

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx

Instruksjoner for manifestfil

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

TruSeq Custom Amplicon™ Kit Dx gjør det mulig for en tilpasset oligonukleotidsammenslåing å målrette spesifikke, forhåndsdefinerte regioner av genomet for sekvensering. Manifestet brukes under analyse til å veilede innretting av sekvensavlesingene til målrettede regioner, i stedet for til hele genomet.

De spesifikke målrettede regionene for en bestemt tilpasset oligonukleotidsammenslåing er sammenfattet i manifestfilen. Manifestet angir amplikon- og primersekvensene i de genomiske regionene som blir målrettet av den tilpassede oligonukleotidsammenslåingen.

Selv om hvert klargjort bibliotek (et bibliotek tilsvarer én reaksjon) må være forbundet med et enkelt manifest, kan forskjellige biblioteker sekvensert i en enkelt kjøring bruke forskjellige manifeste.

Til Germline-arbeidsflyten krever hver prøve én tilpasset oligonukleotidsammenslåing for fullstendig dekning av målrettede regioner. Derfor dannes det ett bibliotek per prøve, som tilsvarer ett manifest.

For Somatic-arbeidsflyten krever hver prøve to forskjellige tilpassede oligonukleotidsammenslåinger for fullstendig dekning: én oligonukleotidsammenslåing «A» utformet med amplikoner for én streng (f.eks.: plusstreng eller foroversammenslåing), og en komplementær tilpasset oligonukleotidsammenslåing «B» utformet for den andre strengen (f.eks.: minusstrengen eller bakoversammenslåingen). Derfor opprettes det to biblioteker per prøve, hver med et unikt manifest.

Opprette manifestfil

En manifestfil kan opprettes manuelt ved hjelp av manifestmalnedlastingene. Manifestmalen kan åpnes med Excel, men den bør deretter lagres som en tabulator delt *.txt-fil.

Manifestet har tre seksjoner: [Topptekst], [Prober] og [Mål]. Topptekst-seksjonen er valgfri og kan inneholde informasjon om for eksempel navnet på teknikeren som kjører analysen, navnet på forsøket osv. Hvis en topptekstseksjon brukes, må du plassere den før Prober-seksjonen. Prober- og Mål-seksjonene er obligatoriske og brukes under dataanalyse.

Følgende er kolonnebeskrivelsene for de obligatoriske seksjonene. Se oppsett i manifestmalen.

Beskrivelse av [Prober]-kolonnen

Prober-kolonnen	Beskrivelse
Target ID (Mål-ID)	En unik identifikator som brukes som amplikonets visningsnavn, bestående av tall og bokstaver. Må ikke inneholde mellomrom eller symboler.
Chromosome (Kromosom)	Amplikonets kromosom, for eksempel chr1, chr2 eller chrX. Må samsvare med hg19-referansegenomet.
Start Position (Startposisjon)	Genomisk koordinat for amplikonets startposisjon, eksklusivt sekvensen som samsvarer med probene.
End Position (Sluttposisjon)	Genomisk koordinat for amplikonets sluttposisjon, eksklusivt sekvensen som samsvarer med probene.
ULSO Sequence (ULSO-sekvens)	Sekvens av oppstrømsprimeren som brukes til å generere amplikonet, også kalt «Tilpasset probe 1» i pakningsvedlegget for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.
DLSO Sequence (DLSO-sekvens)	Sekvens av nedstrømsprimeren som brukes til å generere amplikonet, også kalt «Tilpasset probe 2» i pakningsvedlegget for TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

Beskrivelse av [Mål]-kolonnen

Mål-kolonnen	Beskrivelse
Target A (Mål A)	Samme tekst som Target ID (Mål-ID) for amplikonet angitt i [Prober].
Target B (Mål B)	Samme tekst som Target ID (Mål-ID) for amplikonet angitt i [Prober], Target A (Mål A) og Target B (Mål B) er de samme.
Target Number (Målnummer)	Nummeret 1; målregionen for et probepar har indeks 1 og er merket TargetID.1 i dataene. Eventuelle sekvenser utenfor målet har indeksene 2, 3 osv., og er merket som TargetID.2 og TargetID.3.

Mål-kolonnen	Beskrivelse
Chromosome (Kromosom)	Amplikonets kromosom, for eksempel chr1, chr2 eller chrX. Må samsvare med referansegenomet.
Start Position (Startposisjon)	Genomisk koordinat for amplikonets startposisjon, inklusive sekvensen som samsvarer med probene.
End Position (Sluttposisjon)	Genomisk koordinat for amplikonets sluttposisjon, inklusive sekvensen som samsvarer med probene.
Probe Strand (Probestreng)	Tast + eller - for å angi amplikonets streng.
Sequence (Sekvens)	Sekvens i regionen mellom ULSD/DLSO. Hvis probestrengen er +, er sekvenseringsregionen fra foroverstrengen. Hvis probestrengen er -, er sekvenseringsregionen fra bakoverstrengen.

Sjekk manifest og oligonukleotid-sammenslåingsdesign

Før du bruker manifestet og starter en sekvenseringskjøring, må du sammenligne samlet antall amplikoner i oligonukleotidsammenslåingen med antallet som er angitt i manifestet. Påse at ingen amplikoner mangler.

Endelige resultater av sekundæranalyse er i *.vcf-filer og andre analysefiler i sekvenseringskjøringens kjøremappe. Dataene fra kjøringen lagres til nettverksstedet du angir i sekvenseringsinstrumentets driftsprogramvare. Analyserapporter og utdatafiler finnes i mappen Alignment (Innretting). Du finner mer informasjon om disse filene i veiledningene for Germline Variant- eller Somatic Variant-modulen.

Når du optimaliserer analysen, må du se utdatadekningsfilene for å utføre en hurtigkontroll av dataene. Regioner med lav eller null dekning kan antyde et problem med manifestfilen. For eksempel gjenspeiler koordinater i manifestfilen kanskje ikke de genomiske regionene som er målrettet av oligonukleotidsammenslåingen. Alternativt kan regioner med uventet høy dekning antyde et annet problem med oligonukleotidsammenslåingen, slik som homologe gener eller kryssbinding, noe som da kan veilede videre redesign og optimalisering av sammenslåingen.

Påse at amplikoner på samme streng ikke overlapper hverandre. Overlappende amplikoner, f.eks. slike som brukes til å platelegge en region, må være på forskjellige strenger for å hindre utilsiktede forsterkningshendelser.

Til slutt må du påse at manifestfilen er en tabulardelt *.txt-fil.

Lagre og åpne manifestfil

Manifestfilen må sette opp en kjøring med Local Run Manager-programvare. Etter at en manifestfil er opprettet, må du lagre den tabulardelte *.txt-filen et sted som er tilgjengelig for opplasting.

Før du starter sekvenseringskjøringen, kan manifestet lagres til modulinnstillinger i Lokal Run Manager Germline Variant- eller Somatic Variant-analysemodulene. Under opprettelse av kjøring er lagrede manifeste tilgjengelige fra rullegardinlisten Manifest. Manifeste kan også importeres for en spesifikk kjøring når du angir kjøreinformatjon. Du finner mer informasjon i referanseveiledningen for High-Throughput DNA-sekvensanalytoren.

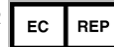
Opphavsrett og varemerker

© 2017 Illumina, Inc. Med enerett. Illumina, TruSeq og streamingbase-designen er registrerte eller ventende varemerker som tilhører Illumina, Inc. og/eller tilknyttede selskaper i USA og/eller andre land. Alle andre navn, logoer og andre varemerker tilhører deres respektive eiere.

Kontaktinformasjon



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California, 92122
USA
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (utenfor
Nord-Amerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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



Australsk
sponsor:
Illumina Australia
1 International
Court
Scoresby,
Victoria, 3179
Australia