
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42% GC	R5x9 <sup>1</sup>	10	10	0
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29% GC	R5x9	9	16	7

<sup>1</sup> R5x9: Сүзгіні қайталаңыз. Егер нұсқаның барлығы немесе бір бөлігі нұсқа позициясына іргелес сілтеме геномында қайта-қайта болса,

нұсқа сүзіледі. Анықтамада кемінде тоғыз қайталау қажет және тек ұзындығы 5 битке дейінгі қайталаулар қарастырылады.

NA12878 үлгісі үшін реттілік нәтижелері Ұлттық стандарттар мен технологиялар институттары (NIST) белгілеген NA12878 үшін өте сенімді генотиппен салыстырылды (v.2.19). 150 ампликонның ішінде 92 ампликон толық сенімді геномдық аймақтарда болды, 41 ампликонда ішінара қабаттасу болды, ал 17 ампликонда NIST тізбегінде ешқандай сәйкестік болмады. Бұл салыстыру үшін әр көшірмеде 10 000 координатқа әкелді. Вариантты емес базалық шақырулар адам геномының анықтамалық реттілігінің 19-құрылымымен салыстырылды. Дәлдік нәтижелері [4-кесте](#) көрсетілген.

4-кесте NIST дерекқорымен NA12878 үлгісіне арналған MiSeqDx құрал базасының шақыру нәтижелерінің келісімі

Үлгі	# Ампликондар	Орташа шақыру жылдамдығы	Барлығы # TP нұсқасы	Барлығы # FN нұсқалары	Барлығы # TN шақыруы	Барлығы # FP шақыруы	PPA	NPA	OPA
NA12878	133	99,98	208	0	19380	0	100	100	100

Үлгілер кішігірім кірістірулер мен жоюларды (индель) шақыру үшін әрі қарай талданды ([5-кесте](#)). Кейбір жағдайларда, индекс екі немесе одан да көп үлгілер арасында жалпы болды, себебі жалпы # үлгі көшірмелері Indel бағанында көрсетіледі. 12 жарамды үлгінің екі репликасына арналған нәтижелер [5-кесте](#) қамтылған. Өлшемдері кірістіру үшін 1-24 бит және жою үшін 1-25 бит болатын жалпы саны 71 индекс болды. Әрқайсысы 100% оң пайыздық келісіммен 69 индекс анықталды. Бір жоюда (amplicon 64; 2 bp жоюда (chr10 55892600 TAC>T) дұрыс шақырулар болмады, себебі бұл нұсқалардың әрқайсысы R5x9 сүзгісіне байланысты шақырусыз болды. Сондықтан қоңырауларды жоққа шығармайтын PPA мүмкін емес. Басқа индекс, 1 bp кірістіру (chr17 39589692 C>CA ампликон 111) де дұрыс шақырулар болмады, себебі тоғыз нұсқа R5x9 сүзгісіне байланысты шақырусыз болды және жетеуі FN шақырулары болды.

5-кесте MiSeqDx құралымен Indel анықтаудың қысқаша қорытындысы

Ампликон	Хромосома	Позиция	Талданған фрагмент өлшемі	Amplicon Indel түрі және ұзындығы	Indel	Indel көмегімен # үлгі көшірмелері	Шақырулар жоқ	Барлығы # қате Indel шақыруы	Барлығы # дұрыс Indel шақырулары	PPA
1	1	36450544	93	25 бит жою	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCTCT>G	2	0	0	2	100
2	1	109465165	79	3 bp жою	ACTT>A	12	0	0	12	100
3	1	218353908	91	23 бит енгізу	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	24	0	0	24	100
4	1	223906701	92	17 бит жою	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	10	0	0	10	100
6	1	236372081	70	5 бит енгізу	C>CTTAAG	10	0	0	10	100
7	1	247812083	88	3 бит енгізу	C>CATG	10	0	0	10	100

Ампликон	Хромосома	Позиция	Талданған фрагмент өлшемі	Amplicon Indel түрі және ұзындығы	Indel	Indel көмегімен # үлгі көшірмелері	Шақырулар жоқ	Барлығы # қате Indel шақыруы	Барлығы # дұрыс Indel шақырулары	PPA
8	2	55862804	90	7 бит енгізу	T>TTTGGTAA	14	0	0	14	100
9	2	87003972	80	6 бр жою	TTATCTC>T	6	0	0	6	100
13	2	200796749	87	5 бит енгізу	T>TTAAAA	24	0	0	24	100
14	2	212245090	91	12 бит енгізу	C>CTGAAAATAGGAT	14	0	0	14	100
16	2	235016388	73	2 бит енгізу	A>ATG	12	0	0	12	100
17	3	4466274	93	23 бит жою	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	2	0	0	2	100
19	3	49851375	70	9 бит енгізу	C>CCTGGCTCCT	4	0	0	4	100
21	3	190106071	75	1 бит жою	AG>A	20	0	0	20	100
25	4	56236567	66	8 бр жою	TAACCGAAA>T	12	0	0	12	100
27	4	164446785	62	11 бит енгізу	T>TTATGGTATTGA	12	0	0	12	100
31	5	74077155	83	4 бр жою	TAGTA>T	10	0	0	10	100
34	5	155662255	75	8 бит енгізу	G>GCCTACTGA	20	0	0	20	100
36	6	24950035	92	21 бит жою	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	10	0	0	10	100
37	6	31084942	100	3 бр жою	GCTT>G	14	0	0	14	100
39	6	32986905	95	25 бит жою	CTTTCACCTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	12	0	0	12	100
41	6	41647442	95	23 бит жою	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	8	0	0	8	100
44	7	66276142	88	1 бит енгізу	C>CT	16	0	0	16	100
46	7	110939983	85	4 бр жою	CAAGT>C	12	0	0	12	100
47	7	128533514	90	1 бит енгізу	T>TC	24	0	0	24	100
48	7	149503916	91	4 бр жою	GGATA>G	8	0	0	8	100
50	7	156476548	93	11 бит жою	GAATCTGCACTT>G	12	0	0	12	100
52	8	24811064	90	1 бит жою	AG>A	24	0	0	24	100
53	8	76518677	67	4 бит енгізу	T>TACTG	14	0	0	14	100
55	9	105586193	65	4 бит енгізу	C>CAATT	2	0	0	2	100
58	9	138995370	97	21 бит жою	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	14	0	0	14	100
59	10	5987158	79	3 бр жою	TAAC>T	10	0	0	10	100
63	10	45084202	95	16 бит жою	AGCGTCTATAACCAAAT>A	12	0	0	12	100
64	10	55892600	89	2 бр жою	TAC>T	10	10	0	0	Қолданылмайды

Ампликон	Хромосома	Позиция	Талданған фрагмент өлшемі	Amplicon Indel түрі және ұзындығы	Indel	Indel көмегімен # үлгі көшірмелері	Шақырулар жоқ	Барлығы # қате Indel шақыруы	Барлығы # дұрыс Indel шақырулары	PPA
68	11	30177690	70	2 бит енгізу	C>CTG	10	0	0	10	100
70	11	59837721	62	8 бит енгізу	T>TTATGAAAA	12	0	0	12	100
75	11	118406328	85	8 бр жою	CAGTGTGGA>C	10	0	0	10	100
76	11	120357842	85	2 бр жою	CTT>C	10	0	0	10	100
78	12	2834814	84	21 бит енгізу	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCCAG	24	0	0	24	100
84	13	25817002	89	19 бит енгізу	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	24	0	0	24	100
85	13	44880152	89	4 бит енгізу	C>CCTGT	12	0	0	12	100
86	13	77665265	77	20 бит жою	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	14	0	0	14	100
89	14	46958967	73	22 бит жою	TTTAAATTTGAATGTGATAAAA>T	24	0	0	24	100
90	14	58050081	81	4 бит енгізу	C>CTGAT	20	0	0	20	100
91	14	82390602	91	16 бит жою	CTTGCTCTATAAACCGT>C	10	0	0	10	100
93	14	102808554	94	5 бр жою	CGTGGA>C	10	0	0	10	100
95	15	63446199	68	6 бр жою	CAAAATT>C	12	0	0	12	100
96	15	77879862	95	25 бит жою	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	14	0	0	14	100
98	15	85438311	72	3 бит енгізу	C>CTTG	8	0	0	8	100
100	15	89864316	70	4 бит енгізу	G>GCTAC	8	0	0	8	100
105	16	85706416	91	7 бр жою	ATTATTTC>A	16	0	0	16	100
107	17	3594276	87	1 бит жою	TG>T	2	0	0	2	100
108	17	3970133	91	18 бит енгізу	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	10	0	0	10	100
109	17	16084985	93	4 бит енгізу	A>AACAC	10	0	0	10	100
111	17	39589692	84	1 бит енгізу	C>CA	16	9	7	0	0
112	17	39589739	84	24 бит енгізу	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	24	0	0	24	100
113	17	45438886	92	4 бр жою	CAGTG>C	12	0	0	12	100
114	17	61502459	79	12 бит жою	TTTGTATCTGCTG>T	20	0	0	20	100
120	18	38837054	75	22 бит енгізу	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	24	0	0	24	100
121	18	47405425	81	3 бит енгізу	T>TGAG	20	0	0	20	100
122	18	54815706	85	2 бр жою	ACT>A	20	0	0	20	100
130	20	21766863	70	15 бит жою	TACTTGAGAACTGAGG>T	4	0	0	4	100



Ампликон	Хромосома	Позиция	Талданған фрагмент өлшемі	Amplicon Indel түрі және ұзындығы	Indel	Indel көмегімен # үлгі көшірмелері	Шақырулар жоқ	Барлығы # қате Indel шақыруы	Барлығы # дұрыс Indel шақырулары	PPA
131	20	25278464	101	5 бит енгізу	A>AGTGGG	20	0	0	20	100
132	20	50897361	67	11 бит енгізу	G>GGAATGTCAGCC	24	0	0	24	100
134	20	62690925	87	16 бит жою	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	10	0	0	10	100
135	21	30300873	66	11 бит енгізу	G>GATAAAACTTTA	10	0	0	10	100
137	21	36710749	87	21 бит жою	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	16	0	0	16	100
138	21	46644985	69	5 bp жою	GTTGTT>G	8	0	0	8	100
140	22	25750814	100	6 бит енгізу	C>CAGGGCA	20	0	0	20	100
142	22	37409885	97	5 бит енгізу	C>CTGTTT	2	0	0	2	100
144	22	47081407	92	10 бит жою	GGGCACAGGCA>G	12	0	0	12	100

## Қайта шығару мүмкіндігі

Жасуша сызықтары (1 және 2-зерттеу) немесе жасуша линиялары бар лейкоциттері азайған қан (2-зерттеу) бар MiSeqDx құралының қайталану мүмкіндігін бағалау үшін екі зерттеу жүргізілді. 1-зерттеу бірнеше құралдарды пайдаланды. 2-зерттеуде бірнеше сайттар болды.

### 1-зерттеу

MiSeqDx құралының қайталану мүмкіндігі екі құрал, екі оператор және жалпы сегіз айналымға арналған екі реагент лотының көмегімен анықталды. Өкілдік талдау, үлгілер және анықтамалық әдіс дәлдікті зерттеу үшін сипатталғанмен бірдей.

Нәтижелер әр құрал үшін әр ампликон негізінде берілген [6-кесте](#) Құралдар бойынша шақырудың қайталану мүмкіндігін көрсетуге арналған. % дұрыс шақырулар қатені де, шақыруларды да қамтиды (нұсқа шақыруларында бір немесе бірнеше сүзгі орындалмайды). Құралдар белгілі ампликонға байланысты шақырусыз және дұрыс емес шақырулардың ұқсас сандарын жасады.

6-кесте MiSeqDx құралына арналған құралды қайта шығару нәтижелерін зерттеу (ампликон деңгейі)

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	8928	0	0	8928	0	0
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), индекс	0,38	7584	0	0	7584	0	0
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	8736	0	0	8736	0	0
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	8832	0	0	8832	0	0
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	7776	0	0	7776	0	0
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), индекс	0,39	6720	0	0	6720	0	0
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), индекс	0,27	8448	0	0	8448	0	0
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	8640	0	0	8640	0	0
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	7680	0	0	7680	0	0
10	2	177016721	177016805	85	81	Қолданылмайды	0,65	7775	1	0	7775	1	0
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	7200	0	0	7200	0	0
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	8448	0	0	8448	0	0
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), индекс	0,31	8352	0	0	8352	0	0
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), индекс	0,3	8736	0	0	8736	0	0
15	2	228147052	228147144	93	93	Қолданылмайды	0,43	8928	0	0	8928	0	0
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), индекс	0,42	7008	0	0	7008	0	0
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), индекс	0,27	8761	0	167	8760	0	168
18	3	46620561	46620643	83	83	Қолданылмайды	0,43	7968	0	0	7968	0	0
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), индекс	0,49	6720	0	0	6720	0	0
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	8448	0	0	8448	0	0
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	7096	0	8	7096	0	8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	7488	0	0	7488	0	0

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	9312	0	0	9312	0	0
24	4	15688604	15688681	78	78	Қолданылмайды	0,29	7488	0	0	7488	0	0
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), индекс	0,36	5952	0	0	5952	0	0
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	6624	0	0	6624	0	0
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), индекс	0,27	5952	0	0	5952	0	0
28	5	1882081	1882158	78	75	Қолданылмайды	0,78	7200	0	0	7200	0	0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
30	5	41069808	41069871	64	64	Қолданылмайды	0,39	6144	0	0	6144	0	0
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), индекс	0,3	7968	0	0	7968	0	0
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	6432	0	0	6432	0	0
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	7200	0	0	7200	0	0
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	9792	0	0	9792	0	0
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	8832	0	0	8832	0	0
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), индекс	0,61	8979	0	45	8979	0	45
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	9408	0	0	9408	0	0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	9120	0	0	9120	0	0
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	8256	0	0	8256	0	0
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), индекс	0,61	9024	0	0	9024	0	0
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	8736	0	0	8736	0	0
43	7	22202076	22202148	73	73	Қолданылмайды	0,44	7008	0	0	7008	0	0
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	8448	0	0	8448	0	0
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	8352	0	0	8352	0	0
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	8160	0	0	8160	0	0
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), индекс	0,62	8550	0	90	8550	0	90

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	8736	0	0	8736	0	0
49	7	154404519	154404599	81	66	Қолданылмайды	0,31	6336	0	0	6336	0	0
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	8928	0	0	8928	0	0
51	8	1817312	1817394	83	83	Қолданылмайды	0,42	7968	0	0	7968	0	0
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), индекс	0,61	8452	0	92	8449	0	95
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	6432	0	0	6432	0	0
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	9408	0	0	9408	0	0
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	6240	0	0	6240	0	0
56	9	107620823	107620918	96	96	Қолданылмайды	0,49	9216	0	0	9216	0	0
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	7968	0	0	7968	0	0
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), индекс	0,68	9312	0	0	9312	0	0
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), индекс	0,47	7488	0	0	7488	0	0
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	8644	1	91	8644	1	91
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	7584	0	0	7584	0	0
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	8640	0	0	8640	0	0
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	9120	0	0	9120	0	0
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), индекс	0,42	8408	0	40	8407	0	41
65	10	101611250	101611329	80	80	Қолданылмайды	0,49	7680	0	0	7680	0	0
66	10	118351373	118351453	81	81	Қолданылмайды	0,51	7776	0	0	7776	0	0
67	11	8159816	8159912	97	96	Қолданылмайды	0,45	9216	0	0	9216	0	0
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	6720	0	0	6720	0	0
69	11	47470345	47470444	100	100	Қолданылмайды	0,65	9600	0	0	9600	0	0
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	5952	0	0	5952	0	0
71	11	64418856	64418957	102	102	Қолданылмайды	0,59	9792	0	0	9792	0	0
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	7008	0	0	7008	0	0

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
73	11	101347052	101347136	85	85	Қолданылмайды	0,42	8160	0	0	8160	0	0
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	8736	0	0	8736	0	0
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	8160	0	0	8160	0	0
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), индекс	0,34	8160	0	0	8160	0	0
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	8160	0	0	8160	0	0
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), индекс	0,52	8064	0	0	8064	0	0
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	8928	0	0	8928	0	0
80	12	30881766	30881846	81	81	Қолданылмайды	0,49	7776	0	0	7776	0	0
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	6816	0	0	6816	0	0
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	9117	3	0	9119	1	0
83	13	24167504	24167576	73	73	Қолданылмайды	0,52	7008	0	0	7008	0	0
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), индекс	0,22	8448	0	0	8448	0	0
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	8544	0	0	8544	0	0
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	7392	0	0	7392	0	0
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	6432	0	0	6432	0	0
88	14	39517884	39517966	83	83	Қолданылмайды	0,25	7968	0	0	7968	0	0
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), индекс	0,19	6830	0	82	6835	0	77
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	7776	0	0	7776	0	0
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	8736	0	0	8736	0	0
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	6336	0	0	6336	0	0
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	9024	0	0	9024	0	0
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	9216	0	0	9216	0	0
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	6528	0	0	6528	0	0
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), индекс	0,68	8928	0	0	8926	2	0
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	9120	0	0	9120	0	0

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	6816	0	0	6816	0	0
99	15	89817413	89817503	91	91	Қолданылмайды	0,36	8736	0	0	8736	0	0
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	6720	0	0	6720	0	0
101	16	1894910	1894972	63	63	Қолданылмайды	0,27	6048	0	0	6048	0	0
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	9120	0	0	9120	0	0
103	16	53682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	8352	0	0	8352	0	0
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	9984	0	0	9984	0	0
105	16	85706375	85706465	91	91	PolyT (5), индекс	0,37	8736	0	0	8736	0	0
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	8544	0	0	8544	0	0
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), индекс	0,67	8347	0	5	8347	0	5
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	8736	0	0	8736	0	0
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	8928	0	0	8928	0	0
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	8544	0	0	8544	0	0
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), индекс (x2)	0,29	7776	7	89	7777	12	83
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	8736	0	0	8736	0	0
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	8832	0	0	8832	0	0
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	7546	0	38	7547	0	37
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	8256	0	0	8256	0	0
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	8064	0	0	8064	0	0
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	6432	0	0	6432	0	0
118	18	6980478	6980568	91	91	Қолданылмайды	0,37	8736	0	0	8736	0	0
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	6624	0	0	6624	0	0
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), индекс	0,37	7200	0	0	7200	0	0
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), индекс	0,47	7776	0	0	7776	0	0
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), индекс	0,45	8160	0	0	8160	0	0
123	18	59773996	59774060	65	65	Қолданылмайды	0,48	6240	0	0	6240	0	0

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
124	19	625143	625241	99	99	Қолданылмайды	0,59	9504	0	0	9504	0	0
125	19	18121418	18121491	74	74	Қолданылмайды	0,68	7102	2	0	7104	0	0
126	19	18186574	18186643	70	70	Қолданылмайды	0,64	6718	2	0	6718	2	0
127	20	746056	746149	94	94	Қолданылмайды	0,61	9024	0	0	9024	0	0
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	7872	0	0	7872	0	0
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	7296	0	0	7296	0	0
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), индекс	0,46	6720	0	0	6720	0	0
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	9696	0	0	9696	0	0
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	6432	0	0	6432	0	0
133	20	62331904	62331994	91	88	PolyG (6)	0,73	8360	0	88	8360	0	88
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	8352	0	0	8352	0	0
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	6336	0	0	6336	0	0
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	9408	0	0	9408	0	0
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индекс	0,39	8352	0	0	8352	0	0
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), индекс	0,32	6603	0	21	6601	0	23
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	8640	0	0	8640	0	0
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	9600	0	0	9600	0	0
141	22	32439233	32439329	97	97	Қолданылмайды	0,68	9312	0	0	9312	0	0
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	9312	0	0	9312	0	0
143	22	37637596	37637694	99	99	Қолданылмайды	0,6	9504	0	0	9504	0	0
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	8832	0	0	8832	0	0
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	6624	0	0	6624	0	0
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	6624	0	0	6624	0	0
147	X	135290777	135290847	71	71	Қолданылмайды	0,52	6816	0	0	6816	0	0
148	Ы	2655397	2655461	65	0	Қолданылмайды	0,55	0	0	0	0	0	0

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
								Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
149	Ы	2655519	2655609	91	0	Қолданылмайды	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Ы	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Қайта шығару мүмкіндігін зерттеу нәтижелері нұсқа жиілігін пайдалану арқылы әр оператор негізінде талданды (7-кесте). Бұл талдау нұсқа жиіліктері операторлар арасында сәйкес келетінін көрсетті. Орташа нұсқа жиіліктері +/- 1 стандартты ауытқу көрсетілген.

7-кесте MiSeqDx құралына арналған Оператордан Операторға берілетін нәтижелер

Вариант жиілік диапазоны	# Бірегей нұсқалар	Барлығы # Варианттар талданатын оператор 1	Барлығы # Варианттар талданатын оператор 2	Орташа (SD) хабарланған нұсқа жиілігі операторы 1	Орташа (SD) хабарланған нұсқа жиілігі операторы 2
Гомозиготалы (0,70-1,00)	2424	2424	2422	0,94 +/- 0,07	0,96 +/- 0,05
Гетерозиготалы (0,20-0,70)	8240	8132	8128	0,48 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04

Әр үлгі үшін қайталану мүмкіндігін зерттеу нәтижелері барлық сегіз іске қосудан біріктірілген түрде көрсетілген 8-кесте. Анықтау әр нұсқа түрі үшін – SNV, кірістіру және жою – бөлек бағаланады. Анықтамалық позициялар алынып тасталды. Бұл талдау нұсқалардың нәтижелері үлгілер бойынша қайталануға болатынын көрсетті.

8-кесте Әр үлгі бойынша MiSeqDx Құралының негізгі шақыру нәтижелерінің келісімі

Үлгі	SNVs				Кірістірулер				Жоюлар			
	Барлығы #	Барлығы # TP	Барлығы # FP	Барлығы # FN	Барлығы #	Барлығы # TP	Барлығы # FP	Барлығы # FN	Барлығы #	Барлығы # TP	Барлығы # FP	Барлығы # FN
NA12877	592	592	0	0	336	336	0	0	288	288	0	0
NA12878	1456	1456	0	0	320	304	0	0	384	368	0	0
NA12879	912	912	0	0	336	320	0	2	288	288	0	0
NA12880	1072	1071	0	1	384	384	0	0	320	304	0	0



Үлгі	SNVs				Кірістірулер					Жоюлар			
	Барлығы #	Барлығы # TP	Барлығы # FP	Барлығы # FN	Барлығы #	Барлығы # TP	Барлығы # FP	Барлығы # FN	Барлығы #	Барлығы # TP	Барлығы # FP	Барлығы # FN	
NA12881	1248	1247	0	1	384	368	0	0	368	368	0	0	
NA12882	944	943	0	1	352	336	0	4	304	288	0	0	
NA12883	1088	1087	0	1	368	368	0	0	352	335	0	1	
NA12884	1088	1088	0	0	400	384	0	5	336	336	0	0	
NA12885	1200	1189	0	7	400	382	0	4	352	336	0	0	
NA12886	1104	1102	0	2	368	352	0	3	368	368	0	0	
NA12888	1056	1054	0	2	368	368	0	0	304	304	0	0	
NA12893	1168	1168	0	0	352	336	0	1	368	368	0	0	

Осы репродукциялық зерттеудегі сегіз іске қосумен қамтамасыз етілген деректер MiSeqDx құралының дәйекті түрде тізбектей алатыны туралы мәлімдемені қолдайды:

- GC контенті  $\geq 19\%$  (барлық шақырылған негіздер 192 реттелген ампликонның 192-сінде 19% GC контентімен дұрыс шақырылған, шақырылмау жылдамдығы 1,1%)
- GC контенті  $\leq 78\%$  (78% GC контенті бар 192 реттелген ампликонның 192-де барлық шақырылған негіздер, нөлдік шақырусыз дұрыс шақырылған)
- PolyA ұзындығы  $\leq 8$  (8 нуклеотидтің PolyA қайталануы PolyA = 8 болатын 192 реттелген ампликонның 192-сінде дұрыс деп аталды)
- PolyT ұзындығы  $\leq 10$  (10 нуклеотидтің PolyT қайталануы PolyT = 10 бар 192 реттелген ампликонның 192-сінде дұрыс аталды)
- PolyG ұзындығы  $\leq 7$  (7 нуклеотидтің PolyG қайталануы PolyG = 7 болатын 192 реттелген ампликонның 192-сінде дұрыс деп аталды)
- PolyC ұзындығы  $\leq 6$  (6 нуклеотидтің PolyC қайталануы PolyC = 6 бар 576 реттелген ампликонның 576-сында дұрыс деп аталды)
- Динуклеотидтердің қайталану ұзақтығы  $\leq 11x$  (11x динуклеотидті қайталанатын 192 реттелген ампликонның 192-де негіз деп аталатын негіздердің барлығы 0,5% шақырылмау жылдамдығымен дұрыс шақырылды)
- Тринуклеотидтердің қайталану ұзақтығы  $\leq 5x$  (5x тринуклеотидті қайталанатын 192 реттелген ампликонның 192-де негіз деп аталатын негіздердің барлығы 0,5% шақырылмау жиілігімен дұрыс шақырылды)
- 24 немесе одан аз негізгі кірістіру және 25 немесе одан аз негізгі жою

- 192 үлгінің 192-сінде 24 негізді кірістіру дұрыс шақырылды
- 25 негізді жою 223 үлгіде дұрыс шақырылды және 224 үлгінің 1 үлгісінде қате шақырылды

## 2-зерттеу

Illumina MiSeqDx Муковисцидтік фиброз 139 Variant Assay репрезентативті талдауымен орындалған сайттан сайтқа қайталану мүмкіндігін зерттеуге MiSeq Reporter бағдарламалық құралымен талданған *CFTR* клиникалық маңызды генетикалық вариациялар жиыны кірді. MiSeqDx Платформаның мақсатты ДНҚ секвенциясы жұмыс процесі. Соқыр зерттеуде 3 сынақ алаңы және әр сайтта 2 оператор қолданылды. Әрқайсысы 46 үлгіден тұратын екі жақсы сипатталған панельді әр учаскедегі операторлардың әрқайсысы бір сайтқа барлығы 810 шақыруда сынады. Панельдерде *CFTR* генінде белгілі нұсқалары бар жасуша линияларынан алынған геномдық ДНҚ қоспасы, сондай-ақ *CFTR* генінде белгілі нұсқалары бар жасуша линиялары бар лейкоциттер азайған қан болды. Қан үлгілері талдаудың жұмыс процесі үшін негізгі кіріс ретінде қызмет ететін гДНҚ дайындау үшін пайдаланылатын экстракция қадамдарын қосуға мүмкіндік беру үшін берілді. Бірінші әрекетте QC метрикасынан өткен үлгілер саны ретінде анықталған үлгінің өту жылдамдығы 99,88% болды. Барлық сынақ нәтижелері бастапқы тестілеуге негізделген.

9-кесте Өкілмен орындалған репродукциялық зерттеу нәтижелерінің қысқаша контенті MiSeqDx Муковисцидоз 139-нұсқа талдауы

Панель	Үлгі №	Үлгі генотипі	Варианттар	Сайттағы жалпы шақыру	Позитивті келісу шақырулары (нұсқалар)			Теріс келісетін шақырулар (жабайы түрі)			Қате шақырулар #	Шақырусыз #	Оң келісім (%)	Теріс келісім (%)	Жалпы келісім (%)
					Сайт 1	Сайт 2	Сайт 3	Сайт 1	Сайт 2	Сайт 3					
					A	1	S549N (HET)		810	6					
A	2	1812-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	3	Q493X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	4 <sup>1</sup>	F508del/2184delA (HET)		810	12	12	12	797	798	798	0	1 <sup>1</sup>	100	100	100
A	5 <sup>2</sup>	Y122X/R1158X (HET)		810	12	10	12	798	665	798	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
A	6	F508del/2183AA>G (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	7	R75X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	8	I507del/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Панель	Үлгі №	Үлгі генотипі	Варианттар	Сайттағы жалпы шақыру	Позитивті келісу шақырулары (нұсқалар)			Теріс келісетін шақырулар (жабайы түрі)			Қате шақырулар #	Шақырусыз #	Оң келісім (%)	Теріс келісім (%)	Жалпы келісім (%)
					Сайт 1	Сайт 2	Сайт 3	Сайт 1	Сайт 2	Сайт 3					
A	9 <sup>3</sup>	F508del/W1282X (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	10 <sup>3</sup>	F508del/3272-26A>G (HET)		810	12	11	12	798	797	798	2 <sup>3</sup>	0	97,22	99,96	99,92
A	11	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	12	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	13	E60X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	14	M1101K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	15	M1101K (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	16	F508del (HOM)	I506V, I507V, F508C жоқ	828	6	6	6	822	822	822	0	0	100	100	100
A	17	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	18	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	19	621+1G>T/711+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	20	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	21	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	22	F508del/R560T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	23	F508del/Y1092X (C>A) (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	24	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	25	G542X (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	26	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	27	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	28	3849+10kbC>T (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100

Панель	Үлгі №	Үлгі генотипі	Варианттар	Сайттағы жалпы шақыру	Позитивті келісу шақырулары (нұсқалар)			Теріс келісетін шақырулар (жабайы түрі)			Қате шақырулар #	Шақырусыз #	Оң келісім (%)	Теріс келісім (%)	Жалпы келісім (%)
					Сайт 1	Сайт 2	Сайт 3	Сайт 1	Сайт 2	Сайт 3					
A	29	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
A	30	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	31	1717-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	32	R1162X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	33	R347P/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	34	R334W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	35	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
A	36	G85E (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	37	I336K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	38	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
A	39	F508del/3849+10kbC>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	40	621+1G>T/3120+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	41	F508del/3659delC (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	42	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
A	43	G85E/621+1G>T (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	44	A455E/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
A	45	N1303K (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
A	46	G551D/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
Б	47	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	48	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
Б	49	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Панель	Үлгі №	Үлгі генотипі	Варианттар	Сайттағы жалпы шақыру	Позитивті келісу шақырулары (нұсқалар)			Теріс келісетін шақырулар (жабайы түрі)			Қате шақырулар #	Шақырусыз #	Оң келісім (%)	Теріс келісім (%)	Жалпы келісім (%)
					Сайт 1	Сайт 2	Сайт 3	Сайт 1	Сайт 2	Сайт 3					
Б	50	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
Б	51	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
Б	52	3876дельА (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	53	3905 дюйм (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	54	394дельТТ (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	55	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	56	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
Б	57	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
Б	58	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	59	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
Б	60	L206W (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	61	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
Б	62	G330X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	63	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
Б	64	R347H (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	65	1078дельТ (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	66	G178R/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
Б	67	S549R (c.1647T>G) (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	68	S549N (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	69	W846X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	70	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
Б	71	E92X/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100

Панель	Үлгі №	Үлгі генотипі	Варианттар	Сайттағы жалпы шақыру	Позитивті келісу шақырулары (нұсқалар)			Теріс келісетін шақырулар (жабайы түрі)			Қате шақырулар #	Шақырусыз #	Оң келісім (%)	Теріс келісім (%)	Жалпы келісім (%)
					Сайт 1	Сайт 2	Сайт 3	Сайт 1	Сайт 2	Сайт 3					
Б	72 <sup>4</sup>	621+1G>T/1154insTC (HET)		810	12	12	12	798	798	797	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
Б	73	G542X (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	74	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	75 <sup>2</sup>	F508del (HET)		810	6	5	6	804	670	804	0	135 <sup>2</sup>	94,44	94,44	94,44
Б	76	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	77	621+1G>T/A455E (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
Б	78	1812-1G>A (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	79	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
Б	80	F508del/R553X (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
Б	81	F508del/G551D (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
Б	82	R347P/F508del (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
Б	83	R117H/F508del (HET)	(TG)10(T)9/(TG)12(T)5	816	18	18	18	798	798	798	0	0	100	100	100
Б	84	I507del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	85	2789+5G>A (HOM)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	86 <sup>4</sup>	CFTR dele2, 3/F508del (HET)		810	12	12	12	798	797	798	0	1 <sup>4</sup>	100	99,96	99,96
Б	87	F508del/1898+1G>A (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
Б	88	WT		810	0	0	0	810	810	810	0	0	Қолданылмайды	100	100
Б	89	F508del/2143delT (HET)		810	12	12	12	798	798	798	0	0	100	100	100
Б	90	3905 дүйім (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	91	394дельТТ (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Б	92	F508del (HET)		810	6	6	6	804	804	804	0	0	100	100	100
Барлығы				74556	2209			221182			4	273	99,77	99,88	99,88

<sup>1</sup> Бір көшірмеге арналған N1303K нұсқасына сәйкес келетін жабайы түрдегі орын қамту жеткіліксіз болғандықтан Шақыруды жоққа шығарды.

<sup>2</sup> 5 және 75 үлгілерінің бір көшірмесінде шақыру жылдамдығы 0% болды. Қосымша зерттеу үлгілер кітапхананы дайындағанға дейін үлгі тақтайшасына қосылмаған болуы мүмкін екенін көрсетеді, себебі түтіктерде қалған үлгі көлемі жойылмаған көлеммен сәйкес болды.

<sup>3</sup> Дәлелдер 9 және 10 үлгілерді кітапхананы дайындау алдында оператор ауыстырғанын көрсетеді.

<sup>4</sup> Екі үлгінің әрқайсысының бір репликасына арналған M1V нұсқасына сәйкес келетін жабайы түрдегі орын қамту жеткіліксіз болғандықтан Шақыруды жоққа шығарды.

## Соматикалық өнімділік сипаттамалары

Мұнда сипатталған зерттеулер, талдауға арнайы модуль пайдаланылған екі гендік панельді пайдаланатын зерттеулерді қоспағанда, реттілік деректерін талдау үшін соматикалық нұсқа модулін пайдаланды.

### Дәлдік

FFPE үлгілерінен алынған ДНҚ бар MiSeqDx құралының дәлдігін бағалау үшін үш зерттеу жүргізілді.

### 1-зерттеу

Зерттеу 150 ампликонды пайдаланып 23 түрлі хромосомадағы 12 588 негізді қамтитын әртүрлі гендерді сұрауға арналған өкілдік талдауды пайдаланды. Y хромосомасында сенімді аймақтар жоқ және бағаланбаған. Бұл зерттеуде пайдаланылған бес бірегей үлгі бір отбасынан – екі ата-анадан және үш баладан – жиі бірнеше зертханалар мен реттілік әдістемелері арқылы реттелген. Әйелдерден үш және еркектерден екі үлгі бар. Зерттеу үшін ДНҚ экстракциялар алдында барлық үлгілер формалинмен бекітілген және парафин салынған. GM12877 үлгісі ДНҚ деңгейінде сұйылтылған, GM12878 үлгісімен GM12877-D жасау үшін жиіліктері 5% және 10% жуық нұсқалар жинағын жасау үшін. Үлгілердің әрқайсысы бес қайталаумен сыналған GM12877-D қоспағанда, екі данада сыналған. SNV, кірістіру және жою үшін дәлдік зерттеу деректерін жақсы сипатталған анықтамалық дерекқормен салыстыру арқылы анықталды. Анықтамалық дерекқор тізбегі (Platinum Genomes нұсқасы 2016-01) бірнеше реттілік әдістемелерінің, жалпыға қолжетімді деректердің және тұқым қуалайтын ақпараттың тіркесімінен алынды. Сенімді геномдық аймақтар, егер басқаша көрсетілмесе, осы анықтамалық әдіс негізінде анықталды. Барлығы сынамалар сегіз рет жүргізілді. Дәлдігін көрсету үшін ұсынылған кестелер бірінші іске қосу деректеріне негізделген.

**10-кесте** әр үлгі бойынша оң және теріс пайыздық келісіммен ұсынылған зерттеу деректерін қамтиды, мұнда нұсқа нәтижелері PPA есептеулері үшін жақсы сипатталған композиттік анықтамалық әдіспен салыстырылады. Үш нұсқа түрі (SNV, кірістіру және жою) біріктірілген. Анықтамалық әдіс тек жалғыз нуклеотидтік нұсқалар мен кірістіру/делецияларға арналған нәтижелерді қамтамасыз ететіндіктен, вариантты емес базалық нәтижелер NPA есептеулері үшін адам геномының сілтеме тізбегі hg19 құрастыруымен салыстырылады.

**10-кесте** Жақсы сипатталған 6 үлгіге арналған анықтамалық деректермен MiSeqDx құралының негізгі шақыру нәтижелерінің келісімі

Үлгі	Орташа шақыру жылдамдығы	Барлығы # нұсқа	Барлығы # TP нұсқасы	Барлығы # FN нұсқалары	Барлығы # TN шақыруы	PPA	NPA	OPA
GM12877	98,7	152	147	0	23719	100	100	100
GM12878	98,4	270	260	0	23482	100	100	100
GM12879	98,7	192	186	0	23744	100	100	100
GM12885	99,1	244	236	0	23713	100	100	100
GM12886	98,7	230	226	0	23652	100	100	100
GM12877-D <sup>1</sup>		675	650	0		100	100	100
GM12877-D <sup>2</sup>	98,4	155	155	0	57608	100	100	100

<sup>1</sup> Жиілігі 20%-дан асатын нұсқалар.

<sup>2</sup> Жиілігі 20%-дан аз нұсқа.

150 ампликон түрлі геномдық контентті қамтуға арналған. Ампликондардың ГК контенті 26-87% аралығында болды. Сондай-ақ ампликондарда бір нуклеотидтік диапазон (мысалы, PolyA, PolyT), динуклеотидтер және тринуклеотидтер қайталаңады. Талдауда 6 үлгі бірегей үлгілер пайдаланылды. Деректер геномдық құрамның % дұрыс шақыруларға әсерін анықтау үшін әр ампликон негізінде құрастырылды (**11-кесте**). % дұрыс шақырулар нұсқалық және анықтамалық шақырулардан тұрады және қате немесе жоқ шақырулар болса, 100%-дан аз болады. Нұсқалық шақырулар үшін бір немесе бірнеше сүзгілер орындалмаған кезде шақырулар болмайды (мысалы, қамту жеткіліксіз). Дұрыс емес шақырулар болған жоқ. Шақырулар саны ампликондар бойынша айтарлықтай өзгерді. GC контенті және GC контентімен бірнеше өзара әрекеттесу шақырулардың болмауының ең маңызды болжаушылары болды. Ешқандай шақырулардың 2040/2580 (79%) қамту спецификациясына сәйкес келмегендіктен болған. GC контенті 78%-дан асатын ампликондар көп жағдайда шақырмады. 78% GC контенті бар репрезентативті ампликонның жалпы саны 675 шақырылмайды. Өкілетті ампликонның 87% жалпы саны 1365 шақыру шалмады. Ағын ұяшығына жүктелген үлгілердің санын азайту арқылы қамтуды арттыруға болады, бұл GC контенті жоғары ампликондарда анықтауға мүмкіндік береді.



11-кесте Ампликон деңгейіндегі дәлдік деректері

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
1	1	36450499	36450591	93	93	Indel	0,22	1395	0	0	100
2	1	109465122	109465200	79	79	PolyA (5), PolyC (5), индекс	0,38	1185	0	0	100
3	1	218353867	218353957	91	91	Indel	0,4	1364	0	1	99,9
4	1	223906657	223906748	92	92	Indel	0,49	1380	0	0	100
5	1	228526602	228526682	81	81	PolyG (5)	0,69	1215	0	0	100
6	1	236372039	236372108	70	70	PolyT (10), индекс	0,39	1050	0	0	100
7	1	247812041	247812128	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), индекс	0,27	1320	0	0	100
8	2	55862774	55862863	90	90	Indel	0,28	1350	0	0	100
9	2	87003930	87004009	80	80	Indel	0,38	1200	0	0	100
10	2	177016721	177016805	85	81	Қолданылмайды	0,65	1215	0	0	100
11	2	186625727	186625801	75	75	PolyA (8)	0,35	1117	0	10	99,1
12	2	190323504	190323591	88	88	PolyT (5)	0,42	1320	0	0	100
13	2	200796740	200796826	87	87	PolyT (5), индекс	0,31	1302	0	8	99,4
14	2	212245049	212245139	91	91	PolyT (5), PolyA (6), индекс	0,3	1365	0	0	100
15	2	228147052	228147144	93	93	Қолданылмайды	0,43	1395	0	0	100
16	2	235016350	235016422	73	73	PolyT (5), индекс	0,42	1095	0	0	100
17	3	4466229	4466321	93	93	AT(3), индекс	0,27	1349	0	46	96,7
18	3	46620561	46620643	83	83	Қолданылмайды	0,43	1245	0	0	100
19	3	49851331	49851400	70	70	CT(3), индекс	0,49	1050	0	0	100
20	3	189713161	189713248	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG(3)	0,41	1305	0	30	97,8
21	3	190106030	190106104	75	74	Indel	0,57	1108	0	2	99,8
22	4	2233667	2233744	78	78	PolyA (6)	0,26	1170	0	0	100
23	4	7780541	7780637	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	1455	0	0	100
24	4	15688604	15688681	78	78	Қолданылмайды	0,29	1169	0	1	99,9
25	4	56236521	56236586	66	62	PolyA (5), индекс	0,36	930	0	0	100
26	4	102839244	102839314	71	69	PolyA (5)	0,46	1035	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
27	4	164446743	164446804	62	62	PolyA (7), индекс	0,27	920	0	10	98,9
28	5	1882081	1882158	78	75	Қолданылмайды	0,78	450	0	675	40,0
29	5	14769061	14769144	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	1260	0	0	100
30	5	41069808	41069871	64	64	Қолданылмайды	0,39	960	0	0	100
31	5	74077114	74077196	83	83	PolyA (6), индекс	0,3	1245	0	0	100
32	5	147475343	147475409	67	67	PolyT (5)	0,37	1005	0	0	100
33	5	149323731	149323821	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	1365	0	0	100
34	5	155662213	155662287	75	75	Indel	0,43	1125	0	0	100
35	6	6318713	6318814	102	102	PolyG (6)	0,68	1530	0	0	100
36	6	24949983	24950074	92	92	Indel	0,63	1380	0	0	100
37	6	31084900	31084999	100	94	GCT(5), индекс	0,61	1383	0	27	98,1
38	6	32147987	32148084	98	98	PolyT (5), TCT(3), CTT(3)	0,55	1455	0	15	99,0
39	6	32986864	32986958	95	95	Indel	0,53	1425	0	0	100
40	6	33408498	33408583	86	86	PolyC (6)	0,7	1290	0	0	100
41	6	41647401	41647495	95	94	PolyG (5), индекс	0,61	1410	0	0	100
42	6	112435865	112435955	91	91	PolyA (5)	0,44	1365	0	0	100
43	7	22202076	22202148	73	73	Қолданылмайды	0,44	1095	0	0	100
44	7	66276100	66276187	88	88	Indel	0,35	1320	0	0	100
45	7	77365735	77365821	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	1299	0	6	99,5
46	7	110939946	110940030	85	85	Indel	0,38	1275	0	0	100
47	7	128533468	128533557	90	90	PolyG (5), индекс	0,62	1350	0	0	100
48	7	149503875	149503965	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	1365	0	0	100
49	7	154404519	154404599	81	66	Қолданылмайды	0,31	990	0	0	100
50	7	156476507	156476599	93	93	Indel	0,35	1395	0	0	100
51	8	1817312	1817394	83	83	Қолданылмайды	0,42	1245	0	0	100
52	8	24811020	24811109	90	89	PolyG (7), CTC (4), индекс	0,61	1305	0	30	97,8
53	8	76518625	76518691	67	67	Indel	0,3	1005	0	0	100
54	9	103054909	103055006	98	98	PolyG (6)	0,67	1470	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
55	9	105586150	105586214	65	65	Indel	0,32	973	0	2	99,8
56	9	107620823	107620918	96	96	Қолданылмайды	0,49	1440	0	0	100
57	9	123769149	123769231	83	83	AT(3)	0,37	1242	0	3	99,8
58	9	138995345	138995441	97	97	PolyC (6), индекс	0,68	1455	0	0	100
59	10	5987120	5987198	79	78	PolyG (5), индекс	0,47	1170	0	0	100
60	10	11784629	11784726	98	91	GC(3)	0,87	0	0	1365	0
61	10	27317777	27317855	79	79	PolyT (5)	0,3	1185	0	0	100
62	10	33018351	33018440	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	1350	0	0	100
63	10	45084159	45084253	95	95	Indel	0,35	1425	0	0	100
64	10	55892599	55892687	89	88	AC(11), индекс	0,42	1290	0	69	94,9
65	10	101611250	101611329	80	80	Қолданылмайды	0,49	1200	0	0	100
66	10	118351373	118351453	81	81	Қолданылмайды	0,51	1215	0	0	100
67	11	8159816	8159912	97	96	Қолданылмайды	0,45	1440	0	0	100
68	11	30177648	30177717	70	70	Indel	0,46	1050	0	0	100
69	11	47470345	47470444	100	100	Қолданылмайды	0,65	1500	0	0	100
70	11	59837679	59837740	62	62	Indel	0,37	930	0	0	100
71	11	64418856	64418957	102	102	Қолданылмайды	0,59	1530	0	0	100
72	11	93529612	93529684	73	73	PolyA (5)	0,4	1095	0	0	100
73	11	101347052	101347136	85	85	Қолданылмайды	0,42	1275	0	0	100
74	11	102477336	102477426	91	91	PolyG (6)	0,55	1365	0	0	100
75	11	118406285	118406369	85	85	Indel	0,53	1275	0	0	100
76	11	120357801	120357885	85	85	PolyA (5), CA(3), индекс	0,34	1275	0	0	100
77	11	125769313	125769397	85	85	GA(3)	0,52	1275	0	0	100
78	12	2834770	2834853	84	84	PolyC (5), индекс	0,52	1260	0	14	98,9
79	12	26811004	26811096	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	1395	0	0	100
80	12	30881766	30881846	81	81	Қолданылмайды	0,49	1215	0	0	100
81	12	88474105	88474175	71	71	PolyA (6)	0,35	1065	0	0	100
82	12	120966872	120966966	95	95	PolyG (5)	0,68	1425	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
83	12	24167504	24167576	73	73	Қолданылмайды	0,52	1095	0	0	100
84	13	25816961	25817049	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), индекс	0,22	1305	0	15	98,9
85	13	44880112	44880200	89	89	Indel	0,49	1335	0	0	100
86	13	77665218	77665294	77	77	Indel	0,39	1155	0	0	100
87	14	31619327	31619393	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	1005	0	0	100
88	14	39517884	39517966	83	83	Қолданылмайды	0,25	1245	0	0	100
89	14	46958962	46959034	73	72	PolyT (5), индекс	0,19	1038	0	42	96,1
90	14	58050030	58050110	81	81	Indel	0,38	1215	0	0	100
91	14	82390559	82390649	91	91	Indel	0,35	1365	0	0	100
92	14	92549544	92549609	66	66	PolyA (5)	0,41	975	0	60	94,2
93	14	102808496	102808589	94	94	Indel	0,62	1410	0	0	100
94	15	43170751	43170848	98	96	PolyC (5)	0,45	1440	0	0	100
95	15	63446149	63446216	68	68	Indel	0,25	1020	0	0	100
96	15	77879807	77879901	95	93	PolyG (5), индекс	0,68	1395	0	0	100
97	15	81625334	81625428	95	95	PolyT (6)	0,43	1425	0	0	100
98	15	85438263	85438334	72	71	Indel	0,65	1065	0	0	100
99	15	89817413	89817503	91	91	Қолданылмайды	0,36	1365	0	0	100
100	15	89864274	89864343	70	70	Indel	0,56	1050	0	0	100
101	16	1894910	1894972	63	63	Қолданылмайды	0,27	945	0	0	100
102	16	28997904	28997998	95	95	PolyC (5)	0,67	1425	0	0	100
103	16	3682908	53682994	87	87	TA(3)	0,41	1305	0	0	100
104	16	57954406	57954509	104	104	PolyC (5)	0,67	1560	0	0	100
105	16	85706375	85706465	91	91	Poly T (5), индекс	0,37	1362	0	3	99,8
106	17	3563920	3564008	89	89	GC(3)	0,64	1335	0	0	100
107	17	3594191	3594277	87	87	PolyC (5), индекс	0,67	1303	0	2	99,8
108	17	3970090	3970180	91	91	Indel	0,46	1365	0	0	100
109	17	16084945	16085037	93	93	Indel	0,26	1395	0	0	100
110	17	33998759	33998849	91	89	PolyT (5)	0,54	1335	0	0	100

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
111	17	39589691	39589774	84	82	PolyA (13), индекс (x2)	0,29	1215	0	78	94,0
112	17	41244394	41244484	91	91	PolyA (5)	0,34	1365	0	0	100
113	17	45438866	45438957	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	1365	0	15	98,9
114	17	61502432	61502510	79	79	Indel	0,41	1175	0	10	99,2
115	17	64023582	64023667	86	86	PolyT (7)	0,22	1289	0	1	99,9
116	17	72308237	72308320	84	84	GAG(3)	0,62	1260	0	0	100
117	18	2616456	2616522	67	67	GA(3)	0,31	1005	0	0	100
118	18	6980478	6980568	91	91	Қолданылмайды	0,37	1365	0	0	100
119	18	9888026	9888094	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	1035	0	0	100
120	18	38836999	38837073	75	75	PolyA (5), индекс	0,37	1121	0	19	98,3
121	18	47405382	47405462	81	81	CTC(3), индекс	0,47	1215	0	0	100
122	18	54815665	54815749	85	85	CT(3), индекс	00,45	1275	0	0	100
123	18	59773996	59774060	65	65	Қолданылмайды	0,48	975	0	0	100
124	19	625143	625241	99	99	Қолданылмайды	0,59	1478	0	7	99,5
125	19	18121418	18121491	74	74	Қолданылмайды	0,68	1110	0	0	100
126	19	18186574	18186643	70	70	Қолданылмайды	0,64	1050	0	0	100
127	20	746056	746149	94	94	Қолданылмайды	0,61	1410	0	0	100
128	20	10633195	10633276	82	82	AC(3)	0,59	1230	0	0	100
129	20	17705633	17705708	76	76	CT(3)	0,58	1140	0	0	100
130	20	21766821	21766890	70	70	GT(3),TG(4), индекс	0,46	1050	0	0	100
131	20	25278421	25278521	101	101	Indel	0,63	1515	0	0	100
132	20	50897302	50897368	67	67	Indel	0,36	1005	0	6	99,4
133	20	62331904	62331994	91	88	Poly G (6)	0,73	1320	0	0	100
134	20	62690860	62690946	87	87	Indel	0,57	1305	0	0	100
135	21	30300823	30300888	66	66	Indel	0,35	990	0	0	100
136	21	33694176	33694273	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	1470	0	0	100
137	21	36710706	36710792	87	87	GT(3), индекс	0,39	1305	0	0	100
138	21	46644924	46644992	69	69	PolyA (6), AG(3), индекс	0,32	1029	0	7	99,3

Ампликон	Хромосома	Ампликонды бастау	Ампликон соңы	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	Дұрыс шақыру #	Барлығы қате шақыру #	Жалпы шақырусыз #	% Дұрыс шақыру
139	21	46705575	46705664	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	1350	0	0	100
140	22	25750774	25750873	100	100	Indel	0,63	1500	0	1	99,9
141	22	32439233	32439329	97	97	Қолданылмайды	0,68	1455	0	0	100
142	22	37409844	37409940	97	97	Indel	0,46	1455	0	0	100
143	22	37637596	37637694	99	99	Қолданылмайды	0,6	1485	0	0	100
144	22	47081347	47081438	92	92	Indel	0,66	1380	0	0	100
145	X	15870424	15870492	69	69	PolyT (5)	0,26	1035	0	0	100
146	X	135288543	135288611	69	69	PolyC (5)	0,62	1035	0	0	100
147	X	135290777	135290847	71	71	Қолданылмайды	0,52	1065	0	0	100
148	Ы	2655397	2655461	65	0	Қолданылмайды	0,55	0	0	0	Қолданылмайды
149	Ы	2655519	2655609	91	0	Қолданылмайды	0,48	0	0	0	Қолданылмайды
150	Ы	2655609	2655679	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	Қолданылмайды

Шақырулар болмаған нұсқалар [12-кесте](#) жинақталған. Шақырулардың болмауына әкелген нақты сүзгілер кестеде берілген.

**12-кесте** Нұсқалардың қысқаша қорытындысы: шақырулар жоқ

Ампликон №	Chr: Поз	Нұсқа	Сәйкес ампликон контенті	Сүзгі	Қабылданбаған нұсқалар	Күтілетін нұсқалар
28	5:1882129	T > G	78% GC	LowDP <sup>1</sup>	8	13
52	8:24811064	AG > A	PolyG (7), CTC(4), 61% GC	R3x6 <sup>2</sup>	15	15
60	10:11784633	C > T	PolyGC (3), 87% GC	Төмен DP	13	13
64	10:55892600	TAC > T	AC(11), 42% GC	R3x6	9	9
111	17:39589692	C > CA	PolyA (13), 29% GC	R3x6	13	13

<sup>1</sup> LowDP: Төмен қамту. Осы нақты позициядағы бассейндердің кем дегенде біріндегі тереңдік 900-ден төмен болса, нұсқа сүзіледі.

<sup>2</sup> R3x6: Сүзгіні қайталаңыз. Егер нұсқаның барлығы немесе бір бөлігі нұсқа позициясына іргелес сілтеме геномында қайта-қайта болса, нұсқа сүзіледі. Анықтамадағы кемінде алты қайталау қажет және тек ұзындығы 3 битке дейінгі қайталаулар қарастырылады.

Үлгі үшін реттілік нәтижелері Ұлттық стандарттар және технологиялар институттары (NIST) белгілеген NA12878 үшін өте сенімді генотиппен салыстырылды (v.2.19). 150 ампликонның ішінде 92 ампликон толық сенімді геномдық аймақтарда болды, 41 ампликонда ішінара қабаттасу болды, ал 17 ампликонда NIST тізбегінде ешқандай сәйкестік болмады. Бұл салыстыру үшін әр көшірмеде 10 000 координатқа әкелді. Вариантты емес базалық шақырулар hg19 құрылымының адам геномының анықтамалық реттілігімен салыстырылды. Дәлдік нәтижелері [13-кесте](#) көрсетілген.

**13-кесте** MiSeqDx құралының негізгі шақыру нәтижелерінің GM12878 үлгісіне арналған NIST анықтамасымен келісімі

Үлгі	# Амплиондар	Орташа шақыру жылдамдығы	Барлығы # TP нұсқа шақыруы	Барлығы # FN нұсқа шақыруы	Барлығы # TN шақыруы	Барлығы # FP шақыруы	PPA	NPA	OPA
GM12878	150	98,43	206	0	19231	0	100	100	100

Бес сұйылтылмаған үлгі шағын кірістірулер мен жоюларды (индель) шақыру үшін қосымша талданды [14-кесте](#). Кейбір жағдайларда, индекс екі немесе одан да көп үлгілер арасында жалпы болды, себебі жалпы # үлгі көшірмелері Indel бағанында көрсетіледі. Бес үлгінің екі репликасына арналған нәтижелер [14-кесте](#) берілген. Өлшемдері кірістіру үшін 1-24 бит және жою үшін 1-25 бит болатын жалпы саны 71 индекс болды. Әрқайсысы 1 оң пайыздық келісіммен 68 индекс анықталды. Үш кірістіру мен жоюда дұрыс шақырулар болмады, себебі бұл нұсқалардың әрқайсысы R3x6 сүзгісіне байланысты шақырусыз болды. Сондықтан шақыруларды жоққа шығармайтын PPA есептеу мүмкін болмады. Үш нұсқа 1 бр жою болды (chr8 24811064 AG>A); 2 бр жою (chr10 55892600 TAC>T); және 1 бр кірістіру (chr17 39589692 C>CA).

**14-кесте** MiSeqDx құралымен Indel анықтаудың қысқаша қорытындысы

Ампликон	Хромосома	Позиция	Талданған фрагмент өлшемі	Amplicon Indel түрі және ұзындығы	Indel	Indel көмегімен # үлгі көшірмелері	шақырусыз #	Барлығы # қате Indel шақырулары	Барлығы # дұрыс Indel шақырулары	PPA
1	1	36450544	93	25 бит жою	GAAAATTTAATGAAACACATTGTCCT>G	7	0	0	7	100
2	1	109465165	79	3 бр жою	ACTT>A	9	0	0	9	100
3	1	218353908	91	23 бит енгізу	T>TTTTAATAGCAAAAAGAGGCTAGA	15	0	0	15	100
4	1	223906701	92	17 бит жою	GACAGACTGTGAGGAAGA>G	11	0	0	11	100
6	1	236372081	70	5 бит енгізу	C>CTTAAG	9	0	0	9	100
7	1	247812083	88	3 бит енгізу	C>CATG	9	0	0	9	100
8	2	55862804	90	7 бит енгізу	T>TTTGGTAA	13	0	0	13	100
9	2	87003972	80	6 бр жою	TTATCTC>T	11	0	0	11	100
13	2	200796749	87	5 бит енгізу	T>TTAAAA	15	0	0	15	100
14	2	212245090	91	12 бит енгізу	C>CTGAAAATAGGAT	11	0	0	11	100
16	2	235016388	73	2 бит енгізу	A>ATG	9	0	0	9	100
17	3	4466274	93	23 бит жою	TAACCTAAAATTACAAAATAACCC>T	13	0	0	13	100
19	3	49851375	70	9 бит енгізу	C>CCTGGCTCCT	7	0	0	7	100
21	3	190106071	75	1 бит жою	AG>A	13	0	0	13	100
25	4	56236567	66	8 бр жою	TAACCGAAA>T	9	0	0	9	100

Ампликон	Хромосома	Позиция	Талданған фрагмент өлшемі	Amplicon Indel түрі және ұзындығы	Indel	Indel көмегімен # үлгі кешірмелері	шақырусыз #	Барлығы # қате Indel шақырулары	Барлығы # дұрыс Indel шақырулары	PPA
27	4	164446785	62	11 бит енгізу	T>TTATGGTATTGA	9	0	0	9	100
31	5	74077155	83	4 бр жою	TAGTA>T	7	0	0	7	100
34	5	155662255	75	8 бит енгізу	G>GCCTACTGA	13	0	0	13	100
36	6	24950035	92	21 бит жою	CCCTGGGTGCTATAGCCCACCA>C	11	0	0	11	100
37	6	31084942	100	3 бр жою	GCTT>G	15	0	0	15	100
39	6	32986905	95	25 бит жою	CTTTCACCTTTCCCGTCTCATGCAAAG>C	7	0	0	7	100
41	6	41647442	95	23 бит жою	GGCATGAGGCTTGGTGACATGGCA>G	11	0	0	11	100
44	7	66276142	88	1 бит енгізу	C>CT	13	0	0	13	100
46	7	110939983	85	4 бр жою	CAAGT>C	13	0	0	13	100
47	7	128533514	90	1 бит енгізу	T>TC	15	0	0	15	100
48	7	149503916	91	4 бр жою	GGATA>G	7	0	0	7	100
50	7	156476548	93	11 бит жою	GAATCTGCACTT>G	13	0	0	13	100
52	8	24811064	90	1 бит жою	AG>A	15	15	0	0	Қолданылмайды
53	8	76518677	67	4 бит енгізу	T>TACTG	9	0	0	9	100
55	9	105586193	65	4 бит енгізу	C>CAATT	13	0	0	13	100
58	9	138995370	97	21 бит жою	TCTGGGGGGCAGCCCCTGAGGG>T	9	0	0	9	100
59	10	5987158	79	3 бр жою	TAAC>T	11	0	0	11	100
63	10	45084202	95	16 бит жою	AGCGTCTATAACCAAT>A	11	0	0	11	100
64	10	55892600	89	2 бр жою	TAC>T	9	9	0	0	100
68	11	30177690	70	2 бит енгізу	C>CTG	7	0	0	7	100
70	11	59837721	62	8 бит енгізу	T>TTATGAAAA	11	0	0	11	100
75	11	118406328	85	8 бр жою	CAGTGTGGA>C	9	0	0	9	100
76	11	120357842	85	2 бр жою	CTT>C	11	0	0	11	100
78	12	2834814	84	21 бит енгізу	T>TTCTCAGTACGGTGAACCCCAG	15	0	0	15	100
84	13	25817002	89	19 бит енгізу	C>CAAAATATAAAAAGCTCCCT	15	0	0	15	100
85	13	44880152	89	4 бит енгізу	C>CCTGT	11	0	0	11	100
86	13	77665265	77	20 бит жою	ATCTATTTTCTAATAGACGGC>A	9	0	0	9	100
89	14	46958967	73	22 бит жою	TTTAAAATTTGAATGTGATAAAA>T	15	0	0	15	100



Ампликон	Хромосома	Позиция	Талданған фрагмент өлшемі	Amplicon Indel түрі және ұзындығы	Indel	Indel көмегімен # үлгі көшірмелері	шақырусыз #	Барлығы # қате Indel шақырулары	Барлығы # дұрыс Indel шақырулары	PPA
90	14	58050081	81	4 бит енгізу	C>CTGAT	13	0	0	13	100
91	14	82390602	91	16 бит жою	CTTGCTCTATAAACCGT>C	11	0	0	11	100
93	14	102808554	94	5 бр жою	CGTGGA>C	9	0	0	9	100
95	15	63446199	68	6 бр жою	CAAAATT>C	11	0	0	11	100
96	15	77879862	95	25 бит жою	GCCCCTGAGCCAGCCTCCCGCTCTTA>G	9	0	0	9	100
98	15	85438311	72	3 бит енгізу	C>CTTG	9	0	0	9	100
100	15	89864316	70	4 бит енгізу	G>GCTAC	9	0	0	9	100
105	16	85706416	91	7 бр жою	ATTATTT>A	11	0	0	11	100
107	17	3594276	87	1 бит жою	TG>T	13	0	0	13	100
108	17	3970133	91	18 бит енгізу	A>ATCCTATTCTACTCTGAAT	11	0	0	11	100
109	17	16084985	93	4 бит енгізу	A>AACAC	7	0	0	7	100
111	17	39589692	84	1 бит енгізу	C>CA	13	13	0	0	100
112	17	39589739	84	24 бит енгізу	T>TTCTGAAGGTCAAGTCTATCCCTGA	15	0	0	15	100
113	17	45438886	92	4 бр жою	CAGTG>C	7	0	0	7	100
114	17	61502459	79	12 бит жою	TTGTATCTGCTG>T	13	0	0	13	100
120	18	38837054	75	22 бит енгізу	T>TGTATCTTAGCAAAAGTTTCTCA	15	0	0	15	100
121	18	47405425	81	3 бит енгізу	T>TGAG	11	0	0	11	100
122	18	54815706	85	2 бр жою	ACT>A	13	0	0	13	100
130	20	21766863	70	15 бит жою	TACTTGAGAAGTGGAGG>T	9	0	0	9	100
131	20	25278464	101	5 бит енгізу	A>AGTGGG	13	0	0	13	100
132	20	50897361	67	11 бит енгізу	G>GGAATGTCAGCC	15	0	0	15	100
134	20	62690925	87	16 бит жою	TCCTGGCTGGCCTGTGG>T	9	0	0	9	100
135	21	30300873	66	11 бит енгізу	G>GATAAACTTTA	9	0	0	9	100
137	21	36710749	87	21 бит жою	ACTCAAGATAACTCATGTTATC>A	9	0	0	9	100
138	21	46644985	69	5 бр жою	GTTGTT>G	13	0	0	13	100
140	22	25750814	100	6 бит енгізу	C>CAGGGCA	13	0	0	13	100
142	22	37409885	97	5 бит енгізу	C>CTGTTT	13	0	0	13	100
144	22	47081407	92	10 бит жою	GGGCACAGGCA>G	7	0	0	7	100

## 2-зерттеу

Бұл зерттеуде банкирленген FFPE колоректальды қатерлі ісік тінінің үлгілері және екі гендік репрезентативті талдау қолданылды, ол анықтамалық әдіспен, қос бағытты Сангер секвенциясымен (Сэнгер) салыстырылды. 1183 жалпы зерттелушінің 441 субъектіде жарамды Сангер және репрезентативті талдау нәтижелері болды. Пән деңгейінде бағаланған кезде (15-кесте), 441 субъектінің 230-ы Сэнгер бойынша оң болды (Сэнгер мутациясын анықтады). Олардың 227-сі репрезентативті талдау арқылы оң болды. 441 субъектінің қалған 211-і Сэнджер теріс болды (Сэнгер мутация анықтаған жоқ). Олардың 206-сы репрезентативті талдау арқылы теріс болды. Бұл оң пайыздық келісімге (PPA) 98,7% және теріс пайыздық келісімге (NPA) 97,6% әкелді (15-кесте).

15-кесте Субъект деңгейіндегі нәтижелердің оң және теріс пайыздық келісімі

Өкілдік талдау	Сангер		Барлығы
	Оң	Теріс	
Оң	227 <sup>1</sup>	5	232
Теріс	3 <sup>2</sup>	206	209
Барлығы	230	211	441

Келісім Статистика	Өнімділік Түйіндеме	
	Ұпай бағалауы	Дәл 95% CI
PPA	227/230 = 98,7%	[96,2%,99,7%]
NPA	206/211 = 97,6%	[94,6%,99,2%]

<sup>1</sup> Пән ішіндегі, барлық мутация деңгейіндегі нәтижелер үшін 224 дәл сәйкестік болды. Екі субъект үшін MiSeqDx Sanger анықталған мутацияны және бір қосымша мутацияны анықтады. Бір субъект үшін MiSeqDx және Sanger әртүрлі мутацияларды анықтады.

<sup>2</sup> Бір зерттелушіде Сэнгер анықтаған екі мутация болды. Екі субъектіде Сэнгер анықтаған бір мутация болды.

### 3-зерттеу

Бұл зерттеу көптеген тіндер түрлерінде FFPE үлгілерімен дайындалған ДНҚ кітапханаларын бағалады. Сегіз түрлі тіндерден (тоқ ішек, аналық без, ұйқы безі, бүйрек үсті безі, қуық, бауыр, қалқанша без және сүт безі) барлығы 109 FFPE үлгісі, әр ұлпа түрін көрсететін кемінде 11 FFPE үлгісі). Бүйрек үсті безінің тініне өңеш, өкпе, тоқ ішек ісіктерінің метастаздары кіреді. Басқа тіндерде бастапқы ісіктер болды. Бұл зерттеу 17 түрлі хромосомадағы 21 577 негізді қамтитын 26 генді сұрау үшін репрезентативті талдау дизайнын пайдаланды. Барлығы алты түрлі ген (*KRAS*, *NRAS*, *TP53*, *PIK3CA*, *EGFR* және *BRAF*) сол ісікке арналған соматикалық мутациялардың күтілетін таралуы негізінде секвенирленген 1-3 Сангер гені бар әр мутациямен реттелген. Сангер секвенциясы нәтижелері 109 FFPE үлгісінің 33-інде 39 SNV соматикалық мутациясын анықтады. MiSeqDx 109 FFPE үлгісінің 32-де бір жалған теріс және екі нұсқа позициясы шақырусыз 36 SNV соматикалық мутациясын анықтады. PPA 97,3% құрады. MiSeqDx 109 FFPE үлгісі бойынша 78 975 анықтамалық негізді анықтады. Сэнгер реттілігіне қатысты 29 жалған оң және 3416 шақыру жоқ. NPA 99,9% құрады. Екі негізгі жою екі әдіс арасында сәйкес болды. [16-кесте](#) тін түрі бойынша нәтижелерді жинақтайды.

16-кесте Тін түрі бойынша оң және теріс пайыздық келісім

Тіндердің түрі	# Үлгілер	Барлығы # нұсқа	Барлығы # TP нұсқасы	Барлығы # FN нұсқалары	Барлығы # TN шақыруы	Барлығы # FP шақыруы	Жалпы шақырусыз #	PPA	NPA
Бүйрек үсті безі	16	6	4	1	11823	2	607	80	> 99,9
Қуық	12	4	4	0	7070	3	273	100	> 99,9
Кеуде	16	3	3	0	13439	7	479	100	99,9
Қос нүкте	11	6	5	0	8720	2	133	100	> 99,9
Бауыр	13	3	3	0	7984	1	59	100	> 99,9
Аналық без	13	7	7	0	10581	1	724	100	> 99,99
Ұйқы безі	17	7	7	0	11929	12	489	100	99,9
Қалқанша безі	11	3	3	0	7429	1	652	100	> 99,9
Барлығы	109	39	36	1	78975	29	3416	97,3	> 99,9

### Қайта шығару мүмкіндігі

FFPE үлгілерінен алынған ДНҚ бар MiSeqDx құралының қайталану мүмкіндігін бағалау үшін екі зерттеу жүргізілді. 1-зерттеу бірнеше құралдарды пайдаланды. 2-зерттеуде бірнеше сайттар болды.

## 1-зерттеу

MiSeqDx құралының қайталану мүмкіндігі екі құрал мен екі оқытылған оператордың көмегімен барлығы сегіз іске қосу үшін анықталды. Өкілдік талдау, ампликон геномдық контекст, үлгілер және анықтамалық әдіс жоғарыдағы 1-дәлдік зерттеу үшін сипатталғанмен бірдей. Нәтижелер әр құрал үшін әр ампликон негізінде берілген [17-кесте](#) Құралдар бойынша шақырудың қайталану мүмкіндігін көрсетуге арналған. % дұрыс шақырулар қатені де, шақыруларды да қамтиды (нұсқа қоңыраулар үшін бір немесе бірнеше сүзгілер орындалмайды). Құралдар белгілі бір ампликонға байланысты шақырусыз ұқсас сандарды жасады. MiSeqDx 1 үшін Platinum Genomes анықтамалық стандартымен анықталған сенімді аймақта бір рет қате шақыру байқалды. Қате шақыру 55892599-дан 55892687-ге дейінгі позициялардағы 10-хромосоманы сұрайтын 64-ампликондағы кірістіру нұсқасының жалған оң шақыруы болды. Ампликонның динуклеотидтік қайталануы 11 болды.

17-кесте MiSeqDx құралына арналған құралдың қайталану нәтижелерін зерттеу құралы (ампликон деңгейі)

Ампликон	Хромосома	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
1	1	93	93	Indel	0,22	5580	0	0	5580	0	0
2	1	79	79	PolyA (5), PolyC (5), индекс	0,38	4740	0	0	4740	0	0
3	1	91	91	Indel	0,4	5448	0	12	5453	0	8
4	1	92	92	Indel	0,49	5518	0	2	5518	0	2
5	1	81	81	PolyG (5)	0,69	4858	0	2	4860	0	0
6	1	70	70	PolyT (10) көрсеткіш	0,39	4200	0	0	4200	0	0
7	1	88	88	PolyA (5), CT(3), TAA(3), индекс	0,27	5279	0	1	5279	0	1
8	2	90	90	Indel	0,28	5400	0	0	5400	0	0
9	2	80	80	Indel	0,38	4800	0	0	4800	0	0
10	2	85	81	Қолданылмайды	0,65	4859	0	1	4859	0	1
11	2	75	75	PolyA (8)	0,35	4468	0	40	4468	0	40
12	2	88	88	PolyT (5)	0,42	5280	0	0	5280	0	0
13	2	87	87	PolyT (5), индекс	0,31	5211	0	43	5214	0	40

Ампликон	Хромосома	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
14	2	91	91	PolyT (5), PolyA (6), индекс	0,3	5453	0	7	5449	0	11
15	2	93	93	Қолданылмайды	0,43	5579	0	1	5579	0	1
16	2	73	73	PolyT (5), индекс	0,42	4378	0	2	4379	0	1
17	3	93	93	AT(3), индекс	0,27	5396	0	184	5396	0	184
18	3	83	83	Қолданылмайды	0,43	4980	0	0	4980	0	0
19	3	70	70	CT(3), индекс	0,49	4193	0	7	4194	0	6
20	3	88	88	PolyA (5), PolyT (5), PolyA (9), TG (3)	0,41	5220	0	120	5220	0	120
21	3	75	74	Indel	0,57	4432	0	8	4432	0	8
22	4	78	78	PolyA (6)	0,26	4676	0	4	4676	0	4
23	4	97	97	PolyG (6), PolyT (5), PolyA (5)	0,42	5820	0	0	5820	0	0
24	4	78	78	Қолданылмайды	0,29	4679	0	1	4677	0	3
25	4	66	62	PolyA (5), индекс	0,36	3720	0	0	3720	0	0
26	4	71	69	PolyA (5)	0,46	4140	0	0	4140	0	0
27	4	62	62	PolyA (7), индекс	0,27	3676	0	45	3671	0	51
28	5	78	75	Қолданылмайды	0,78	3368	0	1132	3485	0	1015
29	5	84	84	GT(3), CCA(3)	0,62	5040	0	0	5040	0	0
30	5	64	64	Қолданылмайды	0,39	3840	0	0	3840	0	0
31	5	83	83	PolyA (6), индекс	0,3	4979	0	1	4980	0	0
32	5	67	67	PolyT (5)	0,37	4020	0	0	4020	0	0
33	5	91	91	CT(4), AG(3)	0,55	5460	0	0	5460	0	0
34	5	75	75	Indel	0,43	4498	0	6	4500	0	1
35	6	102	102	PolyG (6)	0,68	6120	0	0	6120	0	0
36	6	92	92	Indel	0,63	5520	0	0	5520	0	0

Ампликон	Хромосома	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
37	6	100	94	GCT(5), индекс	0,61	5532	0	108	5532	0	108
38	6	98	98	Poly T (5), TCT (3), CTT(3)	0,55	5820	0	60	5820	0	60
39	6	95	95	Indel	0,53	5697	0	3	5698	0	2
40	6	86	86	PolyC (6)	0,7	5159	0	1	5160	0	0
41	6	95	94	PolyG (5), индекс	0,61	5638	0	2	5638	0	2
42	6	91	91	PolyA (5)	0,44	5460	0	0	5460	0	0
43	7	73	73	Қолданылмайды	0,44	4380	0	0	4380	0	0
44	7	88	88	Indel	0,35	5279	0	1	5276	0	4
45	7	87	87	PolyA (7), AG(4)	0,26	5184	0	36	5181	0	39
46	7	85	85	Indel	0,38	5100	0	0	5100	0	0
47	7	90	90	PolyG (5), индекс	0,62	5398	0	2	5399	0	1
48	7	91	91	PolyG (6), PolyC (6), indel	0,71	5460	0	0	5459	0	1
49	7	81	66	Қолданылмайды	0,31	3960	0	0	3960	0	0
50	7	93	93	Indel	0,35	5580	0	0	5579	0	1
51	8	83	83	Қолданылмайды	0,42	4980	0	0	4980	0	0
52	8	90	89	PolyG (7), CTC (4), индекс	0,61	5219	0	121	5220	0	120
53	8	67	67	Indel	0,3	4020	0	0	4020	0	0
54	9	98	98	PolyG (6)	0,67	5879	0	1	5880	0	0
55	9	65	65	Indel	0,32	3894	0	6	3895	0	5
56	9	96	96	Қолданылмайды	0,49	5760	0	0	5760	0	0
57	9	83	83	AT(3)	0,37	4973	0	7	4978	0	2
58	9	97	97	PolyC (6), индекс	0,68	5817	0	3	5818	0	2
59	10	79	78	PolyG (5), индекс	0,47	4679	0	1	4680	0	0

Ампликон	Хромосома	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
60	10	98	91	GC(3)	0,87	450	0	5010	632	0	4828
61	10	79	79	PolyT (5)	0,3	4740	0	0	4740	0	0
62	10	90	90	PolyA (5), PolyT (5)	0,2	5400	0	0	5400	0	0
63	10	95	95	Indel	0,35	5699	0	1	5699	0	1
64	10	89	88	AC(11), индекс	0,42	5157	0	276	5153	2	273
65	10	80	80	Қолданылмайды	0,49	4800	0	0	4800	0	0
66	10	81	81	Қолданылмайды	0,51	4860	0	0	4860	0	0
67	11	97	96	Қолданылмайды	0,45	5760	0	0	5760	0	0
68	11	70	70	Indel	0,46	4199	0	2	4200	0	1
69	11	100	100	Қолданылмайды	0,65	5999	0	1	5998	0	2
70	11	62	62	Indel	0,37	3720	0	0	3720	0	0
71	11	102	102	Қолданылмайды	0,59	6120	0	0	6118	0	2
72	11	73	73	PolyA (5)	0,4	4380	0	0	4380	0	0
73	11	85	85	Қолданылмайды	0,42	5100	0	0	5100	0	0
74	11	91	91	PolyG (6)	0,55	5437	0	23	5441	0	19
75	11	85	85	Indel	0,53	5100	0	0	5100	0	0
76	11	85	85	Poly A (5), CA(3), индекс	0,34	5100	0	0	5100	0	0
77	11	85	85	GA(3)	0,52	5100	0	0	5100	0	0
78	12	84	84	PolyC (5), индекс	0,52	5040	0	60	5038	0	63
79	12	93	93	PolyA (7), AC(4)	0,33	5577	0	3	5573	0	7
80	12	81	81	Қолданылмайды	0,49	4860	0	0	4860	0	0
81	12	71	71	PolyA (6)	0,35	4260	0	0	4260	0	0
82	2	95	95	PolyG (5)	0,68	5605	0	95	5605	0	95
83	13	73	73	Қолданылмайды	0,52	4380	0	0	4379	0	1

Ампликон	Хромосома	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
84	13	89	88	PolyA (5), PolyT (7), PolyA (7), индекс	0,22	5220	0	60	5220	0	60
85	13	89	89	Indel	0,49	5340	0	0	5340	0	0
86	13	77	77	Indel	0,39	4620	0	0	4620	0	0
87	14	67	67	GA(3), TA(3)	0,39	4020	0	0	4020	0	0
88	14	83	83	Қолданылмайды	0,25	4980	0	0	4980	0	0
89	14	73	72	PolyT (5), индекс	0,19	4173	0	147	4173	0	147
90	14	81	81	Indel	0,38	4860	0	2	4860	0	0
91	14	91	91	Indel	0,35	5459	0	1	5460	0	0
92	14	66	66	PolyA (5)	0,41	3900	0	240	3900	0	240
93	14	94	94	Indel	0,62	5637	0	3	5637	0	3
94	15	98	96	PolyC (5)	0,45	5760	0	0	5760	0	0
95	15	68	68	Indel	0,25	4079	0	1	4078	0	2
96	15	95	93	PolyG (5), индекс	0,68	5475	0	105	5487	0	93
97	15	95	95	PolyT (6)	0,43	5699	0	1	5700	0	0
98	15	72	71	Indel	0,65	4260	0	0	4260	0	0
99	15	91	91	Қолданылмайды	0,36	5460	0	0	5460	0	0
100	15	70	70	Indel	0,56	4200	0	0	4200	0	0
101	16	63	63	Қолданылмайды	0,27	3780	0	0	780	0	0
102	16	95	95	PolyC (5)	0,67	5700	0	0	5700	0	0
103	16	87	87	TA(3)	0,41	5220	0	0	5220	0	0
104	16	104	104	PolyC (5)	0,67	6238	0	3	6238	0	3
105	16	91	91	PolyT (5), индекс	0,37	5443	0	17	5444	0	16
106	17	89	89	GC(3)	0,64	5251	0	89	5339	0	1
107	17	87	87	PolyC (5), индекс	0,67	5212	0	8	5212	0	8



Ампликон	Хромосома	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
108	17	91	91	Indel	0,46	5459	0	1	5459	0	1
109	17	93	93	Indel	0,26	5580	0	0	5580	0	0
110	17	91	89	PolyT (5)	0,54	5340	0	0	5340	0	0
111	17	84	82	Poly A (13), индекс (x2)	0,29	4860	0	308	4860	0	07
112	17	91	91	PolyA (5)	0,34	5459	0	1	5459	0	1
113	17	92	92	PolyA (7), AT(3), AT(4), AT(4), indel	0,26	5460	0	60	5460	0	60
114	17	79	79	Indel	0,41	4699	0	41	4700	0	40
115	17	86	86	PolyT (7)	0,22	5153	0	7	5156	0	4
116	17	84	84	GAG(3)	0,62	5039	0	1	5039	0	1
117	18	67	67	GA(3)	0,31	4020	0	0	4020	0	0
118	18	91	91	Қолданылмайды	0,37	5460	0	0	5460	0	0
119	18	69	69	PolyA (6), TG(3)	0,43	4132	0	8	4131	0	9
120	18	75	75	PolyA (5), индекс	0,37	4475	0	85	4480	0	79
121	18	81	81	СТС(3), индекс	0,47	4860	0	0	4860	0	0
122	18	85	85	СТ(3), индекс	0,45	5098	0	2	5098	0	2
123	18	65	65	Қолданылмайды	0,48	3900	0	0	3900	0	0
124	19	99	99	Қолданылмайды	0,59	5926	0	14	5924	0	16
125	19	74	74	Қолданылмайды	0,68	4440	0	0	4438	0	2
126	19	70	70	Қолданылмайды	0,64	4199	0	1	4200	0	0
127	20	94	94	Қолданылмайды	0,61	5640	0	1	5638	0	3
128	20	82	82	АС(3)	0,59	4920	0	0	4920	0	0
129	20	76	76	СТ(3)	0,58	4559	0	1	4558	0	2
130	20	70	70	GT(3),TG(4), индекс	0,46	4200	0	0	4200	0	0

Ампликон	Хромосома	Талданған фрагмент өлшемі	Сенімді аймақтардағы базалар	Ампликонның геномдық контенті	GC контенті	MiSeqDx 1			MiSeqDx 2		
						Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #	Жалпы дұрыс шақыру	Жалпы қате шақыру	Жалпы шақырусыз #
131	20	101	101	Indel	0,63	6060	0	0	6060	0	0
132	20	67	67	Indel	0,36	4020	0	31	4020	0	25
133	20	91	88	PolyG (6)	0,73	5277	0	3	5274	0	6
134	20	87	87	Indel	0,57	5218	0	2	5218	0	2
135	21	66	66	Indel	0,35	3959	0	1	3957	0	3
136	21	98	98	PolyT (6), CA(3)	0,54	5880	0	0	5880	0	0
137	21	87	87	GT(3), индекс	0,39	5220	0	0	5220	0	0
138	21	69	69	PolyA (6), AG(3), индекс	0,32	4119	0	31	4113	0	37
139	21	90	90	PolyT (5), PolyA (6)	0,5	5399	0	1	5399	0	1
140	22	100	100	Indel	0,63	5998	0	7	5997	0	5
141	22	97	97	Қолданылмайды	0,68	5819	0	1	5819	0	1
142	22	97	97	Indel	0,46	5818	0	2	5816	0	4
143	22	99	99	Қолданылмайды	0,6	5940	0	0	5940	0	0
144	22	92	92	Indel	0,66	5519	0	1	5519	0	1
145	X	69	69	PolyT (5)	0,26	4139	0	1	4140	0	0
146	X	69	69	PolyC (5)	0,62	4136	0	4	4137	0	3
147	X	71	71	Қолданылмайды	0,52	4260	0	0	4260	0	0
148	Ы	65	0	Қолданылмайды	0,55	0	0	0	0	0	0
149	Ы	91	0	Қолданылмайды	0,48	0	0	0	0	0	0
150	Ы	71	0	PolyA (5)	0,37	0	0	0	0	0	0

Қайта шығару мүмкіндігін зерттеу нәтижелері нұсқа жиілігін пайдалану арқылы әр оператор негізінде талданды (18-кесте). Бұл талдау нұсқа жиіліктері операторлар арасында сәйкес келетінін көрсетті. Орташа нұсқа жиіліктері +/- 1 стандартты ауытқу көрсетілген.

18-кесте MiSeqDx құралы үшін оператордан операторға нәтижелер

Вариант жиілік диапазоны	# Бірегей нұсқалар	Барлығы # Варианттар талданатын оператор 1	Барлығы # Варианттар талданатын оператор 2	Орташа (SD) хабарланған нұсқа жиілігі операторы 1	Орташа (SD) хабарланған нұсқа жиілігі операторы 2
Жоғары жиілік (~100%)	1112	1072	1072	0,96 +/- 0,05	0,96 +/- 0,05
Орташа жиілік (~50%)	3240	3151	3161	0,49 +/- 0,04	0,49 +/- 0,04
Төмен жиілік (3-7%)	620	618	612	0,05 +/- 0,01	0,05 +/- 0,01

Әр үлгі үшін қайталану мүмкіндігін зерттеу нәтижелері барлық сегіз іске қосудан біріктірілген түрде көрсетілген [19-кесте](#). Анықтау әр нұсқа түрі үшін бөлек бағаланады — SNV, кірістіру және жоюлар бөлек. Сілтеме берілген лауазымдар алынып тасталды. Бұл талдау нұсқалардың нәтижелері үлгілер бойынша қайталануға болатынын көрсетті.

19-кесте Әр үлгі бойынша MiSeqDx құралының негізгі шақыру нәтижелерінің келісімі

Үлгі	SNVs				Кірістірулер				Жоюлар			
	Барлығы #	Барлығы # TP	Барлығы # FP	Барлығы # FN	Барлығы #	Барлығы # TP	Барлығы # FP	Барлығы # FN	Барлығы #	Барлығы # TP	Барлығы # FP	Барлығы # FN
GM12877	592	574	2	0	336	336	0	0	228	272	0	0
GM12878	1456	1432	0	0	320	304	0	0	384	352	0	0
GM12879	912	896	0	0	336	320	0	0	288	272	0	0
GM12885	1200	1192	0	0	400	384	0	0	352	320	0	0
GM12886	1104	1104	0	0	368	352	0	0	368	352	0	0
GM12877-D1 <sup>1</sup>	3640	3582	0	0	800	760	0	0	960	880	0	0
GM12877-D2 <sup>2</sup>	400	398	0	0	520	516	0	0	560	556	0	0

<sup>1</sup>Жиілігі 20%-дан асатын нұсқалар.

<sup>2</sup>Жиілігі 20%-дан аз нұсқа.

Осы репродукциялық зерттеудегі 8 іске қосумен қамтамасыз етілген деректер MiSeqDx құралы дәйекті түрде реттілік жасай алады деген мәлімдемені қолдайды:

- GC контенті  $\geq 19\%$  (барлық деп аталатын негіздер 120 реттелген ампликонның 120-да 19% GC контенті дұрыс шақырылған, шақырусыз 3,4%)
- GC контенті  $\leq 73\%$  (барлық деп аталатын негіздер 120 реттелген ампликонның 120-да 73% GC контенті дұрыс шақырылған, шақырусыз 0,1%)
- PolyA ұзындығы  $\leq 8$  (8 нуклеотидтен тұратын PolyA қайталануы PolyA = 8 болатын 120 реттелген ампликонның 120-ында дұрыс шақырылды)
- PolyT ұзындығы  $\leq 10$  (8 нуклеотидтен тұратын PolyT қайталануы PolyT = 10 болатын 120 реттелген ампликонның 120-ында дұрыс шақырылды)
- PolyG ұзындығы  $\leq 6$  (6 нуклеотидтен тұратын PolyG қайталануы PolyG = 6 болатын 720 реттелген ампликонның 720-ында дұрыс шақырылды)
- PolyC ұзындығы  $\leq 6$  (6 нуклеотидтен тұратын PolyC қайталануы PolyC = 6 болатын 360 реттелген ампликонның 359-ында дұрыс шақырылды, 1 шақырусыз)
- Динуклеотидтердің қайталану ұзақтығы  $\leq 4x$  (4x динуклеотидті қайталанатын 600 реттелген ампликонның 600-де деп аталатын негіздердің барлығы 0,4% шақырылмау жиілігімен дұрыс шақырылды)
- Тринуклеотидтердің қайталану ұзақтығы  $\leq 5x$  (5x тринуклеотидті қайталанатын 120 реттелген ампликонның 120-да барлық деп аталатын негіздер 1,9% шақырылмау жиілігімен дұрыс шақырылды)
- 24 немесе одан аз негізгі кірістіру және 25 немесе одан аз негізгі жою
  - 24 негізді кірістірулер 120 үлгінің 120-сында дұрыс шақырылды
  - 25 негізді жою 182 үлгіде дұрыс шақырылды және 184 үлгінің 2 үлгісінде шақыру жоқ деп хабарланды

## 2-зерттеу

Үш сыртқы сынақ алаңында (әр учаскеге екі оператор), бір реагент лотында және қатарынан емес үш сынақ күні бойынша 2-дәлдік зерттеуінде сипатталған өкілді екі гендік талдаудың қайталану мүмкіндігін бағалау үшін сыртқы зерттеу жүргізілді. Сынақ FFPE клиникалық үлгілерінен немесе жасуша сызықтарынан алынған геномдық ДНҚ үлгілерінің алты жақсы сипатталған үлгі панелімен жүргізілді. Әр панель 10 мүшеден, панельдер бойынша барлығы 60 мүшеден тұрды.

60 панель мүшесі төрт ерекше жабайы түрдегі (панельдік мутациялар үшін) үлгілердің көшірмелерінен, жоғары және төмен мутация жиілік деңгейлерінде дайындалған 12 бірегей мутант үлгісінен (бір мутациямен) және екі бірегей мутант үлгісінен (бір мутациямен) тұрды. тек төмен мутация жиілік деңгейінде дайындалған. Әр бірегей үлгі/мутация жиілігі деңгейі үлгісінде (әр жұмыста екі данада сыналған) барлық нәтижелер жарамды болса, 36 ықтимал нәтиже (2 қайталау × 2 оператор × 3 күн × 3 учаске) болды.

Барлық оң және теріс нұсқалар бойынша пайыздық күтілетін шақыру (PEC) әр үлгідегі репрезентативті талдау нәтижесін күтілетін мутация нәтижесімен (күтілетін мутация анықталды немесе анықталмады) салыстыру арқылы бағаланды. PEC күтілетін қоңыраулар санының 100% еселенген әрекетті шақырулар санына бөлінгені ретінде есептеледі. Екі жақты 95% сенімділік интервалы Вилсон ұпайлары әдісімен есептеледі.

Тораптарды біріктіргенде, үлгінің өту жылдамдығы сынаманың бірінші іске қосылуы үшін немесе бірінші өтуде жарамды сынақтан өткен үлгілерде  $\geq 94,7\%$  болды. Барлық мутантты үлгілердегі мутация деңгейіндегі PEC 99,6% (905/909) болды (95% CI; 98,9, 99,8). Барлық жарамды үлгілер үшін барлық 56 панельдік мутациялар бойынша (анықталған мутация күтілгеніне немесе күтілмегеніне қарамастан) шақыру әрекеттерінің саны 58 856 (56 × 1051) болды. Осы 58 856 мутация деңгейіндегі бақылаулардың ішінде бақыланатын және күтілетін нәтижелер сәйкес келмейтін алты оқиға ғана болды. Барлық мутантты және жабайы типті панель мүшелерінің біріктірілген барлық оң және теріс нұсқалары бойынша мутация деңгейіндегі PEC 99,99% (58 850/58 856) құрады.

## Аналитикалық сезімталдық (бос шегі (LoB) және анықтау шегі (LoD))

Бұл зерттеу талдаудың үзілуін тексерді және өкіл панелімен MiSeqDx үшін анықтау шегін (LoD) анықтады. Қысқаша айтқанда, жақсы сипатталған, GM12878 және GM12877 платина геномының жасушалық желілері формалинмен бекітіліп, парафинге ендірілді, содан кейін ДНҚ алынды. GM12878 жетпіс нұсқаның (52 SNV, тоғыз кірістіру және тоғыз жою) нұсқа жиілігі 0,05-ке жақын болатындай GM12877 сұйылтылған. Екі ДНҚ үлгісін екі оператор екі аспап пен екі реагентті пайдаланып, барлығы 10 MiSeqDx секвенирлеу жұмысы үшін сынады. Бұл GM12878 нұсқасындағы әр нұсқа үшін 40 көшірмеге және әр реагент партиясы үшін GM12877 жүйесіндегі әр сәйкес жабайы түрдегі координатқа 60 көшірмеге әкелді. LoB және LoD параметрлік емес опцияны пайдалана отырып, CLSI EP17-A2-де айтылған классикалық тәсіл арқылы есептелді. LoB және LoD берілген нұсқа түрі үшін нұсқа жиіліктерін біріктіру арқылы SNV, кірістіру және жою үшін бөлек есептелді. I типті қате 0,01, ал II типті қате 0,05 деп анықталды.

LoB үшін біріктірілген нұсқа жиіліктері ең төменнен ең жоғарыға қарай сұрыпталды және әр нұсқа түрі үшін әрбір реагент топтамасының 99-шы позициясы есептелді (20-кесте). MiSeqDx бағдарламалық құралы нұсқаларды сапалы анықтауды анықтау үшін 0,026 нұсқа жиілігінің кесіндісін (тиімді LoB) пайдаланады. Бланкілердің есептелген шектері бұл кесу 0,01-ден аспайтын I типті қатеге әкелетінін растады.

20-кесте Бос орын шегі

Вариант түрі	Варианттық жиіліктердің жалпы саны	LoB реагенті Лот 1 (%)	LoB реагент 2 лот (%)
SNV	3120	0,87	0,75
Кірістіру	540	0,79	0,60
Жою	540	0,96	0,84

LoD үшін 0,026 шекті мәннен төмен түсетін әр нұсқа түрі үшін әр реагент партиясы үшін жеке мутация жиілігінің пайызы есептелді **21-кесте**. Пайыздар II типті қатеден 5% (0,05) аз болғандықтан, біріктірілген нұсқа жиіліктерінің медианасы LoD **21-кесте** ретінде есептелді. Әр нұсқа түрі үшін LoD екі реагент лоттары үшін есептелген екі мәннің үлкені ретінде қабылданды: SNV үшін 5,45%, кірістіру үшін 4,88% және жоюлар үшін 5,44%.

21-кесте Анықтау шегі

Реагент лот	Вариант түрі	Варианттық жиіліктердің жалпы саны	VF өлшемдерінің саны < 2,6%	VF өлшемдерінің % < 2,6%	Анықтау шегі (%)
1	SNV	2080	4	0,20	5,45
	Кірістіру	360	0	0,00	4,86
	Жою	360	2	0,60	5,44
2	SNV	2080	26	1,30	5,44
	Кірістіру	360	0	0,00	4,88
	Жою	360	0	0,00	5,24

Келесі зерттеулер екі клиникалық маңызды қатерлі ісік геніндегі 56 мутацияға бағытталған басқа репрезентативті талдаумен MiSeqDx өнімділік сипаттамаларын көрсетеді (Мутация панелі). Мутация панелі екі клиникалық маңызды қатерлі ісік генінің (1-ген және 2-ген) 56 мутациясын арнайы анықтауға арналған. Талдау бір уақытта әр реттелген үлгідегі 56 мутацияның әрқайсысының болуын немесе болмауын анықтайды. Бұл зерттеулердің анықтамалық әдісі екі бағытты Сангер секвенциясы болды.

## Лоттан лотқа дейінгі дәлдік

Үлгі квалификациясының талаптарына сәйкес келетін бес аралас FFPE үлгісінен тұратын панельді пайдалана отырып, екі гендік репрезентативті талдауды пайдалана отырып, өндірілген реагенттер жинағы лоттары бойынша (үлгі квалификациясы, кітапхананы дайындау және реттілік реагенттерінен тұратын) MiSeqDx құралының өнімділігін бағалау үшін көп лот бойынша

дәлдік зерттеу жүргізілді. Әр FFPE үлгісі екі бірегей мутацияны қамтыды: біреуі мутация жиілігінің төменгі деңгейінде (шамамен 8%) және біреуі жоғары (шамамен 14%) мутация жиілігі деңгейінде. Бес үлгі қоспасының әрқайсысының он екі (12) бақылауы үш реагент жинағының лоттарымен қатарынан емес үш күнде жиналды. Барлық реагент лоттары бойынша зерттеуге арналған бақылаулардың жалпы саны барлық үлгі қоспалары бойынша 180 бақылау және барлық мутация жиілік деңгейлері бойынша 360 бақылау болды. Барлық лоттар мен күндер бойынша бақылаулардың 99,7% (359/360) күтілетін мутация нәтижесін көрсетті. Бір төмен жиілікті мутация жабайы тип деп қате аталды. Жүйенің өзгермелілігін бағалау үшін мутациялар/мутация жиілігі деңгейлерінің әрқайсысы үшін дисперсия компонент талдау жүргізілді. Жалпы стандартты ауытқу 0,011-0,029 аралығында болды. Жалпы стандартты ауытқудың реагент лотының құрамдас бөлігі 0-ден 0,015-ке дейін ауытқиды.

## Редакция журналы

# құжат	Күн	Өзгерістің сипаттамасы
Құжат № 200006218 v02	Қазан 2023	4-нұсқа үшін Local Run Manager бағдарламасына жаңартылған сілтемелер. Аустралиялық демеуші мәліметтерді қосу үшін таңбалау жаңартылды. Қаптаманың MiSeqDx үшін Құралды тексеруді зерттеу есебінен айырмашылығы бар түзетілген сәйкессіздіктер.
Құжат № 200006218 v01	2022 жылдың мамыры	Қосылған MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro Package CN кірістіру қамтамасыз етілген жабдық пен материалдарға, қажет емес. Өнімділік сипаттамаларына MiSeqDx Reagent Kit v3 Micro үшін сынақ ақпараты қосылды. Ескертулер мен сақтық шараларынан АҚШ-қа тән ескерту жазбасы жойылды.
Құжат № 200006218 v00	Қараша 2021	MOS v4.0 және Local Run Manager v3.0 қолдауы үшін бастапқы шығарылым.

## Патенттер және сауда белгілері

Бұл құжат және оның контентіне Illumina, Inc. мен оның еншілес компанияларына ("Illumina") меншігі болып табылады және тек осы құжатта сипатталған өнімді(лерді) пайдалануға байланысты оның тұтынушысының келісімшарт бойынша пайдалануына арналған. Бұл құжат және оның контенті Illumina компаниясының алдын ала жазбаша келісімінсіз кез келген басқа мақсатта пайдаланылмауы немесе таратылмауы және/немесе басқа жолмен хабарланбауы, жарияланбауы немесе қайта шығарылуы мүмкін емес. Illumina компаниясы өзінің патенті, сауда белгісі, авторлық құқығы немесе жалпы заңды құқықтары бойынша ешқандай лицензияны немесе осы құжат арқылы кез келген үшінші тараптардың ұқсас құқықтарын бермейді.

Осы құжатта сипатталған өнімді(лерді) дұрыс және қауіпсіз пайдалануды қамтамасыз ету үшін осы құжаттағы нұсқауларды білікті және тиісті түрде оқытылған қызметкерлер қатаң және нақты орындауы керек. Осы құжаттың барлық контенті осындай өнім(дер)ді пайдаланбас бұрын толық оқып, түсіну керек.

ОСЫНДАҒЫ НҮСҚАУЛЫҚТАРДЫ ТОЛЫҚ ОҚЫМАЙДЫ ЖӘНЕ АЙҚЫН САҚТАМАУ ӨНІМДЕРДІҢ (БҰЙЫМДАРҒА) БҰЙЫМДАРҒА, АДАМДАРҒА, ҚОСЫ МЕН ПАЙДАЛАНУШЫЛАРҒА НЕМЕСЕ БАСҚА АДАМДАРҒА ЖӘНЕ БАСҚА МӘЛІМЕТТЕРДІҢ ЖАРАҚАЛУЫНА, НӘТИЖЕСІНДЕГІ МҮМКІН. ӨНІМГЕ КАБЕЛІ(S).

ILLUMINA ОСЫНДА СИПАТТАЛҒАН ӨНІМДЕРДІ (ОНЫҢ БӨЛІКТЕРІН НЕМЕСЕ БАҒДАРЛАМАЛЫҚ ҚҰРАЛДЫ ҚОСА) ОРЫНСЫЗ ПАЙДАЛАНУДАН ТУЫНДАЙТЫН КЕЗ КЕЛГЕН ЖАУАПКЕРШІЛІКТІ ҚАБЫЛДАМАЙДЫ.

© 2023 Illumina, Inc. Барлық құқығы қорғалған.

Барлық сауда белгілері Illumina, Inc. немесе олардың тиісті иелерінің меншігі болып табылады. Арнайы сауда белгісі туралы ақпаратты [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html) бетінен қараңыз.



## Байланыс ақпараты



Illumina, Inc.  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122 U.S.A.  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (Солтүстік Америкадан тыс)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



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

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

## Өнімді таңбалау

Өнімнің қаптамасында және таңбалауында көрсетілетін таңбалардың толық анықтамасын алу үшін жинағыңыздың *Documentation* (Құжаттама) қойындысындағы [support.illumina.com](http://support.illumina.com) сайтындағы таңба пернесін қараңыз.