

TruSeq Custom Amplicon Kit Dx

Anvisningar för manifestfil

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK

TruSeq Custom Amplicon™ Kit Dx gör det möjligt för en anpassad oligonukleotidpool att rikta in sig på specifika, fördefinierade genomregioner för sekvensering. Manifestet används under analys för att styra inpassningar av sekvensläsningar till utvalda regioner, snarare än hela genomet.

De särskilt inriktade regionerna för en viss anpassad oligonukleotidpool sammanfattas i manifestfilen. Manifestet anger ampliconen och primersekvenserna för genomregionerna som är målet för den anpassade oligonukleotidpoolen.

Även om varje förberett bibliotek (ett bibliotek motsvarar en reaktion) måste associeras med ett enda manifest, kan olika bibliotek som sekvenseras i en enda körning använda olika manifest.

För Germline-arbetsflödet kräver varje prov en anpassad oligonukleotidpool för fullständig täckning av målregioner. Därför skapas ett bibliotek per prov, vilket motsvarar ett manifest.

För Somatic-arbetsflödet kräver varje prov två olika anpassade oligonukleotidpooler för fullständig täckning: en oligonukleotidpool "A" som är utformad med ampliconer för en sträng (ex: plussträng eller framåtriktad pool) och en kompletterande anpassad oligonukleotidpool "B", som utformats för den andra strängen (ex: minussträng eller bakåtriktad pool). Därför skapas två bibliotek per prov, vart och ett med ett unikt manifest.

Skapa manifestfil

En manifestfil kan skapas manuellt med hjälp av Manifest Template-nedladdningen (manifestmall). Manifest Template kan öppnas med Excel, men den ska sparas som en tabbavgränsad *.txt-fil.

Manifestet har tre avsnitt: [Header] (sidhuvud), [Probes] (sonder) och [Targets] (mål). Avsnittet Header är valfritt och kan till exempel innehålla information om namnet på teknikern som kör analysen, namnet på experimentet osv. Om ett Header-avsnitt används ska det placeras innan avsnittet Probes. Avsnitten Probes och Targets är obligatoriska och används under dataanalysen.

Följande är kolumnbeskrivningarna för de obligatoriska avsnitten. Se Manifest Template för layouten.

[Probes]-kolumnbeskrivningar

Probes-kolumn	Beskrivning
Mål-ID	En unik identifierare som används som visningsnamn för ampliconen och består av siffror och bokstäver. Får inte innehålla några mellanslag eller symboler.
Kromosom	Ampliconens kromosom, till exempel chr1, chr2 eller chrX. Måste överensstämma med referensgenomet hg19.
Startposition	Genomkoordinat för ampliconens startposition, exklusive sekvensen som matchar sönerna.
Slutposition	Genomkoordinat för ampliconens slutposition, exklusive sekvensen som matchar sönerna.
ULSO-sekvens	Sekvens för uppströmsprimern som används för att generera ampliconen, även kallat "Custom Probe 1" i förpackningsbilagan för TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.
DLSO-sekvens	Sekvens för nedströmsprimern som används för att generera ampliconen, även kallat "Custom Probe 2" i förpackningsbilagan för TruSeq Custom Amplicon Kit Dx.

[Targets]-kolumnbeskrivningar

Targets-kolumn	Beskrivning
Mål A	Samma text som Mål-ID för ampliconen som anges i [Probes].
Mål B	Samma text som Mål-ID för ampliconen som anges i [Probes]; Mål A och Mål B är likadana.
Målnummer	Nummer 1; målområdet för ett sondpar har index 1 och är märkt TargetID.1 i data. Alla off-target-sekvenser har index på 2, 3 osv. och är märkta som TargetID.2 och TargetID.3.

Targets-kolumn	Beskrivning
Kromosom	Amplikonens kromosom, till exempel chr1, chr2 eller chrX. Måste matcha referensgenomet.
Startposition	Genomkoordinat för amplikonens startposition, inklusive sekvensen som matchar sönerna.
Slutposition	Genomkoordinat för amplikonens slutposition, inklusive sekvensen som matchar sönerna.
Sondsträng	Använd + eller - för att ange amplikonens sträng.
Sekvens	Sekvens för regionen mellan UL50/DL50. Om sondsträngen är + ligger sekvenseringsregionen från den framåtriktade strängen. Om sondsträngen är - ligger sekvenseringsregionen från den bakåtriktade strängen.

Kontrollera manifest och oligonukleotidpooldesign

Innan du använder manifestet och startar en sekvenseringskörning ska du jämföra det totala antalet amplikoner i oligonukleotidpoolen med det antal som anges i manifestet. Se till att inga amplikoner saknas.

Slutresultaten av den sekundära analysen finns i *.vcf-filer och andra analysfiler i körningsmappen för sekvenseringskörningen. Data från körningen sparas till nätverksplatsen som anges i sekvenseringsinstrumentets systemprogramvara. Analysrapporter och utdatafiler finns i mappen Alignment (inpassning). Se guiderna för modulerna Germline Variant (könszellvariant) eller Somatic Variant (somatisk variant) för mer information om dessa filer.

Se filerna för utdatatäckning för att utföra en snabb datakontroll vid analysoptimering. Områden med låg eller ingen täckning kan vara ett tecken på att det finns fel i manifestfilen. Till exempel kan det hända att koordinater i manifestfilen inte återspeglar de genomregioner som är målet för oligonukleotidpoolen. Alternativt kan regioner med oväntat hög täckning tyda på ett annat problem med oligonukleotidpoolen, som homologa gener eller korsbindning, som sedan kan påverka fortsatt pooländring och -optimering.

Se till att amplikonerna på samma sträng inte överlappar varandra. Överlappande amplikoner, exempelvis sådana som används för att ruta in en region, måste vara på olika strängar för att förhindra oavsiktlig amplifiering.

Se slutligen till att manifestfilen är en tabbavgränsad *.txt-fil.

Lagra och få åtkomst till manifestfil

Manifestfilen krävs för att konfigurera en körning med programmet Local Run Manager (lokal körningshanterare). När en manifestfil skapats ska den tabbavgränsade *.txt-filen sparas till en plats som är tillgänglig för uppladdning.

Innan du börjar sekvenseringskörningen kan manifestet sparas till modulinställningarna i Local Run Manager för analysmodulerna Germline Variant (könszellvariant) eller Somatic Variant (somatisk variant). När körningen skapas är sparade manifest tillgängliga via listrutan Manifest. Manifest kan också importeras för en specifik körning när körningsinformation anges. Mer information finns i referensguiden för DNA-sekvensanalysatorn med hög genomströmning.

Upphovsrätt och varumärken

© 2017 Illumina, Inc. Med ensamrätt. Illumina, TruSeq och designen med strömmande baser är registrerade eller patentsökta varumärken som tillhör Illumina, Inc. och/eller dess dotterbolag i USA och/eller andra länder. Alla andra namn, logotyper och varumärken tillhör respektive ägare.

Kontaktinformation



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122
USA
+1 800-8094566
+1 858-2024566 (utanför
Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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



Australiensisk
sponsor:
Illumina Australia
1 International
Court
Scoresby, Victoria,
3179
Australien