

## TruSeq Custom Amplicon Kit Dx

### Istruzioni per il file manifest

#### PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO

TruSeq Custom Amplicon™ Kit Dx consente di utilizzare un raggruppamento in pool di oligonucleotidi personalizzati, per analizzare regioni pre-definite e specifiche del genoma per il sequenziamento. Il file manifest viene utilizzato durante l'analisi per guidare l'allineamento delle letture della sequenza sulle regioni target, piuttosto che sull'intero genoma.

Le regioni target specificate per un determinato raggruppamento in pool di oligonucleotidi personalizzato sono riepilogate nel file manifest. Il file manifest specifica le sequenze dell'amplicone e del primer delle regioni genomiche analizzate dal raggruppamento in pool di oligonucleotidi personalizzato.

Sebbene ciascuna libreria preparata (una libreria corrisponde a una reazione) debba essere associata a un singolo file manifest, diverse librerie sequenziate in una singola corsa possono utilizzare diversi file manifest.

Per il flusso di lavoro Germline, ogni campione richiede un raggruppamento in pool di oligonucleotidi personalizzato per ottenere una copertura completa delle regioni target; pertanto viene creata una libreria per campione, che corrisponde a un file manifest.

Per il flusso di lavoro Somatic, ogni campione richiede due diversi raggruppamenti in pool di oligonucleotidi personalizzati per ottenere una copertura completa: un raggruppamento in pool "A" progettato con gli ampliconi per un filamento (ad es., filamento plus o raggruppamento in pool forward) e un raggruppamento in pool di oligonucleotidi personalizzato accessorio "B" progettato per l'altro filamento (ad es., filamento minus o raggruppamento in pool reverse). Quindi, le due librerie vengono create per campione, ciascuna con un file manifest univoco.

#### Creazione di un file manifest

Un file manifest può essere creato manualmente utilizzando Manifest Template (Modello di file manifest). Il modello di file manifest può essere aperto in Excel; tuttavia dovrebbe essere salvato come file \*.txt delimitato da tabulazione.

Il modello di file manifest presenta tre sezioni: [Header] (Intestazione), [Probes] (Sonde) e [Targets] (Target). La sezione Header (Intestazione) è facoltativa e può contenere informazioni quali nome del tecnico che sta eseguendo il saggio, nome dell'esperimento ecc.. Se la sezione Header (Intestazione) viene utilizzata, posizionarla di fronte alla sezione Probes (Sonde). Le sezioni Probes (Sonde) e Targets (Target) sono obbligatorie e sono utilizzate durante l'analisi dei dati.

Quanto segue sono le descrizioni delle colonne per le sezioni obbligatorie. Per il layout, vedere Manifest Template (Modello di file manifest).

#### Descrizioni della colonna [Probes] (Sonde)

Colonna Probes (Sonde)	Descrizione
<b>Target ID (ID del target)</b>	Un identificatore univoco utilizzato per il nome dell'amplicone visualizzato ed è costituito da numeri e lettere. Non deve contenere spazi o simboli.
<b>Chromosome (Cromosoma)</b>	Il cromosoma dell'amplicone, ad esempio crom1, crom2 o cromX. Deve corrispondere al genoma di riferimento hg19.
<b>Start Position (Posizione di avvio)</b>	La coordinata genomica della posizione di avvio dell'amplicone, esclusa la sequenza corrispondente alle sonde.
<b>End Position (Posizione finale)</b>	La coordinata genomica della posizione finale dell'amplicone, esclusa la sequenza corrispondente alle sonde.
<b>ULSO Sequence (Sequenza ULSO)</b>	La sequenza del primer a monte utilizzata per generare l'amplicone, chiamata anche "Custom Probe 1" (Sonda personalizzata 1) nell'insero della confezione di TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.
<b>DLSO Sequence (Sequenza DLSO)</b>	La sequenza del primer a valle utilizzata per generare l'amplicone, chiamata anche "Custom Probe 2" (Sonda personalizzata 2) nell'insero della confezione di TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

## Descrizioni della colonna [Targets] (Target)

Colonna Targets (Target)	Descrizione
Target A (Target A)	Lo stesso testo dell'ID del target per l'amplicone elencato in [Probes] (Sonde).
Target B (Target B)	Lo stesso testo dell'ID del target per l'amplicone elencato in [Probes] (Sonde), Target A e Target B sono i medesimi.
Target Number (Numero target)	Il numero 1; la regione target per una coppia di sonde presenta l'indice 1 e nei dati è denominata TargetID.1. Eventuali sequenze che non rientrano nel target presentano gli indici di 2, 3, ecc. e sono denominate TargetID.2 e TargetID.3.
Chromosome (Cromosoma)	Il cromosoma dell'amplicone, ad esempio crom1, crom2 o cromX. Deve corrispondere al genoma di riferimento.
Start Position (Posizione di avvio)	La coordinata genomica della posizione di avvio dell'amplicone, inclusa la sequenza corrispondente alle sonde.
End Position (Posizione finale)	La coordinata genomica della posizione finale dell'amplicone, inclusa la sequenza corrispondente alle sonde.
Probe Strand (Filamento sonda)	Immettere + o - per indicare il filamento dell'amplicone.
Sequence (Sequenza)	La sequenza della regione tra ULSO/DLSO. Se il filamento della sonda è +, la regione di sequenziamento appartiene al filamento forward. Se il filamento della sonda è -, la regione di sequenziamento appartiene al filamento reverse.

## Verifica dei file manifest e della progettazione del raggruppamento in pool di oligonucleotidi

Prima di utilizzare il file manifest e avviare una corsa di sequenziamento, confrontare il numero totale di ampliconi nel raggruppamento in pool di oligonucleotidi con il numero specificato nel file manifest. Assicurarsi che siano presenti tutti gli ampliconi.

I risultati finali dell'analisi secondaria si trovano nei file \*.vcf e in altri file di analisi nella cartella della corsa per la corsa di sequenziamento. I dati ottenuti dalla corsa sono salvati nella posizione di rete specificata nel software operativo dello strumento di sequenziamento. I report dell'analisi e i file

di output dell'analisi si trovano nella cartella Alignment (Allineamento). Per maggiori dettagli su questi file, vedere le guide dei moduli Germline Variant o Somatic Variant.

Quando si ottimizza il saggio, fare riferimento ai file di output della copertura per verificare velocemente i dati. Le regioni che presentano una copertura bassa o pari a zero possono indicare un problema con il file manifest. Ad esempio, le coordinate nel file manifest potrebbero non riflettere le regioni genomiche interrogate dal raggruppamento in pool di oligonucleotidi. Oppure, le regioni che presentano una copertura elevata non prevista possono indicare un problema diverso con il raggruppamento in pool di oligonucleotidi, come geni omologhi o legame incrociato, che può portare a una nuova progettazione e ottimizzazione del raggruppamento in pool.

Assicurarsi che gli ampliconi sullo stesso filamento non siano sovrapposti. Gli ampliconi sovrapposti, come quelli utilizzati per analizzare una regione sulle tile, devono essere su filamenti diversi per impedire eventi di amplificazione accidentale.

Infine, assicurarsi che il file manifest sia un file \*.txt nel formato delimitato da tabulazione.

## Archiviazione e accesso al file manifest

Il file manifest è richiesto per impostare una corsa con il software Local Run Manager. Al termine della creazione del file manifest, salvare il file \*.txt delimitato da tabulazione in una posizione disponibile per il caricamento.

Prima di avviare la corsa di sequenziamento, il file manifest deve essere salvato nelle impostazioni del modulo nei moduli di analisi Germline Variant o Somatic Variant di Local Run Manager. Durante la creazione della corsa, i file manifest salvati sono accessibili dall'elenco a discesa Manifest (File manifest). I file manifest possono inoltre essere importati per una determinata corsa al momento dell'immissione delle informazioni della corsa. Per maggiori informazioni, vedere la guida di consultazione dello strumento relativa all'analizzatore di sequenze di DNA a elevata processività.

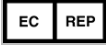
## Copyright e marchi di fabbrica

© 2017 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Illumina, TruSeq e la grafica del fluire delle basi sono marchi di fabbrica registrati o in attesa di brevetto di Illumina, Inc. e/o delle sue affiliate negli Stati Uniti e/o in altri paesi. Tutti gli altri nomi, loghi e altri marchi di fabbrica sono di proprietà dei rispettivi titolari.

## Informazioni di contatto



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122  
U.S.A.  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (fuori dal  
Nord America)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com



Illumina Cambridge Limited  
Chesterford Research Park, Little  
Chesterford  
Saffron Walden, CB10 1XL  
REGNO UNITO



Sponsor  
Australiano:  
Illumina  
Australia  
1 International  
Court  
Scoresby,  
Victoria, 3179  
Australia