

## Trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx

### Instructions pour la création du fichier de manifeste

#### DESTINÉ AU DIAGNOSTIC IN VITRO UNIQUEMENT

La trousse d'amplicons personnalisés TruSeq<sup>MC</sup> Dx permet à un pool d'oligonucléotides personnalisé de cibler des régions prédéfinies du génome en vue du séquençage. Le fichier de manifeste est utilisé au cours de l'analyse pour guider l'alignement des lectures de séquence aux régions ciblées, plutôt qu'au génome entier.

Les régions ciblées spécifiques pour le pool d'oligonucléotides personnalisé sont résumées dans le fichier de manifeste. Le fichier de manifeste précise les séquences d'amplicons et de primers des régions génomiques ciblées par le pool d'oligonucléotides personnalisé.

Bien que chacune des bibliothèques préparées (une bibliothèque est appariée à une réaction) doit être associée à un seul fichier de manifeste, les différentes bibliothèques séquencées lors d'une seule analyse peuvent utiliser différents fichiers de manifeste.

Dans le cas du flux de travail germinale, chaque échantillon requiert un pool d'oligonucléotides personnalisé pour assurer la couverture complète des régions ciblées; par conséquent, une bibliothèque est créée pour chaque échantillon, ce qui correspond à un fichier de manifeste.

Dans le cas du flux de travail somatique, chaque échantillon requiert deux pools d'oligonucléotides personnalisés distincts pour assurer une couverture complète : un pool d'oligonucléotides « A » conçu avec des amplicons pour un brin (p. ex., brin positif ou pool sens) et un pool d'oligonucléotides personnalisé complémentaire « B » conçu pour l'autre brin (p. ex., brin négatif ou pool antisens). Par conséquent, deux bibliothèques sont créées pour chaque échantillon, chacune ayant un fichier de manifeste unique.

#### Création du fichier de manifeste

Vous pouvez créer manuellement le fichier de manifeste en téléchargeant le modèle de fichier de manifeste. Ce modèle peut être ouvert dans Excel. Il doit toutefois être enregistré comme un fichier \*.txt séparé par des tabulations.

Le fichier de manifeste comporte trois sections : [Header] (En-tête), [Probes] (Sondes) et [Targets] (Cibles). La section Header (En-tête) est facultative et peut contenir notamment le nom du technicien réalisant le test, le nom de l'expérience, etc. Si une section Header (En-tête) est créée, placez-la avant la section Probes (Sondes). Les sections Probes (Sondes) et Targets (Cibles) sont obligatoires et sont utilisées au cours de l'analyse des données.

Les tableaux qui suivent décrivent les sections obligatoires. Reportez-vous au modèle du fichier de manifeste pour voir la mise en page.

#### Description des colonnes de la section [Probes] (Sondes)

Colonne	Description
<b>Target ID (Identifiant de la cible)</b>	Un identifiant unique utilisé pour afficher le nom de l'amplicon, qui est formé de chiffres et de lettres. Il ne doit pas contenir d'espaces ni de symboles.
<b>Chromosome</b>	Le chromosome de l'amplicon, par exemple chr1, chr2 ou chrX. Il doit correspondre au génome de référence hg19.
<b>Start Position (Position de départ)</b>	Les coordonnées génomiques de la position de départ de l'amplicon, à l'exception de la séquence correspondant aux sondes.
<b>End position (Position finale)</b>	Les coordonnées génomiques de la position finale de l'amplicon, à l'exception de la séquence correspondant aux sondes.
<b>ULSO Sequence (Séquence des oligos locus spécifiques en amont)</b>	La séquence du primer en amont utilisé pour générer l'amplicon, aussi appelée « Custom Probe 1 » (Sonde personnalisée 1) dans la notice d'accompagnement de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx.
<b>DLSO Sequence (Séquence des oligos locus spécifiques en aval)</b>	La séquence du primer en aval utilisé pour générer l'amplicon, aussi appelée « Custom Probe 2 » (Sonde personnalisée 2) dans la notice d'accompagnement de la trousse d'amplicons personnalisés TruSeq Dx.

## Description des colonnes de la section [Targets] (Cibles)

Colonne de la section Targets (Cible)	Description
Target A (Cible A)	Même texte que celui de la colonne Target ID (Identifiant de la cible) pour l'amplicon indiqué dans la section [Probes] (Sondes).
Target B (Cible B)	Même texte que celui de la colonne Target ID (Identifiant de la cible) pour l'amplicon indiqué dans la section [Probes] (Sondes); les colonnes Target A (Cible A) et Target B (Cible B) sont les mêmes.
Target Number (Numéro de la cible)	Le numéro 1; la région cible pour une paire de sondes est associée à l'index 1 et est étiquetée TargetID.1 dans les données. Toutes les séquences hors cibles sont associées aux index 2, 3, etc., et sont étiquetées TargetID.2 et TargetID.3.
Chromosome	Le chromosome de l'amplicon, par exemple chr1, chr2 ou chrX. Il doit correspondre au génome de référence.
Start Position (Position de départ)	Les coordonnées génomiques de la position de départ de l'amplicon, y compris la séquence correspondant aux sondes.
End position (Position finale)	Les coordonnées génomiques de la position finale de l'amplicon, y compris la séquence correspondant aux sondes.
Probe Strand (Brin de sonde)	Entrez le symbole « + » ou « - » pour indiquer le brin de l'amplicon.
Sequence (Séquence)	Séquence de la région se trouvant entre les oligos locus spécifiques en amont (ULSO) et les oligos locus spécifiques en aval (DLSO). Si le brin de la sonde correspond au symbole « + », la région de séquençage est celle du brin sens. Si le brin de la sonde correspond au symbole « - », la région de séquençage provient du brin antisens.

## Vérification de la conception des fichiers de manifeste et du pool d'oligonucléotides

Avant d'utiliser votre fichier de manifeste et de commencer une analyse de séquençage, comparez le nombre total

d'amplicons dans votre pool d'oligonucléotides au nombre précisé dans le fichier de manifeste. Assurez-vous qu'il ne manque aucun amplicon.

Les résultats finaux de l'analyse secondaire se trouvent dans des fichiers \*.vcf et les autres fichiers d'analyse se trouvent dans le dossier d'analyses de votre analyse de séquençage. Les données de l'analyse sont enregistrées à l'emplacement réseau que vous avez précisé dans le logiciel d'exploitation de l'instrument de séquençage. Les rapports d'analyse et les fichiers de sortie se trouvent dans le dossier Alignment (Alignement). Pour obtenir toutes les précisions utiles sur ces fichiers, consultez les guides des modules d'analyse des variants somatiques et germinaux.

Lorsque vous optimisez votre test, reportez-vous aux fichiers de sortie portant sur la couverture pour effectuer une vérification rapide de vos données. Les régions ayant une couverture faible ou nulle peuvent indiquer un problème lié au fichier de manifeste. Par exemple, les coordonnées dans le fichier de manifeste pourraient ne pas refléter les régions génomiques ciblées par le pool d'oligonucléotides. À l'inverse, les régions ayant une couverture anormalement élevée peuvent indiquer un problème différent avec le pool d'oligonucléotides, comme des gènes homologues ou une fixation croisée, qui peuvent orienter une nouvelle conception ou une optimisation du pool.

Assurez-vous que les amplicons sur le même brin ne se chevauchent pas. Les amplicons se chevauchant, comme ceux qui sont utilisés pour recouvrir une région, doivent se trouver sur des brins différents pour prévenir les phénomènes d'amplification accidentelle.

Finalement, assurez-vous que le fichier de manifeste est un fichier \*.txt séparé par des tabulations.

## Sauvegarde des fichiers de manifeste et accès aux fichiers

Le fichier de manifeste est requis pour configurer une analyse avec le logiciel Local Run Manager. Après la création du fichier de manifeste, enregistrez le fichier \*.txt séparé par des tabulations dans un emplacement accessible aux fins du téléversement.

Avant le début de l'analyse de séquençage, le fichier de manifeste peut être enregistré dans les paramètres du module d'analyse des variants germinaux ou somatiques de Local Run Manager. Au cours de la création de l'analyse, les fichiers de manifeste enregistrés sont accessibles par le menu déroulant Manifest (Manifeste). Les fichiers de manifeste peuvent aussi être importés pour une analyse donnée lors de la saisie des renseignements sur l'analyse. Pour plus de renseignements, veuillez consulter le guide de référence de votre analyseur de séquence d'ADN à débit élevé.

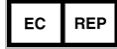
## Droit d'auteur et marques de commerce

© 2017 Illumina, Inc. Tous droits réservés. Illumina, TruSeq et la conception de bases en flux sont des marques de commerce déposées ou en cours de dépôt d'Illumina, Inc. ou de ses sociétés affiliées aux États-Unis ou dans d'autres pays. Tous les autres noms, logos et marques de commerce sont la propriété de leurs détenteurs respectifs.

## Coordonnées



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, Californie 92122  
États-Unis  
+(1) 800 809-ILMN (4566)  
+(1) 858 202-4566 (en dehors de  
l'Amérique du Nord)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



Illumina Cambridge Limited  
Chesterford Research Park,  
Little Chesterford  
Saffron Walden, CB10 1XL  
ROYAUME-UNI



Commanditaire  
australien :  
Illumina Australia  
1 International  
Court  
Scoresby,  
Victoria, 3179  
Australie