

Manifestdatei-Anleitung

FÜR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Das TruSeq Custom Amplicon™ Kit Dx ermöglicht es, mit einem anwendungsspezifischen Oligonukleotid-Pool spezifische, vordefinierte Genombereiche für die Sequenzierung anzuvisieren. Die Manifestdatei steuert während der Analyse das Alignment der Sequenz-Reads, sodass diese an den Zielregionen und nicht am gesamten Genom ausgerichtet werden.

Die spezifischen Zielregionen für einen bestimmten anwendungsspezifischen Oligonukleotid-Pool werden in der Manifestdatei aufgeführt. Das Manifest gibt die Amplikon- und Primer-Sequenzen der genomischen Regionen an, auf die der anwendungsspezifische Oligonukleotid-Pool abzielt.

Jeder vorbereiteten Bibliothek (eine Bibliothek entspricht einer Reaktion) muss zwar ein entsprechendes Manifest zugeordnet werden, verschiedene Bibliotheken eines Sequenzierungslaufs können aber unterschiedliche Manifeste verwenden.

Für den Workflow für Keimbahn-Varianten ist zur vollständigen Abdeckung der Zielregionen für jede Probe ein Oligonukleotid-Pool erforderlich. Daher wird pro Probe eine Bibliothek generiert und jeweils einem Manifest zugeordnet.

Der Workflow für somatische Varianten benötigt zum Erreichen einer vollständigen Abdeckung zwei unterschiedliche anwendungsspezifische Oligonukleotid-Pools je Probe: Oligonukleotid-Pool „A“, der auf die Amplikons eines Strangs (z. B. Plus-Strang oder Vorwärts-Pool) ausgelegt ist, und einen komplementären anwendungsspezifischen Oligonukleotid-Pool „B“, der auf den anderen Strang (z. B. Minus-Strang oder Rückwärts-Pool) abzielt. Daher werden für jede Probe zwei Bibliotheken mit jeweils einem eindeutigen Manifest generiert.

Erstellen einer Manifestdatei

Manifestdateien können mithilfe der Manifestvorlage, die heruntergeladen werden kann, manuell erstellt werden. Sie können die Manifestvorlage mit Excel öffnen. Speichern Sie sie jedoch anschließend als tabulatorgetrennte Textdatei (*.txt).

Manifestdateien bestehen aus drei Bereichen: [Header] (Dateivorspann), [Probes] (Sonden) und [Targets]. Der Dateivorspann ist optional und enthält Informationen wie den Namen des Technikers, der den Assay ausführt, den Namen des Versuchs usw. Wenn Sie den Dateivorspann verwenden, muss dieser vor dem Bereich „Probes“ (Sonden)

stehen. Die Dateibereiche „Probes“ (Sonden) und „Targets“ sind obligatorisch und werden während der Datenanalyse verwendet.

Im Folgenden finden Sie eine Beschreibung der Spalten der obligatorischen Dateibereiche. Das Dateilayout können Sie der Manifestvorlage entnehmen.

[Probes] (Sonden) – Spaltenbeschreibungen

Spalte des Bereichs „Probes“ (Sonden)	Beschreibung
Target ID (Target-ID)	Ein eindeutiger Bezeichner aus Zahlen und Buchstaben, der als Anzeigename des Amplikons verwendet wird. Darf keine Leerzeichen oder Symbole enthalten.
Chromosom	Das Chromosom des Amplikons, z. B. Chr1, Chr2 oder ChrX. Es muss dem Referenzgenom hg19 entsprechen.
Start Position (Startposition)	Genomische Koordinate der Startposition des Amplikons, mit Ausnahme der Sequenz, die den Sonden entspricht.
End Position (Endposition)	Genomische Koordinate der Endposition des Amplikons, mit Ausnahme der Sequenz, die den Sonden entspricht.
ULSO-Sequenz	Sequenz des stromaufwärts gelegenen Primers für die Generierung des Amplikons. In der Packungsbeilage für das TruSeq Custom Amplicon Kit Dx wird diese Sequenz auch als „Custom Probe 1“ (anwendungsspezifische Sonde 1) bezeichnet.
DLSO-Sequenz	Sequenz des stromabwärts gelegenen Primers für die Generierung des Amplikons. In der Packungsbeilage für das TruSeq Custom Amplicon Kit Dx wird diese Sequenz auch als „Custom Probe 2“ (anwendungsspezifische Sonde 2) bezeichnet.

[Targets] – Spaltenbeschreibungen

Spalte des Bereichs „Targets“	Beschreibung
Target A	Entspricht der Beschreibung für die Target-ID des im Bereich [Probes] (Sonden) aufgelisteten Amplikons.
Target B	Entspricht der Beschreibung für die Target-ID des im Bereich [Probes] (Sonden) aufgelisteten Amplikons. Target A und Target B sind identisch.
Target Number (Target-Nummer)	Die Zahl 1. Der Target-Bereich eines Sondenpaars hat den Index 1 und wird in den Daten mit „TargetID.1“ bezeichnet. Off-Target-Sequenzen haben die Indizes 2, 3 usw. und die Bezeichnung „TargetID.2“ und „TargetID.3“.
Chromosom	Das Chromosom des Amplikons, z. B. Chr1, Chr2 oder ChrX. Es muss dem Referenzgenom entsprechen.
Start Position (Startposition)	Genomische Koordinate der Startposition des Amplikons, einschließlich der Sequenz, die den Sonden entspricht.
End Position (Endposition)	Genomische Koordinate der Endposition des Amplikons, einschließlich der Sequenz, die den Sonden entspricht.
Probe Strand (Sondenstrang)	Geben Sie „+“ oder „-“ ein, um den Amplikonstrang anzugeben.
Sequence (Sequenz)	Sequenzbereich zwischen den UL50/DLSO. Ein Plus-Sondenstrang (+) gibt den Sequenzbereich des Vorwärts-Strangs an. Ein Minus-Sondenstrang (-) gibt den Sequenzbereich des Rückwärts-Strangs an.

Prüfen des Manifest- und Oligonukleotid-Pool-Designs

Bevor Sie Ihr Manifest verwenden und einen Sequenzierungslauf starten, vergleichen Sie die Gesamtzahl der Amplikons in Ihrem Oligonukleotid-Pool mit der im Manifest angegebenen Anzahl. Vergewissern Sie sich, dass keine Amplikons fehlen.

Die endgültigen Ergebnisse der Sekundäranalyse finden Sie in den Varianten-Call-Dateien (*.vcf) und den anderen Analysedateien im Laufordner Ihres Sequenzierungslaufs. Die Daten des Laufs werden an dem Netzwerkspeicherort

gespeichert, den Sie in der Betriebssoftware des Sequenzierungsgeräts angegeben haben. Die Analyseberichte und -ausgabedateien befinden sich im Alignment-Ordner. Weitere Informationen zu diesen Dateien finden Sie in den Handbüchern für das Modul für Keimbahn-Varianten bzw. das Modul für somatische Varianten.

Wenn Sie Ihren Assay optimieren, können Sie Ihre Daten mithilfe der Ausgabedateien mit den Abdeckungsergebnissen schnell überprüfen. Regionen mit geringer oder ohne Abdeckung können auf ein Problem mit der Manifestdatei hindeuten. Die Koordinaten in der Manifestdatei spiegeln z. B. möglicherweise nicht die genomischen Regionen wider, auf die der Oligonukleotid-Pool abzielt. Regionen mit unerwartet hoher Abdeckung können hingegen auf ein Problem bezüglich des Oligonukleotid-Pools hinweisen, wie z. B. homologe Gene oder Cross-Binding, was wiederum das Neudesign und die Optimierung des Pools beeinflusst.

Stellen Sie sicher, dass Amplikons, die auf demselben Strang liegen, nicht überlappen. Überlappende Amplikons, die z. B. zum Aufteilen einer Region in Platten verwendet werden, müssen sich auf verschiedenen Strängen befinden, um unbeabsichtigte Amplifikationsereignisse zu verhindern.

Prüfen Sie abschließend, ob die Manifestdatei eine tabulatorgetrennte Textdatei (*.txt) ist.

Speichern von und Zugreifen auf Manifestdateien

Manifestdateien werden für die Konfiguration eines Laufs mit der Local Run Manager-Software benötigt. Nachdem Sie die Manifestdatei erstellt haben, speichern Sie die tabulatorgetrennte Textdatei (*.txt) an einem zum Hochladen von Dateien verfügbaren Speicherort.

Vor dem Starten des Sequenzierungslaufs kann das Manifest in den Moduleinstellungen des Local Run Manager-Analysenmoduls für Keimbahn- bzw. für somatische Varianten gespeichert werden. Beim Erstellen eines Laufs sind gespeicherte Manifeste über die Dropdown-Liste „Manifest“ zugänglich. Sie können Manifeste auch für einen bestimmten Lauf importieren, wenn Sie die Laufinformationen eingeben. Weitere Informationen finden Sie im Referenzhandbuch zu Ihrem Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierungsgerät.

Urheberrecht und Marken

© 2017 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Illumina, TruSeq und das Streaming-Basen-Design sind registrierte oder angemeldete Marken von Illumina, Inc. und/oder ihren Partner-/Tochtergesellschaften in den USA und/oder anderen Ländern. Alle anderen Namen, Logos und Marken sind Eigentum der jeweiligen Eigentümer.

Kontaktinformationen



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



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



Australischer Sponsor:
Illumina Australia
1 International Court
Scoresby, Victoria,
3179
Australien