

Kit de amplicones personalizados TruSeq Dx

Instrucciones del archivo de manifiesto

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

El kit de amplicones personalizados TruSeq Dx permite realizar una secuenciación selectiva estableciendo regiones predefinidas y concretas del genoma como objetivo de un grupo de oligonucleótidos personalizados. El manifiesto se utiliza durante el análisis para orientar la alineación de las lecturas de secuencia con las regiones objetivo, en lugar de con todo el genoma.

Las regiones objetivo específicas de un grupo de oligonucleótidos personalizados concretos se resumen en el archivo de manifiesto. El manifiesto especifica las secuencias del amplicón y el cebador de las regiones genómicas objetivo del grupo de oligonucleótidos personalizados.

Aunque todas las bibliotecas preparadas (una biblioteca equivale a una reacción) se deben asociar a un solo manifiesto, las distintas bibliotecas secuenciadas en un solo experimento pueden utilizar manifiestos diferentes.

En el flujo de trabajo de la línea germinal, para cada muestra hace falta un solo grupo de oligonucleótidos personalizados para obtener una cobertura completa de las regiones objetivo. Por lo tanto, se crea una sola biblioteca por cada muestra, que se corresponde a su vez con un solo manifiesto.

En el flujo de trabajo somático, para cada muestra hacen falta dos grupos de oligonucleótidos personalizados distintos para obtener una cobertura completa: un grupo de oligonucleótidos "A" diseñado con amplicones para una sola cadena (p. ej.: la cadena positiva o el grupo directo) y un grupo de oligonucleótidos personalizados complementario "B" diseñado para la otra cadena (p. ej.: la cadena negativa o el grupo inverso). Por lo tanto, por cada muestra se crean dos bibliotecas, cada una de ellas con un manifiesto exclusivo.

Creación de un archivo de manifiesto

Se puede crear manualmente un archivo de manifiesto usando la plantilla de manifiesto descargada. La plantilla de manifiesto se puede abrir con Excel. No obstante, se debe guardar como archivo *.txt delimitado por tabulaciones.

El manifiesto presenta tres secciones: [Header] (Encabezado), [Probes] (Sondas) y [Targets] (Objetivos). La sección Header (Encabezado) es opcional y puede contener información como, por ejemplo, el nombre del técnico que realiza el ensayo, el nombre del experimento, etc. Si se utiliza una sección Header (Encabezado), esta

debe ubicarse delante de la sección Probes (Sondas). Las secciones Probes (Sondas) y Targets (Objetivos) son obligatorias y se utilizan durante el análisis de datos.

A continuación, se muestran las descripciones de la columna de las secciones obligatorias. Consulte la plantilla del manifiesto para ver la disposición.

Descripciones de la columna [Probes] (Sondas)

Columna Probes (Sondas)	Descripción
Target ID (ID de objetivo)	Un identificador exclusivo, compuesto de números y letras, que se utiliza como el nombre con el que se mostrará el amplicón. No puede contener espacios ni símbolos.
Chromosome (Cromosoma)	El cromosoma del amplicón (por ejemplo, chr1, chr2 o chrX). Debe coincidir con el genoma de referencia hg19.
Start Position (Posición de inicio)	Coordenadas genómicas de la posición de inicio del amplicón, excepto la secuencia que coincide con las sondas.
End Position (Posición final)	Coordenadas genómicas de la posición final del amplicón, excepto la secuencia que coincide con las sondas.
ULSO Sequence (Secuencia de oligonucleótidos ascendentes de locus específico)	Secuencia del cebador ascendente empleado para generar el amplicón, también llamado "Custom Probe 1" (Sonda personalizada 1) en el prospecto del kit de amplicones personalizados TruSeq Dx.
DLSO Sequence (Secuencia de oligonucleótidos descendentes de locus específico)	Secuencia del cebador descendente empleado para generar el amplicón, también llamado "Custom Probe 2" (Sonda personalizada 2) en el prospecto del kit de amplicones personalizados TruSeq Dx.

Descripciones de la columna [Targets] (Objetivos)

Columna Targets (Objetivos)	Descripción
Target A (Objetivo A)	Mismo texto que el campo Target ID (ID de objetivo) para el amplicón que figura en [Probes] (Sondas).
Target B (Objetivo B)	Mismo texto que el campo Target ID (ID de objetivo) para el amplicón que figura en [Probes] (Sondas). El objetivo A y el B son los mismos.
Target Number (Número de objetivo)	Número 1: la región objetivo de un par de sondas presenta el índice 1 y está etiquetada como TargetID.1 en los datos. Toda secuencia fuera de objetivo presentará los índices 2, 3, etc., y aparecerá etiquetada como TargetID.2, TargetID.3, etc., respectivamente.
Chromosome (Cromosoma)	El cromosoma del amplicón (por ejemplo, chr1, chr2 o chrX). Debe coincidir con el genoma de referencia.
Start Position (Posición de inicio)	Coordenadas genómicas de la posición de inicio del amplicón, incluida la secuencia que coincide con las sondas.
End Position (Posición final)	Coordenadas genómicas de la posición final del amplicón, incluida la secuencia que coincide con las sondas.
Probe Strand (Cadena de la sonda)	Introduzca + o - para indicar la cadena del amplicón.
Sequence (Secuencia)	Secuencia de la región entre los ULSO/DLSO. Si la cadena de la sonda es positiva (+), la región de secuenciación procede de la cadena directa. Si la cadena de la sonda es negativa (-), la región de secuenciación procede de la cadena inversa.

Comprobación del diseño del manifiesto y del grupo de oligonucleótidos

Antes de utilizar el manifiesto e iniciar un experimento de secuenciación, debe cotejar el número total de amplicones de grupo de oligonucleótidos con el número indicado en el manifiesto. Cerciórese de que no falte ningún amplicón.

Los resultados finales del análisis secundario se encuentran en los archivos *.vcf y otros archivos de análisis de la carpeta del experimento de secuenciación en cuestión. Los datos del experimento se guardan en la ubicación de red que especificó en el software operativo del instrumento de secuenciación. Los informes de análisis y los archivos de

resultados se encuentran en la carpeta Alignment (Alineación). Consulte las guías del módulo de variantes de líneas germinales o del módulo de variantes somáticas para obtener información más detallada sobre estos archivos.

Con el fin de optimizar el ensayo, debe consultar los archivos de cobertura de resultados para realizar una comprobación rápida de los datos. La presencia de regiones con una cobertura baja o igual a cero puede indicar un problema con el archivo de manifiesto. Por ejemplo, las coordenadas del archivo de manifiesto podrían no reflejar las regiones genómicas objetivo del grupo de oligonucleótidos. Por otro lado, la presencia de regiones con unos valores de cobertura inesperadamente altos puede apuntar a otro problema con el grupo de oligonucleótidos como, por ejemplo, genes homólogos o ligadura cruzada, lo que a su vez puede orientar el rediseño y la optimización del grupo en mayor profundidad.

Compruebe que no se solapen los amplicones de la misma cadena. Los amplicones que se solapen, como los que se utilizan para delimitar una región, deben estar en cadenas distintas para impedir que se produzcan eventos de amplificación accidentalmente.

Por último, compruebe que el archivo de manifiesto sea un archivo *.txt delimitado por tabulaciones.

Almacenamiento del archivo de manifiesto y acceso

Se necesita el archivo de manifiesto para configurar un experimento con el software Local Run Manager. Cuando haya creado un archivo de manifiesto, guarde el archivo *.txt delimitado por tabulaciones en una ubicación desde la que se pueda cargar.

Antes de empezar el experimento de secuenciación, el manifiesto se puede guardar en Local Run Manager en la configuración del módulo de análisis de variantes de líneas germinales o en la del módulo de análisis de variantes somáticas. Mientras se crea un experimento, se puede acceder a los manifiestos guardados desde la lista desplegable de manifiestos. Además, los manifiestos se pueden importar para un experimento concreto mientras introduce la información del experimento. Para obtener más información, consulte la guía de referencia del instrumento de su analizador de secuencias de ADN de alto rendimiento.

Copyright y marcas comerciales

© 2017 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados. Illumina, TruSeq y el diseño de las bases de streaming son marcas comerciales registradas o pendientes de Illumina, Inc. o sus afiliados en EE. UU. o en otros países. Todos los demás nombres, logotipos y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos dueños.

Información de contacto



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122
(EE. UU.)
+ 1 800 809 ILMN (4566)
+ 1 858 202 4566 (fuera de
Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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



Patrocinador
australiano:
Illumina Australia
1 International
Court
Scoresby,
Victoria, 3179
Australia