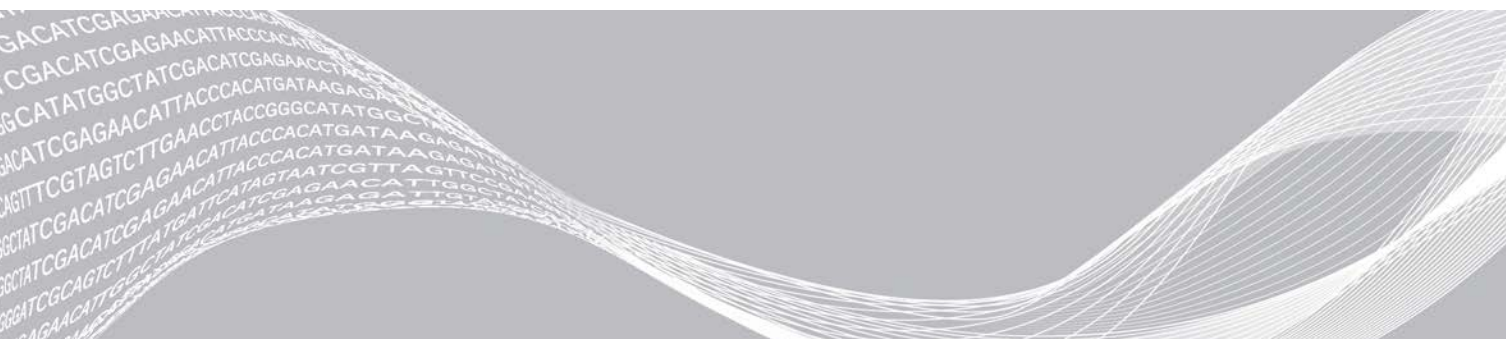


Tarkvara Local Run Manager idutee variandi analüüsimoodul

Töövoog juhend seadmele NextSeq 550Dx

IN VITRO DIAGNOSTILISEKS KASUTAMISEKS

Ülevaade	3
Käituse teabe sisestamine	3
Analüüsimeetodid	5
Käituse ja proovi andmete kuvamine	7
Analüüsiaruanne	7
Analüüsi väljundfailid	8
Muudatuste ajalugu	15
Tehniline tugi	16



See dokument ja selle sisu kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. ja selle tütarettevõtetele („Illumina“) ning on mõeldud kasutamiseks ainult ettevõtte lepingulistele klientidele seoses selles dokumendis kirjeldatud toote (toodete) kasutamisega ega ole mõeldud mitte mingiks muuks otstarbeks. Seda dokumenti ega selle sisu ei tohi mis tahes viisil kasutada ega muul eesmärgil levitada ega/või edastada, avaldada või reprodutseerida ilma Illumina eelneva kirjaliku nõusolekuta. Illumina ei anna selle dokumendiga kolmandale isikule oma patendi-, kaubamärgi-, autori-, tava- või muu sarnase õiguse alusel mitte ühtegi litsentsi.

Kvalifitseeritud ja asjakohase koolituse saanud töötajad peavad selles dokumendis kirjeldatud juhiseid järgima rangelt ja üksikasjaliselt, et tagada siin kirjeldatud toote (toodete) õige ja ohutu kasutusviis. Siinse dokumendi sisu tuleb enne nimetatud toote (toodete) kasutamist täies ulatuses läbi lugeda ja endale selgeks teha.

SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD JUHISTE MITTE LUGEMINE JA ÜKSIKASJALIK JÄRGIMINE VÕIB KAHJUSTADA TOODET (TOODEID), VIGASTADA INIMESI (SH KASUTAJAID VÕI TEISI) JA KAHJUSTADA MUUD VARA NING NIMETATUD JUHUL EI KEHTI ÜKSKI TOOTELE (TOODETELE) ANTUD GARANTII.

ILLUMINA EI VASTUTA SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD TOOTE (TOODETE) (SEALHULGAS TOOTE OSAD VÕI TARKVARA) VÄÄRKASUTUSE EEST.

© 2021 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

Kõik kaubamärgid kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. või nende vastavatele omanikele. Kaubamärgi kohta lisateabe saamiseks vt www.illumina.com/company/legal.html.

Ülevaade

Tarkvara Local Run Manager idutee variandi moodul on mõeldud kasutamiseks koos seadme Illumina TruSeq kohandatud amplikoni komplekti Dx testiga ja seadmega NextSeq 550Dx. Kui seda kasutatakse koos idutee variandi mooduliga, on analüüs ette nähtud perifeersetest täisvereproovidest DNA sekveneerimiseks kasutatavate teekide ettevalmistamiseks.

Analüüsimoodul hindab variantide jaoks amplifitseeritud DNA lühikesi piirkondi ehk amplikone. Amplikonide fokuseeritud sekveneerimine võimaldab kindlate piirkondade kõrget katvust. Vt pakendi teabelehte *Seadme TruSeq kohandatud amplikoni komplekt Dx (dokument nr 1000000029772)*.

Idutee variandi analüüsimoodul nõuab 300-tsüklilise sekveneerimise tarvikuid. Lisateavet vt pakendi infolehel *Seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekt v2* või *Seadme NextSeq 550Dx suure väljundiga reaktiivikomplekt v2.5*.

Teave selle juhendi kohta

Selles juhendis on toodud juhised sekveneerimise ja analüüsimise käitusparameetrid idutee variandi analüüsimooduli jaoks. Lisateavet tarkvara Local Run Manager juhtpaneeli ja süsteemi sätete kohta vt *Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend (dokument nr 1000000009513)*.

Tarkvara Local Run Manager kuvamine

Tarkvara Local Run Manager liides kuvatakse operatsioonisüsteemi NextSeq 550Dx (NOS) või veebibrauseri kaudu. Toetatud veebibrauser on Chromium.



MÄRKUS.

Kui kasutate toetuseta brauserit, laadige teate „Kinnita toetuseta brauser“ kuvamisel alla toetatud brauser. Chromiumi toetatud versiooni allalaadimiseks klõpsake **siin**.

Kuvamine seadme monitoril

- 1 Tarkvara Local Run Manager liidese kuvamiseks seadme monitoril valige üks järgmistest võimalustest:
 - ▶ Valige NOS-i avakuval **Local Run Manager**.
NOS-i naasmiseks klõpsake paremas ülanurgas X-i.
 - ▶ Valige ikoon Minimeeri NOS , avage seadmel Chromiumi veebibrauser ja sisestage aadressiribale **http://localhost**.
Ainult administraatorid saavad NOS-i minimeerida.

Kuvamine võrguühendusega arvutis

- 1 Avage arvutis Chromiumi veebibrauser, millel on juurdepääs samale võrgule kui seadmel, ja ühendage seade, kasutades seadme IP-aadressi või nime. Näiteks **http://myinstrument**.

Käituse teabe sisestamine

Parameetrite määramine

- 1 Logige sisse rakendusse Local Run Manager.
- 2 Valige **Loo käitus** ja siis valige **idutee variant**.
- 3 Sisestage käituse nimi, mis identifitseerib käituse sekveneerimisest analüüsini.

Kasutage tähtnumbrilisi märke, tühikuid, kriipse või allkriipse.

- 4 **[Valikuline]** Sisestage käituse kirjeldus, et aidata käitust identifitseerida.
Kasutage tähtnumbrilisi märke, tühikuid, kriipse või allkriipse.
- 5 Valige rippmenüüst proovide arv ja indeksikomplekt.
Mõelge valiku tegemisel järgmisele teabele.
 - ▶ Rippmenüü sisaldab proovide arvu, millel on indeksikomplekt. Näiteks 24-komplekt 1 tähistab 24 testitavat proovi koos indeksikomplekti 1 indeksitega.
 - ▶ Indeksikomplekti numbrid viitavad erinevatele i5 indeksite komplektidele. Komplekt 1 ja komplekt 2 pakuvad indeksite mitmekesisust. Pakutakse kahte indeksikomplekti, mis aitavad vältida ühe komplekti ammendumist.
 - ▶ Valige proovide arv, mis on lähim testitavate proovide arvule. Kui loendis täpset proovide arvu pole, valige testimiseks vajalikule lähim, kuid proovide arvust väiksem arv. Näiteks kui soovite testida 18 proovi, valige 16 proovi.
 - ▶ Indeksi mitmekesisuse nõuetele vastavad proovide kaevud ja indeksikombinatsioonid on esile tõstetud rohelisega. Kui valite muud kaevud ja indeksikombinatsioonid, saate käituse salvestamisel teate, kui indeksite mitmekesisuse nõuded pole täidetud.

Manifestifailide importimine käituse jaoks

- 1 Veenduge, et imporditavad manifestid oleksid kättesaadavad juurdepääsetavas võrgus või USB -draivil.
- 2 Valige **Impordi manifestid**.
- 3 Liikuge manifestifaili juurde ja valige manifestid, mille soovite lisada.



MÄRKUS.

Manifestifailide kättesaadavaks tegemiseks kõigi käituste jaoks, kasutades idutee variandi analüüsimoodulit, lisage manifestid funktsiooni Mooduli sätted abil. See funktsioon nõuab administraatori taseme õigusi. Lisateavet vt *Seadme NextSeq 550Dx viitejuhendist (dokument nr 1000000009513)*.

Proovide määramine käituse jaoks


Määrake käituse proovid, kasutades ühte järgmistest valikutest ja juhistest.

- ▶ **Proovide sisestamine käsitsi** – kasutage tühja tabelit kuval Loo käitus.
- ▶ **Proovide importimine** – liikuge komaraldusega väärtuste (*.csv) vormingus välise faili juurde. Malli saab alla laadida kuvalt Käituse loomine.


Pärast proovide tabeli täitmist saate proovide teabe eksportida välisesse faili. Kasutage faili viitena teekide ettevalmistamisel või teiseks käituseks importimisel.

Proovide sisestamine käsitsi

- 1 Sisestage väljale Proovi ID kordumatu proovi ID.
Kasutage tähtnumbrilisi märke, kriipse või allkriipse.
- 2 **[Valikuline]** Positiivsete või negatiivsete kontrollproovide jaoks paremklõpsake ja valige kontrollitüüp.
- 3 **[Valikuline]** Sisestage väljale Proovi kirjeldus proovi kirjeldus.
Kasutage tähtnumbrilisi märke, kriipse või allkriipse.
Proovi kirjeldused on seotud proovi nimega. Proovi kirjeldused kirjutatakse üle, kui sama proovi nime kasutatakse hiljem uuesti.

- 4 Valige indeksi 1 adapter rippmenüüst Indeks 1 (i7).
Soovitatud proovide kaevude kasutamisel täidab tarkvara i7 ja i5 indeksiaadapterid, mis vastavad indeksi mitmekesisuse nõuetele. Kui loendis pole täpset testitavate proovide arvu, valige lisakaevude jaoks kindlasti indeksiaadapterid. Kui peate lisakaevude jaoks valima indeksid või kui te ei kasuta soovitatud indeksiaadapteri kombinatsioone, lugege enne indeksite valimist kindlasti dokumendi *Aluste nimetamine ja indeksite mitmekesisus* leheküljel 14.
- 5 Valige indeksi 2 adapter rippmenüüst Indeks 2 (i5).
- 6 Valige rippmenüüst Manifest manifestifail.
- 7 Valige suvand plaadi kujunduse vaatamiseks, printimiseks või salvestamiseks viitena teekide ettevalmistamisel:
 - ▶ Plaadi kujunduse kuvamiseks valige ikoon  **Prindi**. Plaadikujunduse printimiseks valige **Prindi**.
 - ▶ Valige **Ekspordi**, et eksportida proovi teave välisesse faili.Veenduge, et manifesti ja proovide teave oleks õige. Vale teave võib tulemusi mõjutada.
- 8 Valige **Salvesta käitus**.

Proovide importimine

- 1 Valige **Impordi proovid** ja sirvige proovi teabefaili asukohta. Imporditavaid faile on kahte tüüpi.
 - ▶ Uue plaadikujunduse tegemiseks valige **Mall** kuval Käituse loomine. Mallifail sisaldab impordiks õigeid veerupäiseid. Sisestage igas veerus käituses olevate proovide kohta proovide teave. Kustutage näidisteave kasutamata lahtritest ja seejärel salvestage fail.
 - ▶ Kasutage idutee variandi moodulist ekspordifunktsiooni abil eksporditud proovide teabega faili.
- 2 Plaadi kujunduse kuvamiseks valige ikoon  **Prindi**.
- 3 Valige **Prindi**, et printida plaadi kujundus teekide ettevalmistamise näidisena.
- 4 **[Valikuline]** Valige **Ekspordi**, et eksportida proovide teave välisesse faili.
Veenduge, et manifesti ja proovide teave oleks õige. Vale teave võib tulemusi mõjutada.
- 5 Valige **Salvesta käitus**.

Käituse redigeerimine

Käituses oleva teabe redigeerimise juhiseid enne järjestamist vt *Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend (dokument nr 100000009513)*.

Analüüsimeetodid

Idutee variandi analüüsimoodul teostab järgmised analüüsietapid ja kirjutab seejärel analüüsi väljundfailid kausta Joondamine.

- ▶ Demultipleksib indeksi lugemid
- ▶ Loob FASTQ-failid
- ▶ Joondab etaloniga
- ▶ Tuvastab variandid

Demultipleksimine

Demultipleksimine võrdleb iga indeksi lugemi järjestust käituse jaoks määratud indeksite järjestustega. Selles etapis ei arvestata kvaliteediväärtustega.

Indeksite lugemid identifitseeritakse järgmiste sammudega:

- ▶ Proovid nummerdatakse alates 1-st, lähtudes nende järjestusest käituse jaoks.
- ▶ Valimi number 0 on reserveeritud klastritele, mida proovile ei määratud.
- ▶ Klastrid määratakse proovile siis, kui indeksi järjestus vastab täpselt või kui indeksi lugemi kohta on kuni üks mittevastavus.

FASTQ-failide genereerimine

Pärast demultipleksimist genereerib tarkvara vaheanalüüsi failid FASTQ-vormingus, mis on tekstivorming, mida kasutatakse järjestuste esitamiseks. FASTQ-failid sisaldavad kõikide proovide lugemeid ja seonduvaid kvaliteediskoore. Klastrid, mis ei läbinud filtrit, on välistatud.

FASTQ-fail sisaldab ainult ühe proovi lugemeid ja selle proovi nimi sisaldub FASTQ-faili nimes. FASTQ-failid on joondamise peamine sisend. Proovi kohta luuakse kaheksa FASTQ-faili, neli lugemist 1 ja neli lugemist 2.

Joondamine

Joondamisetapi ajal joondab Smith-Watermani ribaalgoritm iga proovi klastrid manifestifailis täpsustatud amplikonjärjestuste kohaselt.

Smith-Watermani ribaalgoritm teostab semiglobaalseid järjestuste joondusi, et määrata sarnased piirkonnad kahele järjestusele. Kogu järjestuse võrdlemise asemel võrdleb Smith-Watermani algoritm kõigi võimalike pikkustega segmente.

Iga paaristulemusega lugemit hinnatakse selle joondamise suhtes selle lugemi asjakohaste sondijärjestustega.

- ▶ Lugemist 1 hinnatakse allavoolu lookusekohaste oligode (DLSO) pöördkomplemendi suhtes.
- ▶ Lugemist 2 hinnatakse ülesvoolu lookusekohaste oligode (ULSO) suhtes.
- ▶ Kui lugemi algus ühtib sondijärjestusega, milles pole rohkem kui kolm erinevust (mittevastavus või nihked juhtivate indelide tõttu), joondatakse lugemist täispikkus selle järjestuse amplikoni sihtmärgi suhtes.
- ▶ Analüüsikeemiat arvestades DLSO-s ja ULSO-s indeleid ei täheldata.

Joondused filtreeritakse joondamistulemuste põhjal, lähtudes mittevastavuse määrast kas huvipakkuvas piirkonnas või kogu amplikonis, olenevalt amplikoni pikkusest. Filtreeritud joondused kirjutatakse joondusfailidesse joondamata ja neid ei kasutata variantide nimetamisel.

Variandi nimetamine

Illumina väljatöötatud variandinimetaja Pisces identifitseerib DNA proovis esinevad variandid.



Variandinimetaja Pisces identifitseerib SNV-d, MNV-d ja väiksed indelid 3 etapiga:

- ▶ Vaatleb referentsgenoomi iga positsiooni eraldi
- ▶ Loendab alused antud positsioonis joondatud lugemite korral, mis kattuvad positsiooniga
- ▶ Arvutab Poissoni mudeli abil nimetamise kvaliteeti mõõtva variandiskoori. Variandid, mille kvaliteediskoor on alla Q20, välistatakse.

Kui variant läbib kõik filtrid, on variant märgitud kui PASS VCF-s.

Lisateavet vt github.com/Illumina/Pisces/wiki.

Käituse ja proovi andmete kuvamine

- 1 Klõpsake Local Run Manageri juhtpaneelil käituse nime.
- 2 Vaadake vahekaardil Käituse ülevaade sekveneerimiskäituse moodikud üle.
- 3 **[Valikuline]** Käituse väljundkausta tee kopeerimiseks klõpsake ikooni **Kopeeri lõikelauale** .
- 4 Käitusparameetrite ja tarvikute teabe vaatamiseks klõpsake vahekaarti Sekveneerimise teave.
- 5 Analüüsiaruande asukoha vaatamiseks klõpsake vahekaarti Proovid ja tulemused.
 - ▶ Kui analüüsi korrati, laiendage rippmenüüd Valige analüüs ja valige sobiv analüüs.
- 6 Analüüsikausta tee kopeerimiseks klõpsake ikooni **Kopeeri lõikelauale** .

Lisateavet vahekaartide Käituse ülevaade ja Sekveneerimise teave ja analüüsi taotlemise kohta vt *Seadme NextSeq 550Dx viitejuhend (dokument nr 1000000009513)*.

Analüüsiaruanne

Analüüsitulemused võetakse kokku vahekaardil Proovid ja tulemused ning koondaruandena kaustas Joondamine. Proovide aruanded on saadaval ka vastava proovi PDF-failis.

Teave vahekaartidel Proovid ja Tulemused

- 1 Proovi aruande nägemiseks klõpsake loendis proovil.

Tabel 1 Käituse ja proovi teave

Veeru pealkiri	Kirjeldus
Käituse olek	Näitab, kas sekveneerimiskäitus õnnestus või ebaõnnestus.
Kogusaagis (GB)	Sekveneerimiskäitusel nimetatud aluste arv. Näitab künnise ületamist ja õnnestumise või ebaõnnestumise olekut.
% ≥ Q30	Kvaliteediskooriga 30 (Q30) või suuremaga sekveneerimiskäituse lugemite protsent. Näitab künnise ületamist ja õnnestumise või ebaõnnestumise olekut.
Proovi ID	Proovi ID, mis anti käituse loomisel.
PF lugemite koguarv	Filtrit läbivate lugemite koguarv.
Lugemi 1 % ≥ Q30	Lugemite protsent lugemis 1 proovi kvaliteediskooriga 30 (Q30) või rohkem.
Lugemi 2 % ≥ Q30	Lugemite protsent lugemis 2 proovi kvaliteediskooriga 30 (Q30) või rohkem.
Autosoomi nimetuse määr	Autosoomide (kromosoomid 1–22) genoomsete positsioonide arv, mis vastab eelnevalt kindlaksmääratud usaldusväärtuse künnisele, jagatuna nõutud autosoomsete genoomsete positsioonide koguarvuga. Nimetamismäär kirjeldatakse proovipõhiselt ja see esitatakse protsendina, mis arvutatakse 1 miinus autosoomsete positsioonide arv koos mittetäielike nimetustega jagatuna sekveneeritud autosoomsete positsioonide koguarvuga.

Tabel 2 Proovi aruande teave

Veeru pealkiri	Kirjeldus
Proov	Proovi ID, mis anti käituse loomisel.
Aruande kuupäev	Aruande loomise kuupäev.

Veeru pealkiri	Kirjeldus
Proovi teave	Käituse loomisel esitatud proovi ID, proovis filtri läbinud lugemite koguarv, proovi lugemite protsent kvaliteediskooriga 30 (Q30) või rohkem ja autosoomne nimetamise määr.
Amplikoni kokkuvõte	Sekveneeritud amplikoni piirkondade koguarv ja sekveneeritud amplikonide kogupikkus aluspaarides sihtpiirkondades proovi kohta ning manifestifaili kohta. Manifestifail määrab etalongenoomi ja sihitud etalonpiirkonnad, mida joondamisetapis kasutatakse.
Lugemi taseme statistika	Etalonis iga positsiooni katva proovi lugemite arv ja protsent lugemi 1 ja lugemi 2 kohta.
Variantide kokkuvõte	Soovitatud väärtused ületanud tuvastatud SNV-de, sisestuste ja kustutuste arv proovi kohta, et teha kindlaks, kas kvaliteeditulemused on vastuvõetavas vahemikus.
Katvuse kokkuvõte	Joondatud aluste koguarv jagatuna sihtpiirkonna suurusel ja amplikoni piirkondade protsent, mille katvuse väärtus on suurem kui madala katvuse künnis $0,2 * \text{amplikoni keskmine katvus}$ proovi jaoks.
Katvusdiagrammid	Diagramm Katvus amplikoni piirkondade kaupa näitab proovi amplikoni piirkondade katvust. Piirkonnad, mille katvuse väärtus on väiksem kui katvuse künnis, on esile tõstetud punasega. Kõigi väärtuste keskmine tähistatakse oranži joonega.
Tarkvaraversioonid	Tarkvaraversioonid proovi sekveneerimise ajal. Sisaldab NextSeq 550Dx operatsioonitarkvara (NOS), Local Run Manageri tarkvara, RTA tarkvara ja idutee variandi mooduli versiooni.

Analüüsi väljundfailid

Järgmised analüüsi väljundfailid genereeritakse idutee variandi analüüsimooduli jaoks ja need pakuvad analüüsi tulemusi joondamise ja variantide nimetamise kohta. Analüüsi väljundfailid asuvad kaustas Joondamine.

Faili nimi	Kirjeldus
Demultipleksimine (*.txt)	Vahefailid, mis sisaldavad kokkuvõtlike tulemuste demultipleksimist.
FASTQ (*.fastq.gz)	Vahefailid, mis sisaldavad kvaliteediskooriga aluste nimetusi. FASTQ-failid on joondamisetapi peamine sisend.
Joendusfailid BAM -vormingus (*.bam)	Sisaldab antud proovi joondatud lugemeid.
Variantide nimetuste failid genoomi VCF -vormingus (*.genome.vcf.gz)	Sisaldab iga positsiooni jaoks genotüüpi, olenemata sellest, kas seda nimetatakse variandiks või etaloniks.
Variandinimetuste failid VCF -vormingus (*.vcf.gz)	Sisaldab kõiki variante, mida nimetatakse kogu sihtpiirkonnas.
AmpliconCoverage_M1.tsv	Sisaldab teavet iga pakutava manifesti katvuse kohta amplikoni ja proovi osas. M# tähistab manifesti numbrit.

Failivormingu demultipleksimine

Demultipleksimisprotsess loeb igale klastrile lisatud indeksjärjestuse, et teha kindlaks, millisest proovist klaster pärineb. Klastre ja proovinumbri vastendus kirjutatakse läbivooluküveti iga paani demultipleksimise (*.demux) faili.

Demultipleksimise faili nimevorming on `s_1_X.demux`, kus X on paani number.

Demultipleksimise failid algavad päisega:

- ▶ Versioon (4-baidine täisarv), praegu 1
- ▶ Klastre arv (4-baidine täisarv)

Ülejäänud fail koosneb paani klastrite proovide numbritest.

Kui demultipleksimise etapp on lõpule jõudnud, loob tarkvara demultipleksimise faili **DemultiplexSummaryF1L1.txt**.

- ▶ **F1** failinimes tähistab läbivooluküveti numbrit.
- ▶ **L1** failinimes tähistab raja numbrit.
- ▶ Demultipleksimise tulemuseks on tabel, kus on 1 rida paani kohta ja 1 veerg proovi kohta, sealhulgas proov 0.
- ▶ Kõige sagedamini esinevad järjestused indeksi lugemites.

FASTQ-failivorming

FASTQ on tekstipõhine failivorming, mis sisaldab aluste nimetusi ja kvaliteedi väärtusi ühe lugemi kohta. Iga kirje sisaldab 4 rida:

- ▶ Identifikaator
- ▶ Järjestus
- ▶ Plussmärk (+)
- ▶ Phredi kvaliteediskoorid ASCII + 33 kodeeritud vormingus

Identifikaator on vormindatud järgmiselt:

@Instrument:RunID:FlowCellID:Lane:Tile:X:Y ReadNum:FilterFlag:0:SampleNumber

Näide:

```
@SIM:1:FCX:1:15:6329:1045 1:N:0:2
TCGCACTCAACGCCCTGCATATGACAAGACAGAATC
+
<>;##=><9=AAAAAAAAAAA9#:<#<;<<<????#=#
```

BAM-failivorming

BAM-fail (*.bam) on SAM-faili tihendatud binaarversioon, mida kasutatakse kuni 128 Mb joondatud järjestuste kuvamiseks. SAM- ja BAM-vorminguid on üksikasjalikult kirjeldatud failis samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf.

BAM-failid kasutavad failinimede vormingut **SampleName_S#.bam**, kus # on proovi number, mis on määratud loendi alusel, mille järgi proovid on käituse jaoks järjestatud.

BAM-failid sisaldavad päisejaotist ja joondusejaotist:

- ▶ **Päis** – sisaldab teavet kogu faili kohta, näiteks proovi nimi, proovi pikkus ja joondusmeetod. Joondusejaotises seostatakse joondused päisejaotises oleva konkreetse teabega.
- ▶ **Joondused** – sisaldab lugemi nime, lugemi järjestust, lugemi kvaliteeti, joondamisteavet ja kohandatud silte. Lugemi nimi sisaldab kromosoomi, alguskoordinaati, joondamiskvaliteeti ja vastavuse deskriptorstringi.

Joondusejaotises on iga lugemi või lugemipaari kohta järgmine teave:

- ▶ **AS:** paaristulemusega joondamiskvaliteet
- ▶ **RG:** lugemirühm, mis näitab konkreetse proovi lugemite arvu.
- ▶ **BC:** vötkoodi silt, mis näitab lugemiga seotud demultipleksitud proovi ID-d.
- ▶ **SM:** üksiktulemusega joondamiskvaliteet.

- ▶ **XC:** vastavuse deskriptorstring
- ▶ **XN:** amplokoni nimesilt, mis salvestab lugemiga seotud amplokoni ID

BAM-i indeksfailid (*.bam.bai) sisaldavad vastava BAM-faili indeksit.

VCF-failivorming

Variant Call Format (VCF) on levinud failivorming, mille on välja töötanud genoomika teadusringkonnad. See sisaldab teavet variantide kohta, mis on leitud referentsgenoomi kindlatel positsioonidel. VCF-failid lõpevad laiendiga .vcf

VCF-faili päis sisaldab VCF-failivormingu versiooni ja variandi nimetaja versiooni ning loetleb faili ülejäänud osas kasutatud annotatsioonid. VCF-i päis sisaldab ka referentsgenoomi faili ja BAM-faili. Päise viimane rida sisaldab andmeridade veerupäiseid. Kõik VCF-failide andmerekad sisaldavad teavet ühe variandi kohta.

VCF-faili pealkirjad

Pealkiri	Kirjeldus
CHROM	Referentsgenoomi kromosoom. Kromosoomid ilmuvad samas järjekorras kui viitefailis FASTQ.
POS	Variandi ühe-aluseline positsioon referentskromosoomis. SNP-de puhul on see positsioon referentsalus variandiga; indelite või kustutuste puhul on see positsioon referentsalus vahetult enne varianti.
ID	Vajaduse korral saidilt dbSNP.txt saadud variandi rs number. Kui selles asukohas on mitu rs-numbrit, on loend semikoolonitega eraldatud. Kui sellel positsioonil ei ole dbSNP-kirjet, kasutatakse puuduva väärtuse markerit ('.').
REF	Referentsgenotüüp. Näiteks ühe T kustutamine on kujutatud referentsina TT ja alternatiivina T. A-T üksiknukleotiidi variant on kujutatud referentsina A ja alternatiivina T.
ALT	Alleelid, mis erinevad referentslugemist. Näiteks on üksiku T sisestamine esindatud kui referents A ja alternatiiv AT. Üksiknukleotiidi variant A-T on esindatud kui referents A ja alternatiiv T.
QUAL	Phred-skaalaga kvaliteediskoor, mille määrab variandi nimetaja. Kõrge skoor näitab suuremat usaldust variandi suhtes ja väiksemat vigade tõenäosust. Q kvaliteediskoori korral on vea hinnanguline tõenäosus $10^{-(Q/10)}$. Näiteks on Q30 nimetusekomplekti veamäär 0,1%. Paljud variantide nimetajad määravad oma statistiliste mudelite põhjal kvaliteediskoori, mis on täheldatud veamäära suhtes kõrge.

VCF-faili annotatsioonid

Pealkiri	Kirjeldus
FILTER	<p>Kui kõik filtrid on läbitud, kirjutatakse filtriveeru PASS.</p> <ul style="list-style-type: none"> • LowDP – rakendatakse saitidele, mille katvuse sügavus on alla 150x. Nii edasi- kui ka tagasilugemiga kaetud amplikoni positsioonide korral võrdub see 300 kattuva paaristulemusega lugemiga. • q20 – kvaliteediskoor < 20. • MultiAllelicSite – variant ei vasta diploidsele mudelile. • R5x9 – külgnevate korduste arv (pikkusega 1 kuni 5 bp) variandi nimetustele ≥ 9. • SB – ahela nihe on suurem kui antud künnis.
TEAVE	<p>Veeru TEAVE võimalikud kirjed on:</p> <ul style="list-style-type: none"> • AC – alleelide arv genotüüpides iga ALT-alleeli jaoks, samas järjekorras nagu loetletud. • AF – alleelide sagedus iga ALT-alleeli jaoks, samas järjekorras nagu loetletud. • AN – alleelide koguarv nimetatud genotüüpides. • CD – lipp, mis näitab, et SNP esineb vähemalt ühe referentsgeeni kirje kodeerivas piirkonnas. • DP – sügavus (aluse nimetuste arv, mis on joondatud positsiooniga ja mida kasutatakse variandi nimetamises). • Exon – referentsgeenist loetud komaeraldusega eksonipiirkondade loend. • FC – funktsionaalne tagajärg. • GI – referentsgeenist loetud komaeraldusega geeni ID-de loend. • QD – variandi usaldatavus/kvaliteet sügavuse järgi. • TI – referentsgeenist loetud komaeraldusega transkriptsiooni ID-de loend.
VORMING	<p>Vormindatud veerus on koolonitega eraldatud väljad. Nt GT:GQ. Väljade loend sõltub kasutatavast nimetaja variandist. Saadaval on järgmised väljad:</p> <ul style="list-style-type: none"> • AD – vormi X,Y sisestamine, kus X on etalonnimetuste arv ja Y on alternatiivnimetuste arv. • DP – ligikaudne lugemisügavus; lugemid MQ = 255 või halbade paarilistega filtreeritakse. • GQ – genotüübi kvaliteet. • GT – genotüüp. 0 vastab etalonlusele, 1 vastab veeru ALT esimesele kirjele ja nii edasi. Kaldkriips (/) näitab, et faasimise teave pole saadaval. • NC – murdosa alustest, mida ei nimetatud või mille aluse nimetuse kvaliteet on alla miinimumkünnise. • NL – müratase; hinnang aluse nimetamise müra kohta sellel positsioonil. • SB – aluse nihe sellel positsioonil. Suuremad negatiivsed väärtused näitavad väiksemat nihet; 0 lähedal olevad väärtused näitavad suuremat nihet. • VF – variandi sagedus; alternatiivset alleeli toetavate lugemite protsent.
PROOV	Proovi veerg annab veerus VORMING määratud väärtused.

Genoomi VCF-failid

Genoomi VCF-failid (gVCF) on VCF v4.1 failid, mis järgivad genoomi kõigi saitide mõistlikult kompaktses vormis esitamise tavasid. GVCf (*.genome.vcf.gz) failid sisaldavad ühes failis kõiki huvipakkuvas piirkonnas asuvaid saite iga proovi jaoks.

GVCf-fail näitab nimetuse puudumist positsioonidel, mis ei läbi kõiki filtreid. Genotüübi (GT) silt ./. näitab nimetuse puudumist.

Lisateavet leiate asukohast sites.google.com/site/gvcftools/home/about-gvcf.

Amplikoni katvusfail

Iga manifestifaili jaoks luuakse amplikoni katvusfail. Failinimes olev M # tähistab manifesti numbrit.

Iga fail sisaldab päiserida, mis sisaldab manifestiga seotud proovi ID-sid. Fail sisaldab järgmist teavet.

- ▶ Sihtmärgi ID sellisena, nagu see on manifestis toodud.
- ▶ Lugemite läbipääsufiltri katvussügavus.

Täiendavad väljundfailid

Järgmised väljundfailid pakuvad lisateavet või võtavad kokku käituse tulemused ja analüüsivead. Kuigi neid faile pole analüüsitulemuste hindamiseks vaja, saab neid tõrkeotsingu eesmärkidel kasutada. Kõik failid asuvad kaustas Joondamine, kui pole märgitud teisiti.

Faili nimi	Kirjeldus
AnalysisLog.txt	Töötuslogi, mis kirjeldab kõiki toiminguid, mis toimusid praeguse käituse kausta analüüsimisel. See fail ei sisalda veateateid. Asub kaustas Joondamine.
AnalysisError.txt	Töötuslogi, mis loetleb analüüsimisel ilmnunud vead. Kui vigu ei esinenud, on see fail tühi. Asub kaustas Joondamine.
DemultiplexSummaryF1L1#.txt	Annab demultipleksimise tulemused tabelis, milles on 1 rida paani ja 1 veerg proovi kohta. # tähistab läbivooluküveti rada 1, 2, 3 või 4. Asub kaustas Joondamine.
AmpliconRunStatistics.xml	Sisaldab käitusele omast kokkuvõtlikku statistikat. Asub kaustas Joondamine.

Analüüsikaust

Analüüsikaust sisaldab tarkvara Local Run Manager loodud faile.

Väljundkausta ja analüüsikausta seos on kokku võetud järgmiselt:

- ▶ Järjestamise ajal täidab reaajas analüüs (RTA) väljundkausta piltide analüüsi, aluste nimetamise ja kvaliteedi hindamise käigus loodud failidega.
- ▶ RTA kopeerib failid analüüsikausta reaajas. Pärast seda, kui RTA määrab kõigile tsükli alustele kvaliteediskoori, kirjutab tarkvara faili RTAComplete.txt mõlemasse kausta.
- ▶ Kui fail RTAComplete.txt on olemas, algab analüüs.
- ▶ Analüüsi jätkudes kirjutab Local Run Manager väljundfailid analüüsikausta ja kopeerib seejärel failid tagasi väljundkausta.

Joonduste kaustad

Iga kord, kui seda analüüsi nõutakse, loob Local Run Manager joonduskausta nimega **Alignment_N**, kus N on järjekorranumber.

Kaustastruktuur

- 📁 **Joondamine** – sisaldab *.bam, *.vcf, FASTQ-faile ning analüüsimoodulile omaseid faile.
 - 📁 **Kuupäeva ja kellaaja tempel** – analüüsi kuupäeva ja kellaaja tempel YYYYMMDD_HHMMSS
 - 📄 AnalysisError.txt
 - 📄 AnalysisLog.txt
 - 📄 aggregate.report.html
 - 📄 aggregate.report.pdf
 - 📄 aggregate.summary.csv
 - 📄 AmpliconCoverage_M#.tsv
 - 📄 AmpliconRunStatistics.xml
 - 📄 Sample1.genome.vcf.gz
 - 📄 Sample1.coverage.csv
 - 📄 Sample1.report.pdf
 - 📄 Sample1.summary.csv
 - 📄 Sample1.vcf.gz
 - 📄 Sample1.bam
 - 📁 **FASTQ**
 - 📁 **Sample1**
 - 📄 Sample1_L001_R1_001_fastq.gz
 - 📁 **Stats**
 - 📄 DemuxSummaryF1L1.txt
 - 📄 FastqSummaryF1L1.txt
 - 📁 **Data**
 - 📁 **Intensities**
 - 📁 **BaseCalls**
 - 📁 **L001** – sisaldab *.bcl faile.
 - 📁 **L001** – sisaldab *.locs faile.
 - 📁 **RTA logid** – sisaldab RTA tarkvara analüüsi logifaile.
 - 📁 **InterOp** – sisaldab binaarfaile, mida kasutatakse sekveneerimise käituse näitajate aruandluseks.
 - 📁 **Logid** – sisaldab logifaile, mis kirjeldavad sekveneerimise ajal läbitud etappe.
 - 📄 RTAComplete.txt
 - 📄 RunInfo.xml
 - 📄 RunParameters.xml

Aluste nimetamine ja indeksite mitmekesisus

Kui proovid sekveneeritakse seadmel NextSeq 550Dx, määrab aluse nimetus kindlas tsükli aluse (A, C, G või T) antud paani iga klasteri jaoks või kujutise ala läbivooluküvetil. Seade NextSeq 550Dx kasutab kahekanalilist sekveneerimist, mis nõuab nelja DNA-aluse andmete kodeerimiseks ainult kahte kujutist, üks punasest ja teine rohelisest kanalist.

Indeksi lugemite aluste nimetamise protsess erineb aluste nimetamisest teiste lugemite ajal.

Indeksi lugemid peavad algama kahes esimeses tsükli vähemalt ühe G-st erineva alusega. Kui indeksi lugem algab kahe G aluse nimetamisega, siis signaali intensiivsust ei genereerita. Demultipleksimise toimivuse tagamiseks peab signaal olema ühes kahest esimesest tsüklist.

Indeksite valimisel käituse loomise ajal ilmub vähese mitmekesisuse hoiatus, kui indeksid ei vasta mitmekesisuse nõuetele. Vähese mitmekesisuse hoiatuse vältimiseks valige indeksitsükliid, mis annavad signaali mõlemas kanal iga tsükli jaoks.

- ▶ Punane kanal – A või C
- ▶ Roheline kanal – A või T

See aluste nimetamise protsess tagab madala pleksiga proovide analüüsimisel täpsuse. Lisateavet indeksite sekveneerimise kohta leiate pakendi teabelehel *Seadme TruSeq kohandatud amplikonikomplekt Dx (dokument nr 1000000029772)*.

Tarkvaras Local Run Manager käituse loomise ajal valite testitavate proovide arvu. Soovitatud indeksikombinatsioonid, mis vastavad indeksite mitmekesisuse nõuetele, täidab tarkvara automaatselt. Kuigi te ei pea soovitatud indeksikombinatsiooni kasutama, on see siiski soovitatav.

Muudatuste ajalugu

Dokument	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
Dokument nr 1000000030329 v04	August 2021	ELi volitatud esindaja uuendatud aadress.
Dokument nr 1000000030329 v03	Detsember 2019	ELi volitatud esindaja uuendatud aadress. Austraalia sponsori uuendatud aadress.
Dokument nr 1000000030329 v02	Jaanuar 2019	Lisatud teave v2.5 reaktiivikomplektide kohta.
Dokument nr 1000000030329 v01	August 2018	Uuendatud regulatiivsed märgised.
Dokument nr 1000000030329 v00	November 2017	Esialgne väljalase.

Tehniline tugi

Tehnilise abi saamiseks pöörduge Illumina tehnilise toe poole.

Veebisait: www.illumina.com
E-post: techsupport@illumina.com

Illumina klienditoe telefoninumbrid

Piirkond	Tasuta	Piirkondlik
Põhja-Ameerika	+1 800 809 4566	
Austraalia	+1 800 775 688	
Austria	+43 800 006 249	+43 1928 6540
Belgia	+32 8007 7160	+32 3400 2973
Hiina	40 0066 5835	
Hispaania	+34 911 899 417	+34 800 300 143
Holland	+31 800 022 2493	+31 207 132 960
Hongkong	800960230	
Iirimaa	+353 1800 936 608	+353 016950506
Itaalia	+39 800 985 513	+39 236 003 759
Jaapan	080 0111 5011	
Norra	+47 8001 6836	+47 2193 9693
Prantsusmaa	+33 805 102 193	+33 170 770 446
Rootsi	+46 850 619 671	+46 200 883 979
Saksamaa	+49 800 101 4940	+49 893 803 5677
Singapur	+1 800 579 2745	
Soome	+358 800 918 363	+358 974 790 110
Šveits	+41 565 800 000	+41 800 200 442
Taani	+45 8082 0183	+45 8987 1156
Taiwan	008 0665 1752	
Uus-Meremaa	08 0045 1650	
Ühendkuningriik	+44 800 012 6019	+44 207 305 7197
Muud riigid	+44 179 953 4000	

Ohutuse andmelehed (SDS-id): saadaval Illumina veebisaidil support.illumina.com/sds.html.

Toote dokumendid: allalaaditavad PDF-vormingus Illumina veebisaidilt. Minge veebisaidile support.illumina.com, valige toode ning seejärel **Dokumendid ja kirjandus**.



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+ 1 800 809 ILMN (4566)
+1 85 8202 4566 (väljaspool
Põhja-Ameerikat)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Holland

Sponsor Austraalias

Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Austraalia

IN VITRO DIAGNOSTILISEKS KASUTAMISEKS

© 2021 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

illumina®