

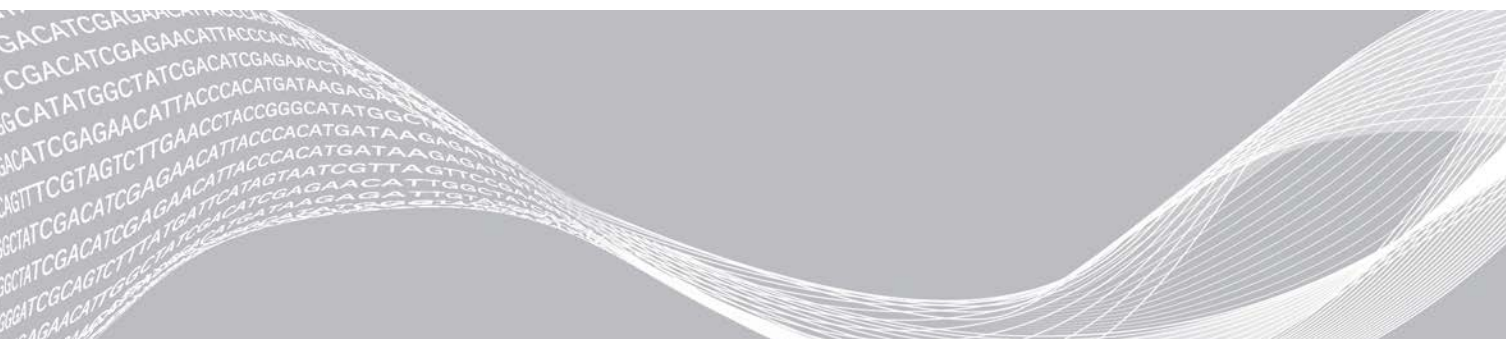
# Local Run Manager

## Germline Variant analīzes modulis

Darbplūsmas rokasgrāmata NextSeq 550Dx instrumentam

TIKAI IN VITRO DIAGNOSTIKAS NOLŪKIEM

Pārskats	3
Izpildes informācijas ievadīšana	3
Analīzes metodes	6
Izpildes un parauga datu skatīšana	7
Analīzes atskaite	7
Analīzes izvades faili	9
Pārskatījumu vēsture	16
Tehniskā palīdzība	17



Šī dokumenta un tā satura īpašumtiesības pieder kompānijai Illumina, Inc. un tās saistītajiem uzņēmumiem ("Illumina"), un tos klientam paredzēts izmantot tikai līgumā noteiktajā veidā saistībā ar šajā dokumentā aprakstīto produktu lietošanu, un tie nav paredzēti citiem nolūkiem. Šo dokumentu un tā saturu nedrīkst izmantot vai izplatīt nekādiem citiem nolūkiem un/vai citādi izziņot, atklāt vai reproducēt jebkādā veidā bez iepriekšējas rakstiskas Illumina piekrišanas. Ar šo dokumentu Illumina nenodod nevienu savu patentu, preču zīmju, autortiesību vai vispārīgo tiesību licenci, kā arī nekādas līdzīgas jebkuras trešās puses tiesības.

Šajā dokumentā sniegtos norādījumus ir stingri un precīzi jāievēro kvalificētiem un atbilstoši apmācītiem darbiniekiem, lai nodrošinātu šeit aprakstītā produkta pareizu un drošu lietošanu. Pirms šī produkta lietošanas ir pilnībā jāizlasa un jāizprot viss šī dokumenta saturs.

PILNĪBĀ NEIZLASOT UN PRECĪZI NEIEVĒROJOT VISUS ŠAJĀ DOKUMENTĀ IEKĻAUTOS NORĀDĪJUMUS, VAR RASTIES PRODUKTA BOJĀJUMI, PERSONU MIESAS BOJĀJUMI, TOSTARP LIETOTĀJU UN CITU PERSONU, UN CITA ĪPAŠUMA BOJĀJUMI, TURKLĀT TIKS ANULĒTAS VISAS PRODUKTAM PIEMĒROJAMĀS GARANTIJAS.

ILLUMINA NEUZŅEMAS NEKĀDU ATBILDĪBU, KAS IZRIET NO NEPAREIZAS ŠAJĀ DOKUMENTĀ APRAKSTĪTĀ PRODUKTA (TOSTARP TĀ DAĻU VAI PROGRAMMATŪRAS) LIETOŠANAS.

© 2021 Illumina, Inc. Visas tiesības paturētas.

Visas preču zīmes ir Illumina, Inc. vai to attiecīgo īpašnieku īpašums. Konkrētu informāciju par preču zīmēm skatiet vietnē [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Pārskats

Programmas Local Run Manager moduli Germline Variant ir paredzēts lietot ar testu Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx un NextSeq 550Dx. Kad šis tests tiek lietots ar moduli Germline Variant, tests ir paredzēts, lai sagatavotu bibliotēkas, kuras tiek izmantotas DNA sekvencēšanai no perifēro pilnasiņu paraugiem.

Analīzes modulis izvērtē pastiprinātā DNA jeb amplikonu īsos reģionus attiecībā uz variantiem. Izmantojot fokusētu amplikonu sekvencēšanu, konkrētos reģionos var panākt augstu pārklājumu. Skatiet iepakojuma ieliktni *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (dokuments Nr. 1000000029772)*.

Germline Variant analīzes modulim ir nepieciešami 300 ciklu sekvencēšanas palīgmateriāli. Plašāku informāciju skatiet *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2* vai *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5* iepakojuma ieliktnī.

## Par šo rokasgrāmatu

Šajā rokasgrāmatā ir sniegti norādījumi par izpildes parametru iestatīšanu, lai veiktu sekvencēšanu un analīzi Germline Variant analīzes modulī. Informāciju par Local Run Manager informācijas paneļa un sistēmas iestatījumiem skatiet *NextSeq 550Dx instrumenta atsauces rokasgrāmatā (dokuments Nr. 1000000009513)*.

## Local Run Manager skatīšana

Local Run Manager saskarni var apskatīt NextSeq 550Dx vadības programmatūrā (NOS) vai tīmekļa pārlūkprogrammā. Atbalstītā tīmekļa pārlūkprogramma ir Chromium.



### PIEZĪME

Ja izmantojat neatbalstītu pārlūkprogrammu, lejupielādējiet atbalstīto pārlūkprogrammu, kad tiek parādīts uzvednes ziņojums "Confirm Unsupported Browser" (Apstiprināt neatbalstītu pārlūkprogrammu). Atlasiet "**here**" (šeit), lai lejupielādētu atbalstīto Chromium versiju.

## Skatīšana instrumenta monitorā

- 1 Lai Local Run Manager saskarni skatītu instrumenta monitorā, atlasiet kādu no tālāk norādītajām opcijām.
  - ▶ NOS sākuma ekrānā atlasiet **Local Run Manager**. Kad tas ir pabeigts, labajā augšējā stūrī noklikšķiniet uz X, lai atgrieztos programmatūrā NOS.
  - ▶ Atlasiet ikonu Minimize NOS (Minimizēt NOS), atveriet instrumentā esošo tīmekļa pārlūkprogrammu Chromium un adreses josā ierakstiet **http://localhost**. Programmatūru NOS var minimizēt tikai lietotāji ar administratora tiesībām.

## Skats no tīklam pievienota datora

- 1 Datorā, kam ir piekļuve tam pašam tīklam, kuram ir pievienots instruments, atveriet tīmekļa pārlūku Chromium un izveidojiet savienojumu, izmantojot instrumenta IP adresi vai instrumenta nosaukumu. Piemēram, **http://myinstrument**.

## Izpildes informācijas ievadišana

### Parametru iestatīšana

- 1 Piesakieties programmatūrā Local Run Manager.
- 2 Atlasiet **Create Run** ( Izveidot i zpildi) un pēc t am atlasiet **Germline Variant**.

- 3 Ievadiet izpildes nosaukumu, kas identificē šo izpildi no sekvencēšanas, izmantojot analīzi. Izmantojiet burtu un ciparu rakstzīmes, atstarpes, pasvītrojumus vai defises.
- 4 **[Neobligāti]** Ievadiet izpildes aprakstu, lai palīdzētu identificēt šo izpildi. Izmantojiet burtu un ciparu rakstzīmes, atstarpes, pasvītrojumus vai defises.
- 5 Nolaizamajā sarakstā atlasiet paraugu skaitu un indeksu kopu. Veicot atlasī, ir jāņem vērā tālāk norādītā informācija.
  - ▶ Nolaizamajā sarakstā ir paraugu skaiti ar indeksu kopu. Piemēram, kopa 24-Set 1 norāda, ka ir jātestē 24 paraugi, izmantojot indeksus no indeksu kopas 1.
  - ▶ Indeksu kopu numuri attiecas uz dažādām i5 indeksu kopām. Gan kopa Set 1, gan kopa Set 2 nodrošina indeksu dažādību. Lai palīdzētu novērst vienas kopas izsmelšanu, tiek piedāvātas divas indeksu kopas.
  - ▶ Izvēlieties tādu paraugu skaitu, kas ir vistuvākais jūsu testēto paraugu skaitam. Ja sarakstā nav precīzi atbilstoša paraugu skaita, atlasiet vistuvāko skaitu, bet mazāku par testējamo skaitu. Piemēram, ja vēlaties testēt 18 paraugus, atlasiet 16 paraugus.
  - ▶ Paraugu iedobju un indeksu kombinācijas, kas atbilst indeksu dažādības prasībām, ir izceltas zaļā krāsā. Kad atlasāt citas iedobju un indeksu kombinācijas, izpildes saglabāšanas laikā tiek parādīts paziņojums, ja indeksu dažādības prasības nav izpildītas.

## Manifesta failu importēšana izpildei

- 1 Nodrošiniet, lai manifesti, kurus vēlaties importēt, ir pieejami kādā tīkla atrašanās vietā vai USB atmiņā.
- 2 Atlasiet vienumu **Import Manifests** (Importēt manifestus).
- 3 Dodieties uz manifesta failu un atlasiet manifestus, kurus vēlaties pievienot.



### PIEZĪME

Lai manifesta failus padarītu pieejamus visām izpildēm, izmantojot Germline Variant analīzes moduli, pievienojiet manifestus, izmantojot funkciju Module Settings (Moduļa iestatījumi). Šai funkcijai ir nepieciešamas administratora līmeņa atļaujas. Plašāku informāciju skatiet *NextSeq 550Dx instrumenta atsauces rokasgrāmata (dokuments Nr. 100000009513)*.

## Paraugu norādīšana izpildei

Norādiet paraugus izpildei, izmantojot vienu no tālāk norādītajām opcijām un virzieniem.

- ▶ **Enter samples manually** (Ievadīt paraugus manuāli) — izmantojiet tukšo tabulu ekrānā Create Run (Izveidot izpildi).
- ▶ **Import samples** (Importēt paraugus) — pārejiet uz ārēju failu komatatzīmju vērtību (\*.csv) formātā. Ekrānā Create Run (Izveidot izpildi) ir pieejama lejupielādējama veidne.


Kad paraugu tabula ir aizpildīta, paraugu informāciju varat eksportēt uz ārēju failu. Izmantojiet šo failu kā atsauci, kad sagatavojat bibliotēkas vai importējat failu citai izpildei.

## Paraugu ievadīšana manuāli


- 1 Ievadiet unikālu parauga ID laukā Sample ID (Parauga ID). Izmantojiet burtu un ciparu rakstzīmes, defises vai pasvītrojumus.
- 2 **[Neobligāti]** Pozitīviem un negatīviem kontroles paraugiem noklikšķiniet ar peles I abo pogu un atlasiet kontroles tipu.
- 3 **[Neobligāti]** Ievadiet parauga aprakstu laukā Sample Description (Parauga apraksts).

Izmantojiet burtu un ciparu rakstzīmes, defises vai pasvītījumus.

Paraugu apraksti tiek piesaistīti paraugu nosaukumiem. Paraugu apraksti tiek pārrakstīti, ja vēlākā izpildē tāds pats parauga nosaukums tiek izmantots atkal.

- 4 Atlasiet adapteri Index 1 (1. indekss) nolaižamajā sarakstā Index 1 (i7).  
Ja izmantojat ierosinātās paraugu iedobes, programmatūra automātiski aizpilda i7 un i5 indeksu adapterus, kas atbilst dažādības indeksu prasībām. Ja sarakstā nav precīzi atbilstoša testējamo paraugu skaita, noteikti atlasiet indeksu adapterus papildu iedobēm. Ja ir nepieciešams atlasīt indeksus papildu iedobēm vai ja nelietojat ieteiktās indeksu adapteru kombinācijas, pirms indeksu izvēlēšanās noteikti izlasiet sadaļu *Bāzu noteikšana un indeksu dažādība 15. lpp.*
- 5 Atlasiet adapteri Index 2 (2. indekss) nolaižamajā sarakstā Index 2 (i5).
- 6 Atlasiet manifesta failu nolaižamajā sarakstā Manifest.
- 7 Izvēlieties kādu opciju, lai šo plāksnes izkārtojumu apskatītu, izdrukātu vai saglabātu kā atsauci bibliotēku sagatavošanai.
  - ▶ Atlasiet ikonu  **Print** (Drukāt), lai parādītu plāksnes izkārtojumu. Atlasiet **Print** (Drukāt), lai izdrukātu plāksnes izkārtojumu.
  - ▶ Atlasiet **Export** (Eksportēt), lai paraugu informāciju eksportētu uz ārēju failu.Pārliecinieties, ka manifesta un paraugu informācija ir pareiza. Nepareiza informācija var ietekmēt rezultātus.
- 8 Atlasiet **Save Run** (Saglabāt izpildi).

## Paraugu importēšana

- 1 Atlasiet **Import Samples** (Importēt paraugus) un pārlūkojiet uz vietu, kur atrodas parauga informācijas fails. Var importēt divu veidu failus.
  - ▶ Atlasiet **Template** (Veidne) ekrānā Create Run (Izveidot izpildi), lai izveidotu jaunu plāksnes izkārtojumu. Veidnes failā ir importēšanai piemērotie kolonnu virsraksti. Ievadiet paraugu informāciju katrā kolonnā par izpildāmajiem paraugiem. Izdzēsiet piemēra informāciju neizmantotajās šūnās un pēc tam saglabājat failu.
  - ▶ Izmantojiet parauga informācijas failu, kas tika eksportēts no Germline Variant moduļa, izmantojot funkciju Export (Eksportēt).
- 2 Atlasiet ikonu  **Print** (Drukāt), lai parādītu plāksnes izkārtojumu.
- 3 Atlasiet **Print** (Drukāt), lai izdrukātu plāksnes izkārtojumu kā atsauci bibliotēku sagatavošanai.
- 4 **[Neobligāti]** Atlasiet **Export** (Eksportēt), lai paraugu informāciju eksportētu uz ārēju failu. Pārliecinieties, ka manifesta un paraugu informācija ir pareiza. Nepareiza informācija var ietekmēt rezultātus.
- 5 Atlasiet **Save Run** (Saglabāt izpildi).

## Izpildes rediģēšana

Norādījumus par informācijas rediģēšanu jūsu izpildē pirms sekvencēšanas skatiet *NextSeq 550Dx instrumenta atsauces rokasgrāmata (dokuments Nr. 1000000009513)*.

## Analīzes metodes

Germline Variant analīzes modulis veic tālāk norādītās analīzes darbības un analīzes izvades failus pēc tam ieraksta mapē Alignment (Izvietojums).

- ▶ Demultipleksē indeksu nolasījumus
- ▶ Ģenerē FASTQ failus
- ▶ Izvieto atbilstoši atsaucei
- ▶ Identificē variantus

## Demultipleksēšana

Veicot dekompleksēšanu, katra indeksa nolasīšanas sekvenca tiek salīdzināta ar indeksu sekvencēm, kuras ir norādītas attiecīgajai izpildei. Šajā darbībā netiek ņemtas vērā nekādas kvalitātes vērtības.

Indeksu nolasījumi tiek identificēti, izmantojot tālāk norādītās darbības.

- ▶ Paraugi tiek numurēti, sākot no 1, pamatojoties uz secību, kādā tie ir uzskaitīti attiecīgajai izpildei.
- ▶ Parauga numurs 0 ir rezervēts klasteriem, kas nebija piešķirti paraugam.
- ▶ Klasteri tiek piešķirti paraugam, ja indeksa sekvenca sakrīt precīzi vai ja katrā indeksa nolasījumā ir ne vairāk kā viena neatbilstība.

## FASTQ failu ģenerēšana

Pēc demultipleksēšanas programmatūra ģenerē starpposma analīzes failus FASTQ formātā — tas ir teksta formāts, kuru izmanto sekvenču attēlošanai. FASTQ failos ir nolasījumi katram paraugam un saistītie kvalitātes vērtējumi. Klasteri, kas neizturēja filtra prasības, tiek izslēgti.

Katrā FASTQ failā ir nolasījumi tikai par vienu paraugu, un šī parauga nosaukums ir iekļauts FASTQ faila nosaukumā. FASTQ faili ir galvenā ievade izvietošanai. Katram paraugam tiek ģenerēti astoņi FASTQ faili — četri no izpildes Read 1 (1. nolasījums) un četri no izpildes Read 2 (2. nolasījums).

## Izvietošana

Izvietošanas darbības laikā joslotais Smita-Vatermana (Smith-Waterman) algoritms katra parauga klasterus izvieto pret manifesta failā norādītajām amplikona sekvencēm.

Joslotais Smita-Vatermana algoritms veic semiglobālu sekvenču izvietošanu, lai noteiktu līdzīgus reģionus starp divām sekvencēm. Tā vietā, lai salīdzinātu visu sekvenci, Smita-Vatermana algoritms salīdzina visu iespējamo garumu segmentus.

Katrs sapārotu galu nolasījums tiek novērtēts attiecībā uz tā izvietošanu pret šī nolasījuma attiecīgajām zondes sekvencēm.

- ▶ 1. nolasījums tiek vērtēts pret lejupstraumes lokusam raksturīgo oligoelementu (Downstream Locus-Specific Oligos — DLSO) reverso papildinājumu.
- ▶ 2. nolasījums tiek vērtēts pret augšupstraumes lokusam raksturīgajiem oligoelementiem (Upstream Locus-Specific Oligos — ULSO).
- ▶ Ja nolasījuma sākums atbilst zondes sekvencai tā, ka nav vairāk par trīs atšķirībām (neatbilstībām vai nobīdēm vadošo iespraudumu dēļ), viss nolasījuma garums tiek izvietots pret amplikona mērķi šai sekvencai.
- ▶ Ņemot vērā testa ķīmiju, iespraudumi DLSO un ULSO robežās netiek novēroti.

Izvietojumi tiek atfiltrēti no izvietojumu rezultātiem, pamatojoties uz neatbilstību koeficientiem vai nu interesējošajos reģionos, vai visā amplikonā, atkarībā no amplikona garuma. Atfiltrētie izvietojumi tiek ierakstīti izvietojuma failos kā neizvietoti un netiek izmantoti variantu noteikšanā.

## Variantu noteikšana

Illumina izstrādātais variantu noteicējs Pises Variant Caller identificē DNA paraugā esošos variantus.



Pises variantu noteicējs SNV, MNV un mazus iespraudumus identificē, izpildot 3 tālāk aprakstītās darbības.

- ▶ Atsevišķi apsver katru pozīciju atsaucēs genomā
- ▶ Saskaita konkrētajā pozīcijā esošās bāzes izvietotajiem nolasījumiem, kas pārklājas ar šo pozīciju
- ▶ Aprēķina varianta novērtējumu, kas mēra noteikšanas kvalitāti, izmantojot Puasona modeli. Varianti, kuru kvalitātes novērtējums ir zemāks par Q20, tiek izslēgti.

Ja variants sekmīgi iztur visus filtrus, šis variants VCF tiek atzīmēts kā PASS .

Plašāku informāciju skatiet vietnē [github.com/Illumina/Piscis/wiki](https://github.com/Illumina/Piscis/wiki).

## Izpildes un parauga datu skatīšana

- 1 Local Run Manager informācijas panelī noklikšķiniet uz izpildes nosaukuma.
- 2 Cilnē Run Overview (Izpildes pārskats) apskatiet sekvencēšanas izpildes metriku.
- 3 **[Neobligāti]** Noklikšķiniet uz ikonas **Copy to Clipboard**  (Kopēt starpliktuvē), lai nokopētu izvades izpildes mapes ceļu.
- 4 Noklikšķiniet uz cilnes Sequencing Information (Sekvencēšanas informācija), lai apskatītu informāciju par izpildes parametriem un palīgmateriāliem.
- 5 Noklikšķiniet uz cilnes Samples and Results (Paraugi un rezultāti), lai apskatītu analīzes atskaites atrašanās vietu.
  - ▶ Ja analīze tika atkārtota, izvērsiet nolaižamo sarakstu Select Analysis (Atlasīt analīzi) un atlasiet atbilstošo analīzi.
- 6 Noklikšķiniet uz ikonas **Copy to Clipboard**  (Kopēt starpliktuvē), lai nokopētu analīzes mapes ceļu.

Plašāku informāciju par cilnēm Run Overview (Izpildes pārskats) un Sequencing Information (Sekvencēšanas informācija) un par to, kā analīzi ielikt rindā atkārtoti, skatiet dokumentā *NextSeq 550Dx instrumenta atsaucēs rokasgrāmata (dokuments Nr. 1000000009513)*.

## Analīzes atskaite

Analīzes rezultātu kopsavilkums ir atrodams cilnē Samples and Results (Paraugi un rezultāti) un kā apkopota atskaite mapē Alignment (Izvietojums). Atskaite par katru paraugu ir pieejama arī PDF faila formātā katram paraugam.

## Cilnes Samples and Results informācija

1 Lai redzētu parauga atskaiti, noklikšķiniet uz sarakstā esoša parauga.

**1. tabula Izpildes un paraugu informācija**

Kolonnas virsraksts	Apraksts
Run Status (Izpildes statuss)	Norāda, vai sekvencēšanas izpilde bija sekmīga vai nesekmīga.
Total Yield (GB) (Kopējais ieguvums (GB))	Sekvencēšanas izpildē noteikto bāzu skaits. Tiek rādīta sekmīgas izpildīšanas sliekšņvērtība un sekmīgas vai nesekmīgas izpildes statuss.
% ≥ Q30	Tādu nolasījumu procentuālais daudzums sekvencēšanas izpildē, kuru kvalitātes novērtējums ir 30(Q30) vai lielāks. Tiek rādīta sekmīgas izpildīšanas sliekšņvērtība un sekmīgas vai nesekmīgas izpildes statuss.
Sample ID (Parauga ID)	Parauga ID, kurš tika norādīts, veidojot izpildi.
Total PF Reads (PF nolasījumi kopā)	Filtra prasības izturējušo nolasījumu kopējais skaits.
Read 1% ≥ Q30 (2. nolasījuma % ≥ Q30)	Tādu nolasījumu procentuālais daudzums 1. nolasījumā, kuru kvalitātes novērtējums šim paraugam ir 30(Q30) vai lielāks.
Read 2% ≥ Q30 (2. nolasījuma % ≥ Q30)	Tādu nolasījumu procentuālais daudzums 2. nolasījumā, kuru kvalitātes novērtējums šim paraugam ir 30(Q30) vai lielāks.
Autosome Call Rate (Autosomu noteikšanas koeficients)	Genomisko pozīciju skaits autosomās (no 1. līdz 22. hromosomai), kas atbilst iepriekš definētajai pārliecības vērtības sliekšņvērtībai, dalīts ar izvaicāto autosomālo genomisko pozīciju kopējo skaitu. Noteikšanas koeficients ir norādīts uz parauga bāzes, un tas tiek ziņots kā procentuālais daudzums, kurš ir aprēķināts kā 1 mīnus (autosomālo pozīciju skaits ar nepilnīgu noteikšanu, dalīts ar sekvencēto autosomālo pozīciju kopējo skaitu).

**2. tabula Sample Report informācija**

Kolonnas virsraksts	Apraksts
Sample (Paraugs)	Parauga ID, kurš tika norādīts, veidojot izpildi.
Report Date (Atskaites datums)	Atskaites ģenerēšanas datums.
Sample Information (Paraugu informācija)	Parauga ID, kurš tika norādīts, veidojot izpildi, kopējais filtru izturējušo nolasījumu skaits šajā paraugā, tādu nolasījumu procentuālais daudzums šim paraugam, kuru kvalitātes novērtējums ir 30(Q30) vai lielāks, un autosomālās noteikšanas koeficients.
Amplicon Summary (Amplikonu kopsavilkums)	Kopējais sekvencēto amplikonu reģionu skaits un kopējais sekvencēto amplikonu bāzu pāru garums mērķa reģionos šim paraugam un manifesta failam. Manifesta fails norāda atsaucē genomu un mērķa atsaucē reģionus, kuri tika izmantoti izvietojuma darbībā.
Read Level Statistics (Nolasījuma līmeņa statistika)	Parauga nolasījumu skaits un procentuālais daudzums, kas noklāj katru pozīciju atsaucē 1. nolasījumam un 2. nolasījumam.
Variants Summary (Variantu kopsavilkums)	Konstatēto SNV, ievietojumu un izdzēsumu skaits tādā paraugā, kurš sekmīgi nokārtoja ierosinātās vērtības, lai noteiktu, vai kvalitātes rezultāti atbilst pieņemamajam diapazonam.
Coverage Summary (Pārklājuma kopsavilkums)	Izvietoto bāzu kopējais skaits, dalīts ar mērķa reģiona lielumu, un amplikonu reģionu procentuālais daudzums ar pārklājuma vērtībām, kuras ir lielākas par zemā pārklājuma sliekšņvērtību $0,2 * \text{amplikonu vidējais pārklājums}$ , šim paraugam.



Kolonnas virsraksts	Apraksts
Coverage Plots (Pārklājumu diagrammas)	Diagrammā Coverage by Amplicon Region (Pārklājums pēc amplicona reģiona) attiecīgajam paraugam ir redzams pārklājums ampliconu reģionos. Reģioni, kuru pārklājuma vērtības ir mazākas par pārklājuma sliekšņvērtību, ir izcelti sarkanā krāsā. Visu vērtību vidējā vērtību ir norāda ar oranžu līniju.
Software Versions (Programmatūras versijas)	Programmatūras versijas, kad tika veikta parauga sekvencēšana. Ietver NextSeq 550Dx vadības programmatūras (NOS), Local Run Manager programmatūras, RTA programmatūras un Germline Variant Module versiju.

## Analīzes izvades faili

Germline Variant analīzes modulim tiek ģenerēti tālāk norādītie analīzes izvades faili, un tie sniedz analīzes rezultātus attiecībā uz izvietojumu un variantu noteikšanu. Analīzes izvades faili atrodas mapē Alignment (Izvietojums).

Faila nosaukums	Apraksts
Demultipleksēšana (*.txt)	Starposma faili, kuros ir demultipleksēšanas kopsavilkuma rezultāti.
FASTQ (*.fastq.gz)	Starposma faili, kuros ir bāzu noteikšanas ar kvalitātes novērtējumu. FASTQ faili ir galvenā ievade izvietojuma darbībai.
Izvietojuma faili BAM formātā (*.bam)	Satur izvietotus nolasījumus attiecīgajam paraugam.
Variantu noteikšanas faili genoma VCF formātā (*.genome.vcf.gz)	Satur genotipu katrai pozīcijai, neatkarīgi no tā, vai noteikti kā variants vai noteikti kā atsauce.
Variantu noteikšanas faili VCF formātā (*.vcf.gz)	Satur visus noteiktos variantus mērķa reģionā.
AmpliconCoverage_M1.tsv	Satur informāciju par pārklājumu uz ampliconu katrā paraugā katram norādītajam manifestam. M# apzīmē manifesta numuru.

## Demultipleksēšanas failu formāts

Demultipleksēšanas procesā tiek nolasīta katram klasterim pievienotā indeksu sekvence, lai noteiktu, no kura parauga attiecīgais klasteris ir radies. Kartēšana starp klasteriem un parauga numuru tiek ierakstīta demultipleksēšanas (\*.demux) failā katram plūsmas šūnas elementam.

Demultipleksēšanas faila nosaukumdošanas formāts ir **s\_1\_X.demux**, kur X ir elementa numurs.

Demultipleksēšanas faili sākas ar galveni:

- ▶ Versija (4 baitu vesels skaitlis), pašlaik 1
- ▶ Klasteru skaits (4 baitu vesels skaitlis)

Faila atlikusī daļa sastāv no paraugu numuriem katram klasterim no attiecīgā elementa.

Kad demultipleksēšanas darbība ir pabeigta, programmatūra ģenerē demultipleksēšanas failu ar nosaukumu **DemultiplexSummaryF1L1.txt**.

- ▶ Faila nosaukumā **F1** norāda plūsmas šūnas numuru.
- ▶ Faila nosaukumā **L1** norāda joslas numuru.
- ▶ Demultipleksēšanas rezultāti tabulā ar 1 rindu katram elementam un 1 kolonnu katram paraugam, tostarp paraugam 0.
- ▶ Indeksu nolasīšanās visbiežāk sastopamās sekvenču.

## FASTQ failu formāts

FASTQ ir teksta failu formāts, kurā ir bāzu noteikšanas un kvalitātes vērtības katram nolasījumam. Katrā ierakstā ir 4 tālāk norādītās rindas.

- ▶ Identifikators
- ▶ Sekvence
- ▶ Plus zīme (+)
- ▶ Phred kvalitātes novērtējumi ASCII + 33 kodētā formātā

Identifikators ir formatēts šādi:

**@Instruments:IzpildesID:PlūsmasŠūnasID:Josla:Elements:X:Y**  
**NolasījumaNum:FiltraKarodziņš:0:ParaugaNumurs**

Piemērs:

```
@SIM:1:FCX:1:15:6329:1045 1:N:0:2
TCGCACTCAACGCCCTGCATATGACAAGACAGAATC
+
<>;##=><9=AAAAAAAAAA9#:<#<;<<<????#=#
```

## BAM failu formāts

BAM fails (\*.bam) ir SAM faila kompresēta binārā versija, kas tiek izmantota, lai attēlotu izvietotās sekvenču līdz 128 Mb lielumā. SAM un BAM formāti ir plašāk aprakstīti dokumentā [samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf](https://samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf).

BAM failos tiek izmantots nosaukumdošanas formāts **ParaugaNosaukums\_S#.bam**, kur # ir parauga numurs, kuru nosaka secība, kādā paraugi ir norādīti izpildei.

BAM failos ir galvenes sekcija un izvietojuma sekcija.

- ▶ **Header** (Galvene) — satur informāciju par visu failu, piemēram, parauga nosaukumu, parauga garumu un izvietojuma metodi. Izvietojumi izvietojumu sekcijā ir saistīti ar konkrētu informāciju galvenes sekcijā.
- ▶ **Alignments** (Izvietojumi) — satur nolasījuma nosaukumu, nolasījuma sekvenci, nolasījuma kvalitāti, izvietojuma informāciju un pielāgotus tagus. Nolasījuma nosaukums ietver hromosomu, sākuma koordināti, izvietojuma kvalitāti un atbilstības deskriptora virkni.

Izvietojumu sekcijā par katru nolasījumu vai nolasījumu pāri ir iekļauta tālāk norādītā informācija.

- ▶ **AS:** sapāroto galu izvietojuma kvalitāte
- ▶ **RG:** nolasījumu grupa, kura norāda nolasījumu skaitu konkrētam paraugam.
- ▶ **BC:** svītrkoda tags, kurš norāda demultipleksētā parauga ID, kurš ir saistīts ar šo nolasījumu.
- ▶ **SM:** atsevišķo galu izvietojuma kvalitāte.
- ▶ **XC:** atbilstības deskriptora virkne
- ▶ **XN:** amplikona nosaukuma tags, kurš ieraksta ar nolasījumu saistīto amplikona ID

BAM indeksa faili (\*.bam.bai) nodrošina atbilstošā BAM faila indeksu.

## VCF failu formāts

Variantu noteikšanas formāts (Variant Call Format — VCF) ir parasti izmantotais faila formāts, ko ir izstrādājuši genomikas zinātnieku kopiena. Tajā ir informācija par variantiem, kas ir atrasti noteiktās atsaucēs genomā pozīcijās. VCF faili beidzas ar sufiksu .vcf

VCF faila galvenā ir VCF failu formāta versija un variantu noteicēja versija, kā arī uzskaitītas atlikušajā faila daļā izmantotās anotācijas. VCF galvenē ietilpst arī atsaucēs genomā fails un BAM fails. Galvenes pēdējā rindā ir kolonnu virsraksti datu rindām. Katrā VCF faila datu rindā ir informācija par vienu variantu.

## VCF failu virsraksti

Virsraksts	Apraksts
CHROM	Atsaucēs genomā hromosoma. Hromosomas ir redzamas tādā pašā secībā kā atsaucēs FASTQ failā.
POS	Varianta vienas bāzes pozīcija atsaucēs hromosomā. Attiecībā uz SNP šī pozīcija ir atsaucēs bāze ar variantu; attiecībā uz iespraudumiem vai izdzēsumiem šī pozīcija ir atsaucēs bāze tieši pirms varianta.
ID	Varianta rs numurs, kas ir iegūts no dbSNP.txt, ja piemērojams. Ja šajā vietā ir vairāki rs numuri, saraksta elementi ir atdalīti ar semikolu. Ja šajā pozīcijā nav neviena dbSNP ieraksta, tiek izmantots trūkstošas vērtības marķieris ('.') .
REF	Atsaucēs genotips. Piemēram, vienas T dzēšana tiek parādīta kā atsaucēs TT un alternatīvā T. Vienas nukleotīdu sekvenču variants no A uz T tiek parādīts kā atsaucēs A un alternatīvā T.
ALT	Alēles, kas atšķiras no atsaucēs nolasījuma. Piemēram, vienas T ievietošana tiek parādīta kā atsaucēs A un alternatīvā AT. Vienas nukleotīdu sekvenču variants no A uz T tiek parādīts kā atsaucēs A un alternatīvā T.
QUAL	Variantu noteicēja piešķirts kvalitātes novērtējums pēc Phred skalas. Augstāki vērtējumi norāda uz augstāku pārliecību par variantu un zemāku kļūdu iespējamību. Kvalitātes novērtējumam Q aplēstā kļūdu iespējamība ir $10^{-(Q/10)}$ . Piemēram, Q30 noteikšanas gadījumā kopai kļūdu intensitāte ir 0,1%. Daudzi variantu noteicēji savus kvalitātes novērtējumus piešķir, pamatojoties uz saviem statistiskajiem modeļiem, kuri ir augsti attiecībā pret novēroto kļūdu intensitāti.

## VCF failu anotācijas

Virsraksts	Apraksts
<b>FILTER (Filtrs)</b>	<p>Ja ir sekmīgi nokārtoti visi filtri, filtra kolonnā ir rakstīts <b>PASS</b> (Nokārtots).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>LowDP</b> — lietots vietām, kuru pārklājuma dziļums ir zem 150x. Amplikonu pozīcijām, kuras pārklāj gan nolasīšana uz priekšu, gan nolasīšana atpakaļ, tas ir līdzvērtīgs 300 sapārotu galu nolasījumiem, kas savstarpēji pārklājas.</li> <li>• <b>q20</b> — kvalitātes novērtējums &lt; 20.</li> <li>• <b>MultiAllelicSite</b> — variants neatbilst diploīda modelim.</li> <li>• <b>R5x9</b> — blakus esošo atkārtojumu (kuru garums ir no 1 līdz 5 bp) skaits uz variantu noteikšanas gadījumiem ≥ 9.</li> <li>• <b>SB</b> — dzīslas nosliece pārsniedz doto sliekšņvērtību.</li> </ul>
<b>INFO</b>	<p>Kolonnā INFO (Informācija) tostarp var būt tālāk norādītie ieraksti.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>AC</b> — alēļu skaits genotipos katrai ALT alēlei, tādā pašā secībā, kā norādīts.</li> <li>• <b>AF</b> — alēļu frekvence katrai ALT alēlei, tādā pašā secībā, kā norādīts.</li> <li>• <b>AN</b> — kopējais alēļu skaits noteiktajos genotipos.</li> <li>• <b>CD</b> — karodziņš, kurš norāda, ka SNP notiek eksonā ar vismaz 1 RefGene ierakstu.</li> <li>• <b>DP</b> — dziļums (skaits bāzu noteikšanām, kuras ir izvietotas pozīcijā un izmantotas variantu noteikšanā).</li> <li>• <b>Exon</b> — komatadalīts saraksts ar eksonu reģioniem, kas ir nolasīti no RefGene.</li> <li>• <b>FC</b> — funkcionālas sekas.</li> <li>• <b>GI</b> — komatadalīts saraksts ar gēnu ID, kas ir nolasīti no RefGene.</li> <li>• <b>QD</b> — varianta pārliecība/kvalitāte pēc dziļuma.</li> <li>• <b>TI</b> — komatadalīts saraksts ar norakstu ID, kas ir nolasīti no RefGene.</li> </ul>
<b>FORMAT (Formāts)</b>	<p>Formāta kolonnā ir uzskaitīti lauki, un tie ir atdalīti ar koloniem. Piemēram, GT:GQ. Sniegtais lauku saraksts ir atkarīgs no izmantotā variantu noteicēja. Tostarp ir pieejami tālāk norādītie lauki.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>AD</b> — ieraksts formā X,Y, kur X ir atsaucis noteikšanas gadījumu skaits un Y ir alternatīvo noteikšanas gadījumu skaits.</li> <li>• <b>DP</b> — aptuvenš nolasīšanas dziļums; tiek atfiltrēti nolasījumi ar MQ=255 vai ar sliktu atbilstību.</li> <li>• <b>GQ</b> — genotipa kvalitāte.</li> <li>• <b>GT</b> — genotips. 0 atbilst atsaucis bāzei, 1 atbilst pirmajam ierakstam kolonnā ALT un tā tālāk. Uz priekšu vērstā slīpsvītra (/) norāda, ka nav pieejama nekāda informācija par fāzēšanu.</li> <li>• <b>NC</b> — to bāzu daļa, kuras netika noteiktas vai kuru bāzu noteikšanas kvalitāte bija zem minimālās sliekšņvērtības.</li> <li>• <b>NL</b> — trokšņa līmenis; aplēse par bāzu noteikšanas troksni šajā pozīcijā.</li> <li>• <b>SB</b> — dzīslas nosliece šajā pozīcijā. Lielākas negatīvās vērtības norāda uz mazāku noslieci; vērtības tuvu 0 norāda uz lielāku noslieci.</li> <li>• <b>VF</b> — variantu frekvence; alternatīvo alēli atbalstošo nolasījumu procentuālais daudzums.</li> </ul>
<b>SAMPLE (Paraugs)</b>	Parauga kolonna ir vērtības, kuras ir norādītas kolonnā FORMAT (Formāts).

## Genoma VCF faili

Genoma VCF (gVCF) faili ir VCF v4.1 faili, kuros tiek izmantota kopa ar metodēm visu genoma vietu attēlošanai saprātīgi kompaktā formātā. gVCF (\*.genome.vcf.gz) failos katram paraugam vienā failā ir visas interesējošajā reģionā esošās vietas.

gVCF failā ir parādītas nenoteiktās vietas tajās pozīcijās, kas nav izturējušas visus filtrus. **genotipa (GT) tags./.** norāda uz nenoteikšanu.

Plašāku informāciju skatiet vietnē [sites.google.com/site/gvcftools/home/about-gvcf](https://www.google.com/site/gvcftools/home/about-gvcf).

## Amplikona pārklājuma fails

Katram manifesta failam tiek ģenerēts viens amplikona pārklājuma fails. Faila nosaukumā M# norāda manifesta numuru.

Katrā failā ir galvenes rinda, kur ir ar manifestu saistītie paraugu ID. Failā ir tālāk norādītā informācija.

- ▶ Mērķa ID, kāds ir norādīts manifestā.
- ▶ Pārklājuma dziļums tiem nolasījumiem, kas sekmīgi iztur filtru.

## Papildu izvades faili

Tālāk norādītie izvades faili sniedz papildu informāciju vai apkopo izpildes rezultātus un analīzes kļūdas. Lai gan šie faili nav nepieciešami, lai novērtētu analīzes rezultātus, tos var izmantot problēmu novēršanai. Ja vien nav norādīts citādi, visi faili atrodas mapē Alignment (Izvietojums).

Faila nosaukums	Apraksts
AnalysisLog.txt	Apstrādes žurnāls, kurā ir aprakstīta katra darbība, kas notika pašreizējās izpildes mapes analīzes laikā. Šajā failā nav kļūdu ziņojumu. Atrodas mapē Alignment (Izvietojums).
AnalysisError.txt	Apstrādes žurnāls, kurā ir uzskaitītas visas kļūdas, kas notika analīzes laikā. Ja nav bijis nevienas kļūdas, šis fails ir tukšs. Atrodas mapē Alignment (Izvietojums).
DemultiplexSummaryF1L1#.txt	Ziņo demultipleksēšanas rezultātus tabulā ar 1 rindu katram elementam un 1 kolonnu katram paraugam. Ar # ir apzīmēta plūsmas šūnas josla 1, 2, 3 vai 4. Atrodas mapē Alignment (Izvietojums).
AmpliconRunStatistics.xml	Satur kopsavilkumu par izpildei raksturīgo statistisko informāciju. Atrodas mapē Alignment (Izvietojums).

## Analīzes mape

Analīzes mapē ir faili, kurus ir ģenerējusi programmatūra Local Run Manager.

Izvades mapes un analīzes mapes attiecību kopsavilkums.

- ▶ Sekvencēšanas laikā reāllaika analīze (Real-Time Analysis — RTA) aizpilda izvades mapi ar failiem, kuri ir ģenerēti attēla analīzes, bāzu noteikšanas un kvalitātes novērtēšanas laikā.
- ▶ RTA kopē failus uz analīzes mapi reāllaikā. Kad RTA piešķir kvalitātes novērtējumu katrai bāzei katrā ciklā, programmatūra ieraksta failu RTAComplete.txt abās mapēs.
- ▶ Kad ir pieejams fails RTAComplete.txt, sākas analīze.
- ▶ Analīzei turpinoties, programmatūra Local Run Manager ieraksta izvades failus analīzes mapē un pēc tam kopē šos failus atpakaļ uz izvades mapi.

## Izvietojuma mapes

Katru reizi, kad analīze tiek ielikta rindā atkārtoti, Local Run Manager izveido izvietošanas mapi ar nosaukumu Alignment\_N, kur N ir kārtas numurs.

## Mapju struktūra

**Alignment** (Izvietojums) — satur \*.bam, \*.vcf, FASTQ failus un failus, kas ir raksturīgi attiecīgajam analīzes modulim.

**Date and Time Stamp** (Datuma un laika spiedogs) — analīzes Date\_time spiedogs formātā GGGGMMDD\_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** (Statistiskā informācija)
    - DemuxSummaryF1L1.txt
    - FastqSummaryF1L1.txt

**Data** (Dati)

- Intensities** (Intensitātes)
  - BaseCalls** (Bāzu nosaukšanas vienumi)
    - L001** — satur \*.bcl failus.
    - L001** — satur \*.locs failus.
  - RTA Logs** (RTA žurnāli) — satur žurnālfailus no RTA programmatūras analīzes.

**InterOp** — satur bināros failus, kas tiek izmantoti, lai ziņotu par sekvencēšanas izpildes metriku.

**Logs** (Žurnāli) — satur žurnālfailus, kuros ir aprakstītas sekvencēšanas laikā veiktās darbības.

- RTAComplete.txt
- RunInfo.xml
- RunParameters.xml

## Bāzu noteikšana un indeksu dažādība

Kad NextSeq 550Dx instrumentā paraugiem tiek veikta sekvenčēšana, ar bāzu noteikšanu tiek noteikta kāda bāze (A, C, G vai T) ikvienam klasterim attiecīgajā elementā jeb attēlveidošanas apgabalam plūsmas šūnā, konkrētā ciklā. NextSeq 550Dx instrumentā tiek izmantota divkanālu sekvenčēšana, kurai četru DNA bāzu iekodēšanai ir nepieciešami tikai divi attēli — viens no sarkanā kanāla un viens no zaļā kanāla.

Bāzu noteikšanas indeksa nolasīšanas process atšķiras no bāzu noteikšanas citu nolasīšanu laikā.

Indeksa nolasīšanai ir jāsākas ar vismaz vienu bāzi, kas nav G, kādā no pirmajiem diviem cikliem. Ja indeksa nolasīšana sākas ar diviem bāzes noteikšanas gadījumiem bāzei G, netiek ģenerēta nekāda signāla intensitāte. Lai nodrošinātu demultipleksēšanas veikspēju, kādā no pirmajiem diviem cikliem ir jābūt signālam.

Kad izpildes izveides laikā tiek atlasīti indeksi, tiek parādīts brīdinājums par zemu dažādību, ja indeksi neatbilst dažādības prasībām. Lai novērstu brīdinājumu par zemu dažādību, atlasiet indeksu sekvenčes, kas ikvienam ciklam nodrošina signālu abos kanālos.

- ▶ Sarkanais kanāls — A vai C
- ▶ Zaļais kanāls — A vai T

Šis bāzu noteikšanas process nodrošina precizitāti, analizējot paraugus ar zemu pleksa skaitli. Plašāku informāciju par jūsu indeksu sekvenčēm skatiet iepakojuma ieliktnī *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* (dokuments Nr. 1000000029772).

Kad programmā Local Run Manager veidojat izpildi, jums ir jāizvēlas testējamo paraugu skaits. Ierosinātās indeksu kombinācijas, kas atbilst indeksu dažādības prasībām, programmatūra aizpilda automātiski. Lai gan ierosinātās indeksu kombinācijas jums nav jāizmanto obligāti, tās izmantot ir ieteicams.

## Pārskatījumu vēsture

Dokuments	Datums	Izmaiņu apraksts
Dokumenta Nr. 1000000030329 v04	2021. gada augusts	Atjaunināta ES pilnvarotā pārstāvja adrese.
Dokumenta Nr. 1000000030329 v03	2020. gada aprīli	Atjaunināta ES pilnvarotā pārstāvja adrese. Atjaunināta Austrālijas sponsora adrese.
Dokuments Nr. 1000000030329 v02	2019. gada janvāris	Pievienota informācija par v2.5 reaģentu komplektiem.
Dokumenta Nr. 1000000030329 v01	2018. gada augusts	Atjaunināts normatīvais marķējums.
Dokumenta Nr. 1000000030329 v00	2017. gada novembris	Sākotnējais laidziens.



## Tehniskā palīdzība

Lai saņemtu tehnisko palīdzību, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.

Tīmekļa vietne: [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
E-pasta adrese: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

Illumina klientu atbalsta dienesta tālruņa numuri

Reģions	Bezmaksas	Reģionālais
Ziemeļamerika	+1.800.809.4566	
Apvienotā Karaliste	+44 8000126019	+44 2073057197
Austrālija	+1.800.775.688	
Austrija	+43 800006249	+43 19286540
Beļģija	+32 80077160	+32 34002973
Dānija	+45 80820183	+45 89871156
Francija	+33 805102193	+33 170770446
Honkonga	800960230	
Itālija	+39 800985513	+39 236003759
Īrija	+353 1800936608	+353 016950506
Japāna	0800.111.5011	
Jaunzēlande	0800.451.650	
Ķīna	400 066 5835	
Nīderlande	+31 8000222493	+31 207132960
Norvēģija	+47 800 16836	+47 21939693
Singapūra	+1.800.579.2745	
Somija	+358 800918363	+358 974790110
Spānija	+34 911899417	+34 800300143
Šveice	+41 565800000	+41 800200442
Taivāna	00806651752	
Vācija	+49 8001014940	+49 8938035677
Zviedrija	+46 850619671	+46 200883979
Citas valstis	+44.1799.534000	

Drošības datu lapas (DDL) — pieejamas Illumina tīmekļa vietnē: [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

Produkta dokumentācija — pieejama lejupielādei PDF formātā Illumina tīmekļa vietnē. Dodieties uz vietni [support.illumina.com](http://support.illumina.com), atlasiet produktu un pēc tam atlasiet **Documentation & Literature** (Dokumentācija un literatūra).



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122, ASV  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (ārpus Ziemeļamerikas)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com

CE



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

**Sponsors Austrālijā**

Illumina Australia Pty Ltd  
Māsu asociācijas ēka  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Austrālija

**TIKAI IN VITRO DIAGNOSTIKAS NOLŪKIEM**

© 2021 Illumina, Inc. Visas tiesības paturētas.

**illumina®**