

Local Run Manager

Varianti somatik Moduli i analizës

Udhëzues i rrjedhës së punës për NextSeq 550Dx

PËR PËRDORIM DIAGNOSTIKUES IN VITRO

Përmbledhje	3
Fusni Informacionin e ekzekutimit	4
Metodat e analizës	6
Shikoni të dhënat e ekzekutimit dhe të mostrës	7
Raporti i analizës	8
Skedarët e rezultateve të analizës	9
Identifikimi bazë dhe larmia e indeksit	17
Historia e ndryshimeve	18
Asistenca teknike	19



Ky dokument dhe përmbajtja e tij janë pronë e Illumina, Inc. dhe filialeve të saj ("Illumina"), dhe janë të destinuara vetëm për përdorim kontraktual nga klienti i saj në lidhje me përdorimin e produktit/produkteve të përshkruara këtu dhe për asnjë qëllim tjetër. Ky dokument dhe përmbajtja e tij nuk do të përdoren ose shpërndahen për ndonjë qëllim tjetër dhe/ose nuk do të komunikohen, zbulohen ose riprodhohen në asnjë mënyrë tjetër pa pëlqimin paraprak me shkrim të Illumina-s. Illumina nuk transferon asnjë liçensë sipas patentës, markës tregtare, të drejtës së autorit ose të drejtave të saj të së drejtës së zakonshme, as të drejtave të ngjashme të ndonjë pale të tretë me anë të këtij dokumenti.

Udhëzimet në këtë dokument duhet të ndiqen në mënyrë strikte dhe të qartë nga një personel i kualifikuar dhe i trajnuar siç duhet, në mënyrë që të sigurohet përdorimi i duhur dhe i sigurt i produktit/produkteve të përshkruara këtu. E gjithë përmbajtja e këtij dokumenti duhet të lexohet dhe kuptohet plotësisht përpara se të përdoren produkte të tillë.

MOSLEXIMI DHE MOSNDJEKJA PLOTËSISHT E TË GJITHA UDHËZIMEVE TË PËRMBLEDHURA KËTU MUND TË REZULTOJË NË DËMTIM TË PRODUKTIT(VE), LËNDIM TË PERSONAVE, PËRFSHIRË PËRDORUES OSE TË TJERË, DHE DËMTIME TË PRONËS TJETËR, DHE DO TË ANULOJË ÇDO GARANCI TË ZBATUESHME PËR PRODUKTIN(ET).

ILLUMINA NUK MERR PËRSIPËR ASNJË PËRGJEGJËSI QË RRJEDH NGA PËRDORIMI I PAPËRSHTATSHËM I PRODUKTIT/PRODUKTEVE TË PËRSHKRUARA KËTU (PËRFSHIRË PJESËT E TYRE APO SOFTUERIN).

© 2021 Illumina, Inc. Të gjitha të drejtat të rezervuara.

Të gjitha markat tregtare janë pronë e Illumina, Inc. ose e pronarëve të tyre përkatës. Për informacion specifik mbi markën tregtare, shihni www.illumina.com/company/legal.html.

Përmbledhje

Moduli i analizës së varianteve somatike i Local Run Manager është për përdorim me analizën e Kompletit të personalizueshëm të amplikonit Illumina TruSeq Dx dhe NextSeq 550Dx. Kur përdoret me modulën e variantit somatik, analiza ka për qëllim përgatitjen e bibliotekave të përdorura për renditjen e ADN-së nga indet e fiksuara në formalinë dhe të ngulitura në parafinë (FFPE). Analiza zbulon mutacionet somatike në frekuenca të ulëta variantesh.

Moduli i analizës vlerëson rajone të shkurtra të ADN-së së amplifikuar, ose amplikone, për variante. Renditja e fokusuar e amplikoneve mundëson mbulim të lartë të rajoneve të veçanta në një numër të madh mostrash. Moduli i analizës kryen analiza dytësore dhe krijim raportesh nga ekzekutimet e renditjes duke përdorur një metodë me dy fije që përfshin një grup përpara dhe prapa oligo-bazash. Shihni fletushkën e paketimit *Kompleti i personalizimit të amplikonit TruSeq Dx (dokumenti # 1000000029772)*.

Moduli i analizës së varianteve somatike kërkon materiale të konsumueshme për renditje me 300 cikle. Për më shumë informacion, shihni fletushkën e paketimit të *Kompletit të reagentit me rezultat të lartë NextSeq 550Dx v2* ose *Kompletit të reagentit me rezultat të lartë NextSeq 550Dx v2.5*.

Rreth këtij udhëzuesi

Ky udhëzues ofron udhëzime për konfigurimin e parametrave të ekzekutimit për renditjen dhe analizën për modulën e analizës Varianti somatik. Për informacion në lidhje me cilësimet e panelit të kontrollit dhe të sistemit Local Run Manager, shihni *Udhëzuesi i referencës së instrumentit NextSeq 550Dx (dokumenti # 1000000009513)*.

Duke parë Local Run Manager

Ndërfaqja e Local Run Manager shihet brenda Softuerin operativ NextSeq 550Dx (NOS) ose përmes një shfletuesi interneti. Shfletuesi i mbështetur i internetit është Chromium.



VINI RE

Nëse përdorni një shfletues të pambështetur, shkarkoni shfletuesin e mbështetur kur të shfaqet mesazhi "Confirm Unsupported Browser" (Konfirmoni shfletuesin e pambështetur). Zgjidh "**here**" (këtu) për të shkarkuar versionin e mbështetur të Chromium.

Shiko në Monitorin e instrumentit

- 1 Për të parë ndërfaqen e Local Run Manager në monitorin e instrumentit, zgjidhni një nga opsionet e mëposhtme:
 - ▶ Nga NOS Home Screen (Ekrani kreu), zgjidhni **Local Run Manager** (Menaxheri i ekzekutimit lokal). Klikoni X në këndin e sipërm djathtas për t'u kthyer te NOS kur të keni mbaruar.
 - ▶ Zgjidhni NOS ikonën Minimize (Minimizoni), hapni shfletuesin ueb Chromium që ndodhet në instrument dhe shkruani **http://localhost** në shiritin e adresës. Vetëm përdoruesit administratorë mund ta minimizojnë NOS.

Pamja nga një kompjuter i lidhur në rrjet

- 1 Hapni një shfletues ueb Chromium në një kompjuter me akses në të njëjtin rrjet si instrumenti dhe lidhni duke përdorur adresën IP ose emrin e instrumentit. Për shembull, **http://myinstrument**.

Fusni Informacionin e ekzekutimit

Caktoni parametrat

- 1 Identifikohuni në Local Run Manager.
- 2 Zgjidhni **Create Run** (Krijoni ekzekutimin) dhe zgjidhni **Somatic Variant** (Varianti somatik).
- 3 Fusni një emër ekzekutimi që identifikon ekzekutimin nga renditja deri në analizë. Përdorni elementë alfanumerikë, hapësira, nënvizime ose viza.
- 4 **[Opsionale]** fusni një përshkrim të ekzekutimit për të ndihmuar në identifikimin e ekzekutimit. Përdorni elementë alfanumerikë, hapësira, nënvizime ose viza.
- 5 Zgjidhni numrin e mostrave dhe grupin e indekseve nga lista zbritëse. Konsideroni informacionin e mëposhtëm kur bëni një zgjedhje.
 - ▶ Lista zbritëse përmban numrat e mostrave me një grup indeksesh. Për shembull, 24-Set 1 tregon 24 mostra që do të analizohen, me indekse nga grupi i indeksit 1.
 - ▶ Numrat e grupit të indekseve i referohen grupeve të ndryshme të indekseve i5. Kompletet 1 dhe Kompletet 2 ofrojnë të dy larmi indeksi. Ofrohen dy grupe indeksesh për të ndihmuar në parandalimin e shterimit të një grupi të vetëm.
 - ▶ Zgjidhni numrin e mostrave që është më i afërt me numrin e mostrave që po analizoni. Nëse numri i saktë i mostrave nuk është në listë, zgjidhni numrin më të afërt, por më të vogël se numri që po analizoni. Për shembull, nëse doni të analizoni 18 mostra, zgjidhni 16 mostra.
 - ▶ (Mostra e sugjeruar) Puset dhe kombinimet e indeksit të Sample (Mostrës) që plotësojnë kërkesat e larmisë së indeksit janë të theksuara me ngjyrë jeshile. Nëse zgjidhni puse dhe kombinime të tjera indeksesh, kur e ruani ekzekutimin, do të merrni një njoftim nëse nuk plotësohen kërkesat e larmisë së indeksit.

Importoni skedarët e manifestit për ekzekutimin

- 1 Sigurohuni që manifestet që dëshironi të importoni janë të disponueshëm në një vendndodhje të aksesueshme në rrjet ose në një disk USB.
- 2 Zgjidhni **Import Manifests** (Importoni manifestet).
- 3 Shkoni te skedari i manifestit dhe zgjidhni manifestet që dëshironi të shtoni.



VINI RE

Për t'i bërë skedarët manifest të disponueshëm për të gjitha ekzekutimet duke përdorur modulën e analizës së Varianti somatik, shtoni manifeste duke përdorur veçorinë Module Settings (Cilësimet e modulit). Kjo veçori kërkon leje të nivelit të përdoruesit administrator. Për më shumë informacion, shihni *Udhëzuesi i referencës së instrumentit NextSeq 550Dx (dokumenti # 1000000009513)*.

Specifikoni mostrat për ekzekutimin

Specifikoni mostrat për ekzekutimin duke përdorur një nga opsionet dhe udhëzimet që vijojnë.

- ▶ **Enter samples manually** (fusni mostrat manualisht)—Përdorni tabelën bosh në ekranin Create Run (Krijoni ekzekutimin).

- **Import samples** (Importoni mostrat)—Shkoni te një skedar i jashtëm në formatin e vlerave të ndara me presje (*.csv). Një model është i disponueshëm për shkarkim në ekranin Create Run (Krijoni ekzekutimin).

Pasi të keni plotësuar tabelën e mostrave, mund ta eksportoni informacionin e mostrës në një skedar të jashtëm. Përdorni skedarin si referencë kur përgatitni biblioteka ose importoni skedarin për një ekzekutim tjetër.

Fusni mostrat manually (manualisht)

- 1 fusni një emër unik të mostrës në fushën Emri i mostrës.
Përdorni elementë alfanumerikë, viza ose nënvizime.
Emri i mostrës e popullon automatikisht pusin përkatës në bashkimin tjetër.
- 2 **[Opsionale]** Për mostrat e kontrollit pozitiv ose negativ, klikoni me të djathtën dhe zgjidhni llojin e kontrollit.
Kontrolli në një pus mostre e popullon automatikisht pusin përkatës në grupin tjetër me të njëjtin kontroll.
- 3 **[Opsionale]** fusni një përshkrim të mostrës në fushën Përshkrimi i mostrës.
Përdorni elementë alfanumerikë, viza ose nënvizime.
Përshkrimi i mostrës e popullon automatikisht pusin përkatës në bashkimin tjetër.
Përshkrimet e mostrës shoqërohen me një ID të mostrës. Përshkrimet e mostrës mbishkruhen nëse e njëjta ID e mostrës përdoret përsëri në një ekzekutim të mëvonshëm.
- 4 Zgjidhni një përshtatës Indeks 1 nga lista zbritëse Indeksi 1 (i7).
Kur përdorni pusët e mostrave të sugjeruara, softueri popullon automatikisht përshtatësit e indeksit i7 dhe i5 që plotësojnë kërkesat e indeksit të larmisë. Nëse numri i saktë i mostrave që po analizoni nuk është në listë, sigurohuni që të zgjidhni përshtatës indeksi për puse shtesë. Nëse duhet të zgjidhni indekse për puse shtesë, ose nuk përdorni kombinimet e rekomanduara të përshtatësve të indeksit, përpara se të zgjidhni indekset, sigurohuni që të lexoni *Identifikimi bazë dhe larmia e indeksit në faqen 17*.
- 5 Zgjidhni një përshtatës Indeks 2 nga lista zbritëse Indeksi 2 (i5).
- 6 Zgjidhni një skedar manifesti nga lista zbritëse Manifesti.
Mostrat në Bashkimin A kërkojnë një manifest të ndryshëm nga mostrat në Bashkimin B.
- 7 Zgjidhni një opsion për të parë, printuar ose ruajtur paraqitjen e pllakës si referencë për përgatitjen e bibliotekave:
 - Zgjidhni ikonën  **Print** (Printoni) për të shfaqur paraqitjen e pllakës. Zgjidhni **Print** (Printoni) për të printuar paraqitjen e pllakës.
 - Zgjidhni **Export** (Eksportoni) për të eksportuar informacionin e mostrës në një skedar të jashtëm.Sigurohuni që informacioni i manifestit dhe i mostrës është i saktë. Informacioni i pasaktë mund të ndikojë në rezultate.
- 8 Zgjidhni **Save Run** (Ruani Ekzekutimin).

Importoni mostra

- 1 Zgjidhni **Import Samples** (Importoni mostrat) dhe shfletoni tek vendndodhja e skedarit të informacionit të mostrës. Ekzistojnë dy lloje skedarësh që mund të importoni.

- ▶ Zgjidhni **Template** (Modeli) në ekranin Create Run (Krijoni ekzekutimin) për të krijuar një paraqitje të re të pllakës. Skedari i modelit përmban titujt e saktë të kolonave për importim. fusni informacionin e mostrës në secilën kolonë për mostrat në ekzekutim. Fshini informacionin e shembullit në qelizat e papërdorura dhe më pas ruani skedarin.
 - ▶ Përdorni një skedar me informacion shembullor që u eksportua nga Varianti somatik moduli duke përdorur veçorinë Export (Eksportoni).
- 2 Zgjidhni ikonën  **Print** (Printoni) për të shfaqur paraqitjen e pllakës.
 - 3 Zgjidhni **Print** (Printoni) për të printuar paraqitjen e pllakës si referencë për përgatitjen e bibliotekave.
 - 4 **[Opsionale]** Zgjidhni **Eksport** (Eksportoni) për të eksportuar informacionin e mostrës në një skedar të jashtëm.
Sigurohuni që informacioni i manifestit dhe i mostrës është i saktë. Informacioni i pasaktë mund të ndikojë në rezultate.
 - 5 Zgjidhni **Save Run** (Ruani Ekzekutimin).

Modifikoni një ekzekutim

Për udhëzime mbi redaktimin e informacionit në ekzekutimin tuaj para renditjes, shihni *Udhëzuesi i referencës së instrumentit NextSeq 550Dx (dokumenti # 1000000009513)*.

Metodat e analizës

Moduli i analizës i Varianti somatik kryen hapat e mëposhtëm të analizës dhe më pas shkruan skedarët e rezultateve të analizës në dosjen e Analysis (Analiza e rreshtimit). Skedarët e rezultateve të

- ▶ Leximet e indeksit të demultiplekseve
- ▶ Krijon skedarët FASTQ
- ▶ Përputhet me një referencë
- ▶ Identifikon variantet

Demultipleksimi

Demultipleksimi krahason çdo renditje të Leximit të indeksit me renditjet e indeksit të specifikuar për ekzekutimin. Në këtë hap nuk merren në konsideratë vlera cilësore.

Leximet e indeksit identifikohen duke përdorur hapat e mëposhtëm:

- ▶ Mostrat numërohen duke filluar nga 1 bazuar në rendin në të cilin janë renditur për ekzekutimin.
- ▶ Numri i mostrës 0 është i rezervuar për grupet që nuk i janë caktuar një mostre.
- ▶ Grupet i caktohen një mostre kur renditja e indeksit përputhet saktësisht ose kur ka deri në një mospërputhje të vetme për Lexim të indeksit.

Gjenerimi i skedarëve FASTQ

Pas demultipleksimit, softueri krijon skedarë të ndërmjetëm analizash në formatin FASTQ, i cili është një format teksti i përdorur për të përfaqësuar renditjet. Skedarët FASTQ përmbajnë lexime për çdo mostër dhe rezultatet e lidhura të cilësisë. Përfshihen grupet që nuk e kaluan filtrin.

Çdo skedar FASTQ përmban lexime vetëm për një mostër dhe emri i asaj mostre përfshihet në emrin e skedarit FASTQ. Skedarët FASTQ janë të dhënat kryesore hyrëse për rreshtimin. Tetë skedarë FASTQ krijohen për çdo mostër për çdo bashkim oligo, katër nga Leximi 1 dhe katër nga Leximi 2, duke rezultuar në një total prej 16 skedarësh FASTQ për mostër.

Rreshtimi

Gjatë hapit të rreshtimit, algoritmi Smith-Waterman me breza rreshton grupet nga secila mostër kundrejt renditjeve amplikon të specifikuara në skedarin manifest.

Algoritmi Smith-Waterman me breza kryen rreshtime të renditjeve gjysmëglobale për të përcaktuar rajone të ngjashme midis dy renditjeve. Në vend që të krahasojë renditjen totale, algoritmi Smith-Waterman krahason segmentet e të gjitha gjatësivë të mundshme.

Çdo lexim i çiftëzuar vlerësohet në aspektin e rreshtimit të tij me renditjet përkatëse të sondës për atë lexim.

- ▶ Leximi 1 vlerësohet kundrejt komplementit të kundërt të Oligove specifike të lokusit të rrjedhës së poshtme (DLSO).
- ▶ Leximi 2 vlerësohet kundrejt Oligove specifike të lokusit të rrjedhës së sipërme (ULSO).
- ▶ Nëse fillimi i një leximi përputhet me një renditje sondash me jo më shumë se tre ndryshime (mospërputhje ose zhvendosje për shkak të indeleve kryesore), gjatësia e plotë e leximit rreshtohet kundrejt objektivit të amplikonit për atë renditje.
- ▶ Indelet brenda DLSO dhe ULSO nuk vërehen duke pasur parasysh kiminë e analizës.

Rreshtimet filtrohen nga rezultatet e rreshtimit bazuar në shkallët e mospërputhjes ose në rajonin e interesit ose në të gjithë amplikonin, në varësi nga gjatësia e amplikonit. Rreshtimet e filtruara shkruhen në skedarët e rreshtimit si të parreshtuar dhe nuk përdoren në identifikimin e variantit.

Identifikimi i variantit

Zhvilluar nga Illumina, Identifikuesi i variantit Pisces identifikon variantet e pranishme me frekuencë të ulët në mostrën e ADN-së.

Identifikuesi i variantit Pisces identifikon SNV-të, MNV-të dhe indelet e vogla në tre hapa:

- ▶ Konsideron çdo pozicion në gjenomën referuese veçmas
- ▶ Numëron bazat në pozicionin e dhënë për leximet e rreshtuara që mbivendosen me pozicionin
- ▶ Llogarit një rezultat variant që mat cilësinë e identifikimit duke përdorur modelin Poisson. Variantet me një rezultat cilësie nën Q30 përjashtohen.

Variantet identifikohen së pari për secilën të bashkimitveçmas. Pastaj, variante nga secila e bashkimit krahasohen dhe kombinohen në një skedar të vetëm rezultatesh. Nëse një variant është i pranishëm në të dy bashkimet dhe kalon të gjitha filtrat e renditur në *Shënime të skedarit VCF në faqen 13*, varianti shënohet si PASS (KALON) në skedarin e identifikimit të variantit (VCF).

Shikoni të dhënat e ekzekutimit dhe të mostrës

- 1 Nga paneli i kontrollit të Local Run Manager, klikoni emrin e ekzekutimit.
- 2 Nga skeda Run Overview (Përmbledhja e ekzekutimit), rishikoni metrikat e ekzekutimit të renditjes.
- 3 **[Opsionale]** Klikoni tek ikona **Copy to Clipboard**  (Kopjoni në kujtesën e përkohshme) për të kopjuar shtegun e dosjes së rezultateve të ekzekutimit.

- 4 Klikoni skedën Sequencing Information (Informacioni mbi renditjen) për të shqyrtuar parametrat e funksionimit dhe informacionin e materialeve të konsumueshme.
- 5 Klikoni skedën Samples and Results (Mostrat dhe rezultatet) për të parë vendndodhjen e raportit të analizës.
 - Nëse analiza është përsëritur, zgjeroni listën zbritëse Select Analysis (Zgjidhni analizën) dhe zgjidhni analizën e duhur.
- 6 Klikoni ikonën **Copy to Clipboard**  (Kopjoni në kujtesën e përkohshme) për të kopjuar shtegun e dosjes Analysis (Analiza).

Për më shumë informacion mbi skedat Run Overview (Përmbledhja e ekzekutimit) dhe Information Sequencing (Informacion mbi renditjen), dhe si të rivendosni analizën në radhë, shihni *Udhëzuesi i referencës së instrumentit NextSeq 550Dx (dokumenti # 1000000009513)*.

Raporti i analizës

Rezultatet e analizës përmbledhen në skedën Samples and Results (Mostrat dhe Rezultatet) dhe si një raport i përmbledhur në dosjen Rreshtimi. Një raport për secilën mostër është gjithashtu i disponueshëm në formatin PDF për secilën mostër.

Informacioni i skedës Mostrat dhe Rezultatet

- 1 Klikoni një mostër në listë për të parë raportin e mostrës.

Tabela 1 Informacion për ekzekutimin dhe mostrën

Titulli i kolonës	Përshkrimi
Statusi i ekzekutimit	Tregon nëse ekzekutimi i renditjes kaloi apo dështoi.
Rendimenti total (GB)	Numri i bazave të identikuara në ekzekutimin e renditjes. Tregon prapen e kalueshmërisë dhe statusin e kalueshmërisë ose dështimit.
% ≥ Q30	Përqindja e leximeve në ekzekutimin e renditjes me një rezultat cilësie prej 30 (Q30) ose më të madh. Tregon prapen e kalueshmërisë dhe statusin e kalueshmërisë ose dështimit.
Emri i mostrës	Emri i mostrës i dhënë kur u krijua ekzekutimi.
Lexime totale të PF-së	Numri total i leximeve që kalojnë filtrin.
Leximi 1% ≥ Q30	Përqindja e leximeve në Leximin 1 me një rezultat cilësie prej 30 (Q30) ose më të madh për mostrën.
Leximi 2% ≥ Q30	Përqindja e leximeve në Leximin 2 me një rezultat cilësie prej 30 (Q30) ose më të madh për mostrën.
Shkalla e identifikimit autosome	Numri i pozicioneve gjenomike autosome (kromozomet 1 deri në 22) që përmbushin një prag të paracaktuar të vlerës së besimit, i pjesëtuar me numrin total të pozicioneve gjenomike autosomale të kërkuara. Shkalla e identifikimit përshkruhet në bazë të çdo mostre dhe raportohet si përqindje që llogaritet si 1 minus (numri i pozicioneve autosomale me identifikime të paplota pjesëtuar me numrin total të pozicioneve të renditura autosomale).

Tabela 2 Informacioni i Sample (Raporteve të mostrës) Report(Tabela e raportit)

Titulli i kolonës	Përshkrimi
Mostra	Emri i mostrës i dhënë kur u krijua ekzekutimi.
Data e raportimit	Data e krijimit të raportit.
Informacioni i mostrës	ID-ja e mostrës që u dha kur u krijua ekzekutimi, leximet totale që kaluan filtrin në mostër, përqindja e leximeve për mostrën me një rezultat cilësie prej 30 (Q30) ose më të madh dhe shkalla e identifikimeve autosomale.
Përmbledhje e amplikonit	Numri total i rajoneve të amplikoneve të renditur, dhe gjatësia totale në çifte bazash të amplikoneve të renditur në rajonet e synuara, për mostrën në Bashkimin A dhe Bashkimin B dhe skedari i manifestit i përdorur për secilin bashkim. Skedari manifest specifikon gjenomin referues dhe rajonet referuese të synuara të përdorura në hapin e rreshtimit.
Lexoni statistikën e nivelit	Numri dhe përqindja e leximeve për mostrën që mbulojnë çdo pozicion në referencë, për Leximin 1 dhe Leximin 2 në Grupin A dhe Grupin B.
Përmbledhje e varianteve	Numri i SNV-ve, futjeve dhe fshirjeve të zbuluara për mostrën që kaloi vlerat e sugjeruara për të përcaktuar nëse rezultatet e cilësisë janë brenda një diapazoni të pranueshëm,
Përmbledhje e mbulimit	Numri total i bazave të rreshtuara i pjesëtuar me madhësinë e rajonit të synuar dhe përqindjen e rajoneve të amplikonit me vlera mbulimi më të mëdha se pragu i ulët i mbulimit prej $0.2 \times$ mbulimi mesatar i amplikonit, për mostrën në Grupin A dhe Grupin B.
Parcelat e mbulimit	Grafiku i Mbulimit sipas rajonit të amplikonit tregon mbulimin nëpër rajonet e amplikonit për mostrën. Rajonet me vlera mbulimi më të ulëta se pragu i mbulimit janë të theksuara me të kuqe. Mesatarja e të gjitha vlerave tregohet nga një vijë portokalli. Një parcelë është dhënë për mbulimin e Bashkimit A dhe Bashkimit B.
Versionet e softuerit	Versionet e softuerit kur u rendit mostra. Përfshin Softuerin operativ NextSeq 550Dx (NOS), Softuerin e Local Run Manager, Softuerin RTA dhe versionin e Modurit të variantit somatike.

Skedarët e rezultateve të analizës

Skedarët e mëposhtëm të rezultateve të analizës krijohen për modulin e analizës Varianti somatik dhe ofrojnë rezultate analize për rreshtimin dhe identifikimin e varianteve. Skedarët e rezultateve të analizës ndodhen në dosjen Alignment (Rreshtimi).

Emri i skedarit	Përshkrimi
Demultipleksimi (*.txt)	Skedarët e ndërmjetëm që përmbajnë rezultatet përmbledhëse të demultipleksimit.
FASTQ (*.fastq.gz)	Skedarët e ndërmjetëm që përmbajnë identifikimet bazë të vlerësuara me cilësi. Skedarët FASTQ janë të dhënat kryesore hyrëse për hapin e rreshtimit.
Skedarët e rreshtimit në formatin BAM (*.bam)	Përmban lexime të rreshtuara për një mostër të caktuar.
Skedarët e identifikimeve të variantit për-bashkim në formatin VCF (*.vcf)	Përmban variante të identifikuara në secilin pozicion nga grupi i përparmë ose nga grupi i kundërt.
Skedarët e identifikimit të variantit në gjenomin e formatit VCF (*.genome.vcf.gz)	Përmban gjenotipin për secilin pozicion, pavarësisht nëse identifikohet si variant apo si referencë.

Formati i skedarit BAM

Një skedar BAM (*.bam) është versioni binar i kompresuar i një skedari SAM që përdoret për të përfaqësuar renditje të rreshtuara deri në 128 Mb. Formatet SAM dhe BAM përshkruhen në detaje në samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf.

Skedarët BAM përdorin formatin e emërimit të skedarëve **SampleName_S#.bam**, ku # është numri i mostrës i përcaktuar nga rendi i renditjes së mostrave për ekzekutimin.

Skedarët BAM përmbajnë një seksion të titullit dhe një seksion rreshtimi:

- ▶ **Header** (Titulli)—Përmban informacione rreth të gjithë skedarit, siç janë emri i mostrës, gjatësia e mostrës dhe metoda e rreshtimit. Rreshtimet në seksionin e rreshtimeve shoqërohen me informacione specifike në seksionin e titullit.
- ▶ **Alignment** (Rreshtimet)—Përmban emrin e leximit, renditjen e leximit, cilësinë e leximit, informacionin e rreshtimit dhe etiketat e personalizuar. Emri i lexuar përfshin kromozomin, koordinatën e fillimit, cilësinë e rreshtimit dhe vargun përshkrues të përputhjes.

Seksioni i rreshtimeve përfshin informacionin e mëposhtëm për secilën lexim ose çift leximi:

- ▶ **AS:** Cilësia e shtrirjes së skajeve të çiftëzuara
- ▶ **BC:** Etiketa e kodit shifror, e cila tregon ID-në e mostrës së demultipleksuar të lidhur me leximin.
- ▶ **SM:** Cilësia e shtrirjes në një skaj të vetëm.
- ▶ **XC:** Vargu i përshkruesit të përputhjes
- ▶ **XN:** Etiketa e emrit të amplikonit, e cila regjistron ID-në e amplikonit të lidhur me leximin

Skedarët e indeksit BAM (*.bam.bai) ofrojnë një indeks të skedarit përkatës BAM.

Formati i skedarit VCF

Formati i identifikimit të variantit (VCF) është një format skedari i zakonshëm i zhvilluar nga komuniteti shkencor i gjenomikës. Ai përmban informacion në lidhje me variantet e gjetura në pozicione specifike në një gjenom referues. Skedarët VCF mbarojnë me prapashtesën .vcf

Titulli i skedarit VCF përfshin versionin e formatit të skedarit VCF dhe versionin e identifikimit të variantit dhe rendit shënime të përdorura në pjesën tjetër të skedarit. Titulli VCF përfshin gjithashtu skedarin e gjenomit referues dhe skedarin BAM. Rreshti i fundit në titull përmban titujt e kolonave për rreshtat e të dhënave. Secili prej rreshtave të të dhënave të skedarit VCF përmban informacion rreth një varianti.

Titujt e skedarëve VCF

Titulli	Përshkrimi
CHROM	Kromozomi i gjenomit referues. Kromozomet shfaqen në të njëjtin rend si skedari referues FASTQ.
POS	Pozicioni me një bazë të vetme i variantit në kromozomin referues. Për SNP-të, ky pozicion është baza e referencës me variantin; për indelet ose fshirjet, ky pozicion është baza e referencës menjëherë para variantit.
ID	Numri rs për variantin e marrë nga dbSNP.txt, nëse është e aplikueshme. Nëse ka disa numra rs në këtë vendndodhje, lista ndahet me pikëpresje. Nëse nuk ekziston asnjë hyrje dbSNP në këtë pozicion, përdoret një shënues vlere që mungon ('.').

Titulli	Përshkrimi
REF	Gjenotipi i referencës. Për shembull, një fshirje e një T të vetme përfaqësohet si TT referuese dhe T alternative. Një variant i një nukleotidi të vetëm nga A në T përfaqësohet si A referuese dhe T alternative.
ALT	Alelet që ndryshojnë nga referenca e lexuar. Për shembull, një futje e një T të vetme përfaqësohet si A referuese dhe AT alternative. Një variant i nukleotidit të vetëm nga A në T përfaqësohet si A referuese dhe T alternative.
CILËSIA	Një rezultat cilësie i shkallëzuar nga Phred i caktuar nga identifikuesi i variantit. Rezultatet më të larta tregojnë besim më të lartë në variant dhe probabilitet më të ulët të gabimeve. Për një rezultat cilësor Q, probabiliteti i vlerësuar i një gabimi është $10^{-(Q/10)}$. Për shembull, grupi i identifikimeve Q30 ka një shkallë gabimi prej 0.1%. Shumë identifikues variantesh caktojnë rezultate cilësie bazuar në modelet e tyre statistikore, të cilat janë të larta në lidhje me shkallën e gabimit të vëzhguar.

Shënime të skedarit VCF

Titulli	Përshkrimi
FILTRI	Nëse të gjithë filtrat kalojnë, PASS (KALON) shkruhet në kolonën e filtrit. LowDP—Zbatohet në vende me thellësi mbulimi nën 450x në secilin bashkim. Për pozicionet e amplikoneve të mbuluara nga leximi përpara dhe prapa, kjo është ekuivalente me mbulim 900x me lexim të vetëm. LowGQ—Cilësia e gjenotipizimit (GQ) është nën një kufi. p30—Rezultati i cilësisë < 30. LowVariantFreq—Frekuenca e variantit është më e vogël se pragu i dhënë. PB—Paragjykimi i grupit të sondave. Variant nuk u gjet, ose u gjet me frekuencë të ulët në një ose dy grupe sondash. R3x6—Numri i përsëritjeve ngjitur (me gjatësi 1 deri në 3 bp) me identifikimet e variantit ≥ 6. SB—Paragjykimi i vargut është më i madh se pragu i dhënë.
INFORMACIONI	Hyrjet e mundshme në kolonën INFO përfshijnë: AC—Numërimi i aleleve në gjenotipe për secilin alel ALT, në të njëjtën renditje siç është renditur. AF—Frekuenca e aleleve për secilin alel ALT, në të njëjtën renditje siç është renditur. AN—Numri i përgjithshëm i aleleve në të quajturat gjenotipe. CD—Një flamur që tregon se SNP ndodh brenda rajonit të kodimit të të paktën 1 hyrjeje RefGene. DP—Thellësia (numri i identifikimeve bazë të rreshtuara në një pozicion dhe të përdorura në identifikimin e variantit). Ekson—Një listë e ndarë me presje e rajoneve të eksoneve të lexuara nga RefGene. FC—Pasoja funksionale. GI—Një listë e ndarë me presje e ID-ve të gjeneve të lexuara nga RefGene. QD—Besimi/Cilësia e varianteve sipas thellësisë. TI—Një listë e ndarë me presje e ID-ve të transkripteve të lexuara nga RefGene.
FORMATI	Kolona e formatit rendit fushat e ndara me dy pika. Për shembull, GT:GQ. Lista e fushave të ofruara varet nga identifikuesi i variantit të përdorur. Fushat e disponueshme përfshijnë: AD—Hyrje e formës X,Y, ku X është numri i identifikimeve referuese dhe Y është numri i identifikimeve alternative. DP—Thellësia e përafërt e leximit; leximet me MQ=255 ose me partnerë të këqij filtrohen. GQ—Cilësia e gjenotipit. GQX—Cilësia e gjenotipit. GQX është minimumi i vlerës GQ dhe i kolonës QUAL. Në përgjithësi, këto vlera janë të ngjashme; marrja e minimumit e bën GQX masën më konservative të cilësisë së gjenotipit. GT—Gjenotipi. 0 korrespondon me bazën referuese, 1 korrespondon me hyrjen e parë në kolonën ALT e kështu me radhë. Vija e pjerrët përpara (/) tregon se nuk ka informacion të disponueshëm për fazën. NL—Niveli i zhurmës; një vlerësim i zhurmës së identifikimit të bazës në këtë pozicion. PB—Paragjykimi i grupit të sondave. Vlerat më afër 0 treguan më shumë paragjykim drejt një bashkimi të një sonde dhe më pak besim në një identifikim të variantit. SB—Paragjykimi i vargut në këtë pozicion. Vlerat më të mëdha negative tregojnë më pak paragjykim; vlerat afër 0 tregojnë më shumë paragjykim. VF—Frekuenca e variantit; përqindja e leximeve që mbështesin alelin alternativ.
SHEMBULLI	Kolona e shembullit jep vlerat e specifikuara në kolonën FORMAT.

Skedarët e gjenomit VCF

Skedarët e gjenomit VCF (gVCF) janë skedarë VCF v4.1 që ndjekin një sërë konventash për përfaqësimin e të gjitha vendeve brenda gjenomit në një format mjaft kompakt. Skedarët gVCF (*.genome.vcf.gz) përfshijnë të gjitha vendet brenda rajonit të interesit në një skedar të vetëm për secilën mostër.

Skedari gVCF tregon mos identifikim në pozicione që nuk i kalojnë të gjitha filtrat. Një etiketë gjenotipi (GT) prej ./. tregon një mosidentifikim.

Për më shumë informacion, shihni sites.google.com/site/gvcftools/home/about-gvcf.

Skedarët VCF për çdo bashkim dhe konsensus

Rrjedha e punës e Varianti somatik krijon 2 grupe të skedarëve të ekzekutimit të variantit.

- **Per-pool VCF files** (Skedarët VCF për çdo bashkim)—Përmbajnë variante të identifikuara ose në grupin përpara ose në grupin e kundërt. Skedarët për çdo grup shkruhen në dosjen VariantCallingLogs.
- **Consensus VCF files** (Skedarët VCF të konsensusit)—Përmbajnë variante të identifikuara nga të dy grupet. Skedarët e konsensusit shkruhen në dosjen Alignment (Rreshtimi).

Skedarët VCF për bashkim dhe konsensusit përfshijnë skedarët VCF (*.vcf) dhe gVCF (*.genome.vcf), dhe përdorin konventën e mëposhtme të emërimit, ku S# përfaqëson rendin në të cilin renditet mostra për ekzekutimin:

- **Reports for all sites** (Raporton për të gjitha vendet)—SampleName_S#.genome.vcf
- **Reports variants only** (Raporton vetëm variantet)—SampleName_S#.vcf

Softueri krahason skedarët VCF për secilin bashkim dhe kombinon të dhënat në secilën pozicion për të krijuar një skedar VCF të konsensusit për mostrën.

Identifikimet e variantit nga secili bashkim bashkohen në skedarët VCF të konsensusit duke përdorur kriteret e mëposhtme.

Kriteret	Rezultat
Një identifikim referimi në secilin bashkim	Identifikimi i referimit
Një identifikim referimi në 1 grup dhe një identifikim i variantit në grupin tjetër	Identifikimi me variant të filtruar
Identifikime variantesh që përputhen me frekuenca të ngjashme në secilin grup	Identifikim varianti
Identifikime variantesh që përputhen me frekuenca dukshëm të ndryshme në secilin grup	Identifikimi me variant të filtruar
Identifikimi i variantit të pakrahasueshëm në secilin bashkim	Identifikimi me variant të filtruar

Metrikat nga secili bashkim bashkohen duke përdorur vlerat e mëposhtme.

Metrika	Vlera
Thellësia	Shtimi i thellësive nga të dy bashkimet
Frekuenca e variantit	Numri total i varianteve i ndarë me thellësinë totale të mbulimit
Rezultati Q	Vlera minimale e të dy bashkimeve

Skedari i mbulimit të amplikonit

Një skedar i mbulimit të amplikonit krijohet për secilin skedar manifesti. M# në emrin e skedarit përfaqëson numrin e manifestit.

Çdo skedar përfshin një rresht titulli që përmban ID-të e mostrës të shoqëruara me manifestin. Skedari përmban informacionin e mëposhtëm.

- ID e objektivit siç është renditur në manifest.
- Thellësia e mbulimit të leximeve që kalojnë filtrin.

Skedarët shtesë të rezultateve

Skedarët e mëposhtëm të rezultateve ofrojnë informacione plotësuese ose përmbledhin rezultatet e ekzekutimit dhe gabimet e analizës. Edhe pse këto skedarë nuk kërkohen për vlerësimin e rezultateve të analizës, mund të përdoren për qëllime të zgjidhjes së problemeve. Të gjithë skedarët ndodhen në dosjen Alignment (Rreshtimi) përveç nëse specifikohet ndryshe.

Emri i skedarit	Përshkrimi
AnalysisLog.txt	Regjistri i përpunimit që përshkruan çdo hap që ndodhi gjatë analizës së dosjes aktuale të ekzekutimit. Ky skedar nuk përmban mesazhe gabimi. Vendosur në dosjen Alignment (Rreshtimi).
AnalysisError.txt	Regjistri i përpunimit që rendit çdo gabim që ka ndodhur gjatë analizës. Ky skedar do të jetë bosh nëse nuk ka gabime. Vendosur në dosjen Alignment (Rreshtimi).
DemultiplexSummaryF1L1#.txt	Raporton rezultatet e demultipleksimit në një tabelë me 1 rresht për pllakë dhe 1 kolonë për mostër. # përfaqëson korsinë 1, 2, 3 ose 4 të qelizës rrjedhëse. Vendosur në dosjen Alignment (Rreshtimi).
AmpliconRunStatistics.xml	Përmban statistika përmbledhëse specifike për ekzekutimin. Vendosur në dosjen Alignment (Rreshtimi).

Dosja e analizës

Dosja e analizës përmban skedarët e krijuar nga softueri i Local Run Manager.

Marrëdhënia midis dosjes së rezultatit dhe dosjes së analizës përmbledhet si më poshtë:

- ▶ Gjatë renditjes, Real-Time Analysis (RTA) mbush dosjen e rezultateve me skedarë të krijuar gjatë analizës së imazhit, identifikimit të bazës dhe vlerësimit të cilësisë.
- ▶ RTA kopjon skedarët në dosjen e analizës në kohë reale. Pasi RTA i cakton një rezultat cilësie secilës bazë për secilin cikël, softueri shkruan skedarin RTAComplete.txt në të dy dosjet.
- ▶ Kur skedari RTAComplete.txt është i pranishëm, fillon analiza.
- ▶ Ndërsa analiza vazhdon, Local Run Manager shkruan skedarët e rezultateve në dosjen e analizës dhe pastaj i kopjon skedarët përsëri në dosjen e rezultateve.

Dosjet e rreshtimit

Sa herë që kërkohet përsëri analiza, Local Run Manager krijon një dosje Alignment (Rreshtimi) të quajtur **Alignment_N**, ku N është një numër vijues.

Struktura e dosjeve

 **Alignment** (Rreshtimi)—Përmban skedarë *.bam, *.vcf, FASTQ dhe skedarë specifike për modulin e analizës.

 **Date and Time Stamp** (Vula e datës dhe orës)—Vula e datës_orës së analizës si 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**—Përmban skedarë *.bcl.

 **L001**—Përmban skedarë *.locs.

 **RTA Logs** (Regjistrat RTA)—Përmbajnë skedarë regjistrash nga analiza e softuerit RTA.

 **InterOp**—Përmban skedarë binarë të përdorur për të raportuar metrikat e ekzekutimit të renditjes.

 **Logs** (Regjistrat)—Përmbajnë skedarë regjistrash që përshkruajnë hapat e kryer gjatë renditjes.

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

Identifikimi bazë dhe larmia e indeksit

Kur mostrat renditen në instrumentin NextSeq 550Dx, identifikimi i bazës përcakton një bazë (A, C, G ose T) për çdo grumbull të një pllake të caktuar, ose zone imazherie në qelizën rrjedhëse, në një cikël specifik. Instrumenti NextSeq 550Dx përdor renditjen me dy kanale, që kërkon vetëm dy imazhe për të koduar të dhënat nga katër bazat e ADN-së, një nga kanali i kuq dhe një nga kanali i gjelbërt.

Procesi për identifikimin e bazës së leximit të indeksit ndryshon nga identifikimi i bazës gjatë leximeve të tjera.

Leximet e indeksit duhet të fillojnë me të paktën një bazë tjetër përveç G në secilin prej dy cikleve të para. Nëse një Lexim i indeksit fillon me dy identifikime bazë të G, nuk gjenerohet intensiteti sinjali. Sinjali duhet të jetë i pranishëm në njërin prej dy cikleve të para për të siguruar performancën e demultipleksimit.

Kur zgjidhni indekse gjatë krijimit të ekzekutimit, do të shfaqet një paralajmërim për larmi të ulët nëse indekset nuk i plotësojnë kërkesat e larmisë. Për të parandaluar paralajmërimin e larmisë së ulët, zgjidhni renditjet e indeksit që ofrojnë sinjal në të dy kanalet për çdo cikël.

- ▶ Kanali i kuq—A ose C
- ▶ Kanali jeshil—A ose T

Ky proces i identifikimit të bazës siguron saktësi kur analizohen mostrat me pleksim të ulët. Për më shumë informacion në lidhje me renditjet e indekseve tuaja, shihni fletushkën e paketës *Kompleti i personalizimit të amplikonit TruSeq Dx (dokumenti # 1000000029772)*.

Gjatë krijimit të ekzekutimit të Local Run Manager do të zgjidhni numrin e mostrave që do të analizohen. Kombinimet e sugjeruara të indeksit që plotësojnë kërkesat e larmisë së indeksit plotësohen automatikisht nga softueri. Edhe pse nuk jeni të detyruar t'i përdorni kombinimet e sugjeruara të indeksit, kjo rekomandohet.

Historia e ndryshimeve

Dokumenti	Data	Përshkrimi i ndryshimit
Dokumenti # 1000000030330 v04	Gusht 2021	U përditësua adresa e Përfaqësuesit të autorizuar të BE-së.
Dokumenti # 1000000030330 v03	Dhjetor 2019	U përditësua adresa e Përfaqësuesit të autorizuar të BE-së. U përditësua adresa e Sponsorit Australian.
Dokumenti # 1000000030330 v02	Janar 2019	U shtua informacion rreth completeve të reagentit v2.5.
Dokumenti # 1000000030330 v01	Gusht 2018	U përditësuan shenjat rregullatore.
Dokumenti # 1000000030330 v00	Nëntor 2017	Qarkullimi fillestar.

Asistenca teknike

Për asistencë teknike, kontaktoni Illumina Mbështetjen teknike.

Faqe ueb: www.illumina.com
Email: techsupport@illumina.com

Illumina Numrat e telefonit të mbështetjes për klientët

Rajoni	Pa pagesë	Rajonale
Amerika e Veriut	+1.800.809.4566	
Australi	+1.800.775.688	
Austri	+43 800006249	+43 19286540
Belgjikë	+32 80077160	+32 34002973
Kinë	400.066.5835	
Danimarkë	+45 80820183	+45 89871156
Finlandë	+358 800918363	+358 974790110
Francë	+33 805102193	+33 170770446
Gjermani	+49 8001014940	+49 8938035677
Hong Kong	800960230	
Irlandë	+353 1800936608	+353 016950506
Itali	+39 800985513	+39 236003759
Japoni	0800.111.5011	
Holandë	+31 8000222493	+31 207132960
Zelandë e Re	0800.451.650	
Norvegji	+47 800 16836	+47 21939693
Singapor	+1.800.579.2745	
Spanjë	+34 911899417	+34 800300143
Suedi	+46 850619671	+46 200883979
Zvicër	+41 565800000	+41 800200442
Taivan	00806651752	
Mbretëri e Bashkuar	+44 8000126019	+44 2073057197
Vende të tjera	+44.1799.534000	

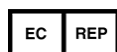
Safety data sheets (SDS) (Fletët e të dhënave të sigurisë (SDS))—Të disponueshme në faqen ueb të Illumina në support.illumina.com/sds.html.

Product documentation (Dokumentacioni i produktit)—I disponueshëm për shkarkim në PDF nga faqja ueb e Illumina. Shkoni te support.illumina.com, zgjidhni një produkt dhe më pas zgjidhni

Documentation & Literature (Dokumentacioni dhe Literatura).



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122
U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (jashtë
Amerikës së Veriut)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com



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

Australian Sponsor

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

PËR PËRDORIM DIAGNOSTIKUES IN VITRO

© 2021 Illumina, Inc. Të gjitha të drejtat të rezervuara.

illumina[®]