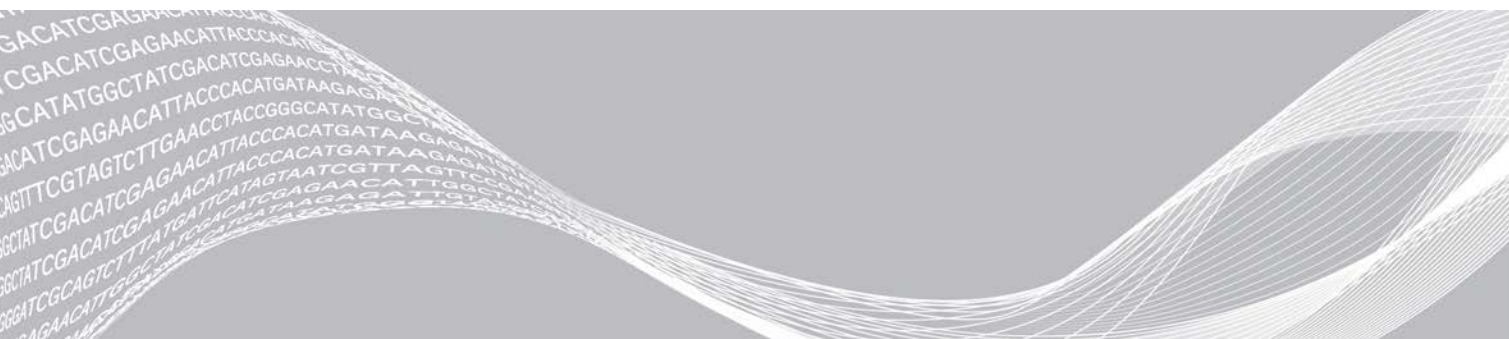


Local Run Manager Germline Variant elemzőmodul

NextSeq 550Dx munkafolyamat-útmutató

IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA

Áttekintés	3
A futtatási adatok megadása	4
Elemzési módszerek	6
A futtatási és mintaadatok megtekintése	7
Elemzésjelentés	8
Elemzésieredmény-fájlok	9
Módosítási előzmények	16
Műszaki támogatás	17



A jelen dokumentum és annak tartalma az Illumina, Inc. és annak társvállalatai (a továbbiakban „Illumina”) tulajdonát képezi, és kizárólag a jelen dokumentumban ismertetett termék(ek) szerződésszerű működtetéséhez használható. Egyéb célokra nem használható. A dokumentum és annak tartalma az Illumina előzetes írásos engedélye nélkül ettől eltérő célokra nem használható és forgalmazható, továbbá semmilyen formában nem kommunikálható, hozható nyilvánosságra vagy reprodukálható. Az Illumina a jelen dokumentummal nem adja át a tulajdonában lévő szabadalmi, védjegyjogi, szerzői jogi vagy szokásjogi licenccet, illetve a harmadik felek birtokában lévő hasonló jogosultságokat.

A jelen dokumentumban szereplő utasításokat a kvalifikált és megfelelően képzett személyzetnek szigorúan be kell tartania az itt ismertetett termék(ek) megfelelő és biztonságos használata érdekében. A termék(ek) használata előtt a felhasználó köteles átolvasni és értelmezni a jelen dokumentumban leírtakat.

AZ ITT SZEREPLŐ INFORMÁCIÓK ELOLVASÁSÁNAK VAGY AZ UTASÍTÁSOK BETARTÁSÁNAK ELMULASZTÁSA ESETÉN A TERMÉK(EK) MEGSÉRÜLHETNEK, ILLETVE SZEMÉLYI SÉRÜLÉS KÖVETKEZHET BE, IDEÉRTVE A FELHASZNÁLÓKAT ÉS MÁSOKAT IS, ILLETVE EGYÉB ANYAGI KÁROK KÖVETKEZHETNEK BE. EZENFELÜL ILYEN ESETEKBEN A TERMÉK(EK)RE VONATKOZÓ GARANCIA ÉRVÉNYÉT VESZTI.

AZ ILLUMINA SEMMIFÉLE FELELŐSSÉGET NEM VÁLLAL AZ ITT BEMUTATOTT TERMÉK(EK) HELYTELEN HASZNÁLATÁBÓL FAKADÓ KÁROKÉRT (AZ ALKATRÉSZEKET ÉS A SZOFTVERT IS IDEÉRTVE).

© 2021 Illumina, Inc. Minden jog fenntartva.

Minden védjegy az Illumina, Inc., illetve az adott tulajdonosok tulajdonát képezi. A védjegyekkel kapcsolatos információkat lásd a www.illumina.com/company/legal.html oldalon.

Áttekintés

A Local Run Manager Germline Variant modul az Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx vizsgálattal és a NextSeq 550Dx eszközzel való használatra szolgál. A Germline Variant modullal való használat esetén a vizsgálat célja a perifériás teljes vér mintákból származó DNS-szekvenálására szolgáló könyvtárak előkészítése.

Az elemzőmodul kiértékeli a felerősített DNS rövid régióit, azaz az ampliconokat a variánsok tekintetében. Az ampliconok fókuszált szekvenálása egy-egy adott régió nagy szintű lefedését teszi lehetővé. Lásd a következő termék tájékoztatóját: *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx (dokumentumszám: 1000000029772)*.

A Germline Variant elemzőmodulhoz 300 ciklusos szekvenálási fogyóeszközök szükségesek. További információ: a *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2* vagy a *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5* termék tájékoztatója.

Néhány szó a jelen útmutatóról

Ez az útmutató a Germline Variant elemzőmodulon végezhető szekvenálási és elemzési műveletek futtatási paramétereinek beállítására vonatkozó utasításokat ismerteti. A Local Run Manager infópultjával és a rendszer beállításával kapcsolatos információkat illetően lásd: *NextSeq 550Dx referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)*.

A Local Run Manager megtekintése

A Local Run Manager kezelőfelületét a NextSeq 550Dx Operating Software (NOS) segítségével vagy webböngészőből lehet megtekinteni. A támogatott webböngésző a Chromium.



MEGJEGYZÉS

Nem támogatott böngésző használata esetén töltsse le a támogatott böngészőt, amikor megjelenik a „Confirm Unsupported Browser” (Nem támogatott böngésző jóváhagyása) üzenet. A Chromium támogatott verziójának letöltéséhez kattintson „**ide**”.

Megtekintés a műszer monitorján

- 1 A Local Run Manager kezelőfelületének a műszer monitorján való megjelenítéséhez kövesse az alábbi eljárások valamelyikét:
 - ▶ A NOS kezdőképernyőjén válassza a **Local Run Manager** elemet.
Amikor végzett, a jobb felső sarokban lévő X elemre kattintva léphet vissza a NOS rendszerbe.
 - ▶ Válassza a Minimize NOS (NOS kis méretre) ikont, nyissa meg a műszeren a Chromium webböngészőt, majd írja be a címsorba a következőt: **http://localhost**.
A NOS kis méretre állításához rendszergazdai jogosultság szükséges.

Megtekintés hálózati számítógépről

- 1 Nyissa meg a Chromium webböngészőt egy olyan számítógépen, amely hozzáfér ahhoz a hálózathoz, amelyen a műszer is található, majd csatlakozzon a műszer IP-címének vagy nevének megadásával.
Például: **http://myinstrument**.

A futtatási adatok megadása

Paraméterek beállítása

- 1 Jelentkezzen be a Local Run Manager szoftverbe.
- 2 Válassza a **Create Run** (Futtatás létrehozása) lehetőséget, majd válassza a **Germline Variant** lehetőséget.
- 3 Adjon meg egy nevet, amely a szekvenálástól az elemzésig azonosítja a futtatást. Betűket, számokat, szóközt, aláhúzásjelet és kötőjelet használhat.
- 4 **[Opcionális]** Adjon meg leírást a futtatáshoz, amely segíthet beazonosítani a futtatást. Betűket, számokat, szóközt, aláhúzásjelet és kötőjelet használhat.
- 5 Válassza ki a minták számát és az indexkészletet a legördülő menüből. A döntés során vegye figyelembe az alábbiakat.
 - ▶ A legördülő lista mintaszámokat és indexkészleteket tartalmaz. Például a 24-Set 1 azt jelenti, hogy a tesztelendő minták száma 24, az indexeket pedig az 1. indexkészlet adja.
 - ▶ Az indexkészletszámok különböző i5 indexkészleteket jelölnek. A Set 1 és a Set 2 egyaránt biztosítja az indexek diverzitását. A két indexkészlet azt a célt szolgálja, hogy az egyik kifogyása esetén egy másik biztosan rendelkezésre álljon.
 - ▶ Válassza ki azt a mintaszámot, amelyik a legközelebb esik a tesztelni kívánt minták számához. Ha a pontos mintaszám nem szerepel a listában, akkor válassza ki a legközelebb eső számot, de az legyen kisebb, mint a tesztelni kívánt mennyiség. Ha például 18 mintát szeretne tesztelni, akkor a 16 minta lehetőséget válassza ki.
 - ▶ Azok a mintalyuk- és indexkombinációk, amelyek megfelelnek az index diverzitására vonatkozó követelményeknek, zölddel vannak kiemelve. Ha olyan lyuk- és indexkombinációt választ ki, amelynél az index diverzitására vonatkozó követelmények nem teljesülnek, akkor a futtatás mentésekor egy figyelmeztető üzenet jelenik meg.

Jegyzékfájlok importálása a futtatásba

- 1 Gondoskodjon arról, hogy az importálni kívánt jegyzékek rendelkezésre álljanak egy elérhető hálózati helyen vagy egy pendrive-on.
- 2 Válassza az **Import Manifests** (Jegyzékek importálása) lehetőséget.
- 3 Lépjen a jegyzékfájltra, majd jelölje ki a hozzáadni kívánt jegyzékeket.



MEGJEGYZÉS

Ha azt szeretné, hogy a jegyzékfájlok az összes futtatásnál elérhetőek legyenek a Germline Variant elemzőmodulon, a Module Settings (Modulbeállítások) funkciót használva adja hozzá a jegyzékeket. Ehhez a funkcióhoz rendszergazdai jogosultság szükséges. További információ: *NextSeq 550Dx referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)*.

Minták meghatározása a futtatáshoz


A minták futtatáshoz való meghatározásához járjon el az alábbi lehetőségek egyike szerint, és tartsa be az azt követő utasításokat.

- ▶ **Minták megadása manuálisan** – Használja a Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn lévő üres táblázatot.


- ▶ **Minták importálása** – Navigáljon egy .csv formátumú külső fájlra. A Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőről letölthető egy sablon.

Miután kitöltötte a minták táblázatát, kiexportálhatja a mintainformációkat egy külső fájlba. Ez a fájl ezután referenciaként használható a könyvtárak előkészítése során, valamint egy másik futtatásba is importálható.

Minták megadása manuálisan

- 1 Adjon meg egy egyedi mintaazonosítót a Sample ID (Mintaazonosító) mezőben. Betűket, számokat, kötőjelet és aláhúzásjelet használhat.
- 2 **[Opcionális]** A pozitív vagy negatív kontrollminták kiválasztásához kattintson a jobb gombbal, majd válassza ki a kontroll típusát.
- 3 **[Opcionális]** Adja meg a minta leírását a Sample Description (Minta leírása) mezőben. Betűket, számokat, kötőjelet és aláhúzásjelet használhat. A rendszer a minta leírását a minta nevéhez rendeli hozzá. Így ha az adott mintanevet újra felhasználja egy későbbi futtatás során, akkor a mintaleírás felülíródik.
- 4 Válasszon ki egy Index 1 adaptert az Index 1 (i7) legördülő listából. A felajánlott mintalyukak használata esetén a szoftver automatikusan kitölti az i7 és i5 indexadaptereket úgy, hogy azok megfeleljenek az indexdiverzitásra vonatkozó követelményeknek. Ha a listában nem szerepel a tesztelni kívánt mintamennyiség pontos száma, akkor ne felejtse el kiválasztani az indexadaptereket a plusz lyukakhoz. Ha a plusz lyukakhoz ki kell választani az indexeket, vagy ha nem az ajánlott indexadapter-kombinációkat használja, akkor az indexek kiválasztása előtt ne felejtse el elolvasni a következő részt: *Bázisazonosítás és indexdiverzitás, 15. oldal.*
- 5 Válasszon ki egy Index 2 adaptert az Index 2 (i5) legördülő listából.
- 6 Válasszon ki egy jegyzékfájlt a Manifest (Jegyzék) legördülő listából.
- 7 Válasszon ki egy opciót a lemezelrendezés megtekintéséhez, nyomtatásához vagy referenciaként való mentéséhez a könyvtárak előkészítésének részeként:
 - ▶ A lemezelrendezés megjelenítéséhez válassza a  **Print** (Nyomtatás) ikont. Válassza a **Print** (Nyomtatás) lehetőséget a lemezelrendezés kinyomtatásához.
 - ▶ Válassza az **Export** (Exportálás) lehetőséget a mintaadatok külső fájlba való exportálásához. Győződjön meg arról, hogy a jegyzék- és mintaadatok helyesek-e. A helytelen adatok befolyásolhatják a végeredményt.
- 8 Válassza a **Save Run** (Futtatás mentése) lehetőséget.

Minták importálása

- 1 Válassza az **Import Samples** (Minták importálása) lehetőséget, majd keresse meg a mintainformációs fájlt. Kétféle fájlt lehet importálni.
 - ▶ A Create Run (Futtatás létrehozása) képernyőn válassza a **Template** (Sablon) lehetőséget egy új lemezelrendezés létrehozásához. A sablonfájl az importáláshoz megfelelő oszlopfejléceket tartalmazza. Adja meg a mintaadatokat a futtatásban szereplő minták oszlopaiban. A nem használt cellákból törölje a példaadatokat, majd mentse a fájlt.
 - ▶ Olyan mintainformációs fájlt használjon, amely a Germline Variant modulból lett kiexportálva az Export (Exportálás) funkcióval.
- 2 A lemezelrendezés megjelenítéséhez válassza a  **Print** (Nyomtatás) ikont.

- 3 Válassza a **Print** (Nyomtatás) lehetőséget a lemezelrendezés kinyomtatásához, amelyet aztán felhasználhat referenciaként a könyvtárak előkészítésénél.
- 4 **[Opcionális]** Válassza az **Export** (Exportálás) lehetőséget a mintaadatok külső fájlba történő exportálásához.
Győződjön meg arról, hogy a jegyzék- és mintaadatok helyesek-e. A helytelen adatok befolyásolhatják a végeredményt.
- 5 Válassza a **Save Run** (Futtatás mentése) lehetőséget.

Futtatás szerkesztése

A futtatás adatainak szekvenálás előtti szerkesztésére vonatkozó utasításokat illetően lásd: *NextSeq 550Dx referenciá-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)*.

Elemzési módszerek

A Germline Variant elemzőmodul az alábbi elemzési lépések elvégzése után kiírja az elemzési eredmény-fájlokat az Alignment mappába.

- ▶ Indexkiolvasások demultiplexelése
- ▶ FASTQ-fájlok létrehozása
- ▶ Rendezés referenciával
- ▶ Variánsok azonosítása

Demultiplexelés

A demultiplexelés funkció összehasonlítja az egyes indexkiolvasási szekvenciákat a futtatásnál meghatározott indexszekvenciákkal. A rendszer ennél a lépésnél figyelmen kívül hagyja a minőségértékeket.

Az indexkiolvasások azonosítása az alábbiak szerint történik:

- ▶ A minták 1-gyel kezdődően sorszámot kapnak a futtatási listában elfoglalt helyük szerint.
- ▶ A 0-s mintaszám azon klaszterek részére van fenntartva, amelyek nincsenek mintához rendelve.
- ▶ A klaszterek akkor kerülnek hozzárendelésre egy mintához, amikor az indexszekvencia pontosan megegyezik, vagy amikor indexkiolvasásonként legfeljebb egy eltérés van.

FASTQ-fájl létrehozása

A demultiplexelés után a szoftver létrehoz egy FASTQ formátumú köztes elemzési fájlt. Ez egy szöveges formátumú fájl, amely a szekvenciák reprezentálására szolgál. A FASTQ-fájlok az egyes minták kiolvasásait és az azokhoz tartozó minőségi pontszámokat tartalmazza. Azokat a klasztereket, amelyek nem mentek át a szűrőn, nem tartalmazza.

Minden FASTQ-fájl csak egy minta kiolvasásait tartalmazza. A minta neve szerepel a FASTQ-fájl nevében. A FASTQ-fájlok a rendezés elsődleges forrásai. A rendszer minden mintához nyolc FASTQ-fájlt hoz létre: négyet az 1. kiolvasásból, és négyet a 2. kiolvasásból.

Rendezés

A rendezési lépés során a sávos Smith–Waterman-algoritmus összerendezi az egyes minták klasztereit a jegyzékfájlban meghatározott amplikonszekvenciákkal.

A sávos Smith–Waterman-algoritmus félglobális szekvenciarendezést hajt végre két szekvencia között a hasonló régiók meghatározása céljából. A teljes szekvencia rendezése helyett a Smith–Waterman-algoritmus az összes lehetséges hosszúságú szegmenst összehasonlítja.

Minden páros végű kiolvasást kiértékel az adott kiolvasásnak megfelelő szondaszekvencia-rendezés szempontjából.

- ▶ Az 1. kiolvasást a DLSO fordított komplementerével hasonlítja össze.
- ▶ A 2. kiolvasást az ULSO-val hasonlítja össze.
- ▶ Ha egy kiolvasás kezdete úgy egyezik egy szondaszekvenciával, hogy legfeljebb három eltérés van (a bevezető indelek eltérései vagy elcsúszásai miatt), akkor a kiolvasás teljes hosszát az adott szekvencia amplitudoncjához igazítja.
- ▶ A vizsgálat kémiai összetétele miatt a DLSO-ban és az ULSO-ban lévő indeleket figyelmen kívül hagyja.

A rendezéseket az eltérési gyakoriság szerint szűri a vizsgált területen vagy a teljes amplitudon területén, az amplitudon hosszától függően. A kiszűrt rendezések rendezetlenként kerülnek kiírásra a rendezési fájlalba, és a rendszer ezeket nem használja fel a variánsazonosításnál.

Variánsok azonosítása

Az Illumina által kifejlesztett Pisces Variant Caller a DNS-mintában jelenlévő variánsokat azonosítja.



A Pisces variánsazonosító három lépésben azonosítja az SNV-ket, az MNV-ket és a kis indeleket:

- ▶ A referenciagenom egyes pozícióit külön-külön veszi figyelembe.
- ▶ Megszámolja a bázisokat egy adott pozícióban a pozíciót átfedő rendezett kiolvasások esetében.
- ▶ A Poisson-modell alkalmazásával kiszámolja a variáns pontszámot, amely az azonosítás minőségét méri. Kizárja azokat a variánsokat, amelyek nem érik el a Q20 minőségi pontszámot.

Ha egy variáns az összes szűrőn átmegy, akkor megkapja a PASS (Megfelelt) jelölést a VCF-ben.

További információ: github.com/Illumina/Pisces/wiki.

A futtatási és mintaadatok megtekintése

- 1 A Local Run Manager infópultján kattintson a futtatás nevére.
- 2 A Run Overview (Futtatás áttekintése) lapon tekintse meg a szekvenálási futtatás mérőszámait.
- 3 **[Opcionális]** Kattintson a **Copy to Clipboard**  (Másolás vágólapra) ikonra a futtatási eredmény-mappa elérési útvonalának vágólapra másolásához.
- 4 Kattintson a Sequencing Information (Szekvenálási adatok) fülre a futtatási paraméterek és a fogyóeszközök adatainak áttekintéséhez.
- 5 Kattintson a Samples and Results (Minták és eredmények) fülre az elemzésjelentés helyének megtekintéséhez.
 - ▶ Az elemzés megismétlése esetén nyissa le a Select Analysis (Válasszon elemzést) legördülő menüt, majd válassza ki a megfelelő elemzést.
- 6 Kattintson a **Copy to Clipboard**  (Másolás vágólapra) ikonra az elemzés mappa elérési útvonalának vágólapra másolásához.

A Run Overview (Futtatás áttekintése) és a Sequencing Information (Szekvenálási adatok) lapokkal kapcsolatos további információkért, valamint az elemzés újraütemezésével kapcsolatos információkért lásd: *NextSeq 550Dx referencia-útmutató (dokumentumszám: 1000000009513)*.

Elemzésjelentés

Az elemzés eredményeinek összefoglalása a Samples and Results (Minták és eredmények) lapon, a csoportos jelentés pedig az Alignment mappában található. Emellett az egyes mintákról készült jelentés PDF formátumban is elérhető.

A Samples and Results (Minták és eredmények) lap adatai

1 A mintajelentés megtekintéséhez kattintson egy mintára a listában.

1. táblázat: A futtatás és a minta adatai

Oszlopfejléc	Leírás
Run Status (Futtatás állapota)	Azt jelzi, hogy a szekvenálási futtatás sikeres volt-e, vagy sem.
Total Yield (GB) (Összhozam (GB))	A szekvenálási futtatásban azonosított bázisok száma. A megfelelési küszöbértéket, valamint a sikeres vagy sikertelen állapotot mutatja.
% ≥ Q30	A 30(Q30) vagy jobb minőségi pontszámot elért kiolvasások százalékos aránya a szekvenálási futtatásban. A megfelelési küszöbértéket, valamint a sikeres vagy sikertelen állapotot mutatja.
Sample ID (Mintaazonosító)	A futtatás létrehozásakor megadott mintaazonosító.
Total PF Reads (Összes PF-kiolvasás száma)	A szűrőn áthaladó kiolvasások összszáma.
Read 1% ≥ Q30 (1% ≥ Q30 kiolvasás)	A 30(Q30) vagy jobb minőségi pontszámot elért kiolvasások százalékos aránya a mintánál az 1. kiolvasásban.
Read 2% ≥ Q30 (1% ≥ Q30 kiolvasás)	A 30(Q30) vagy jobb minőségi pontszámot elért kiolvasások százalékos aránya a mintánál a 2. kiolvasásban.
Autosome Call Rate (Autoszom meghívási sebesség)	A genompozíciók száma azon autoszomokon (1–22. kromoszóma), amelyek megfelelnek az előre meghatározott konfidenciaérték-küszöbnek, osztva a megvizsgált autoszom genompozíciók teljes számával. Az azonosítási sebesség megadása mintaalapú, a jelentés pedig az 1 mínuszként való számítás százalékos formájában történik (hiányos meghívásokat tartalmazó autoszom pozíciók száma osztva a szekvenált autoszom pozíciók teljes számával).

2. táblázat: Mintajelentés-adatok

Oszlopfejléc	Leírás
Sample (Minta)	A futtatás létrehozásakor megadott mintaazonosító.
Report Date (Jelentés dátuma)	A jelentés létrehozásának dátuma.
Sample Information (Mintaadatok)	A futtatás létrehozásakor megadott mintaazonosító, a szűrőn áthaladt kiolvasások teljes száma a mintában, a kiolvasások százalékos aránya a legalább 30(Q30) minőségi pontszámú mintában és az autoszom azonosítási sebesség.
Amplicon Summary (Amplikon összefoglalás)	A szekvenált amplikon régiók teljes száma és a szekvenált amplikonok bázispárjainak teljes hossza a cél régiókban a minta és a jegyzékfájl esetében. A jegyzékfájl határozza meg a rendezési lépésnél alkalmazott referenciagenomot és a megcélzott referenciaregiókat.
Read Level Statistics (Kiolvasásiszint-statisztikák)	Azon kiolvasások száma és százalékos aránya a mintánál, amelyek lefedik az egyes pozíciókat a referenciában az 1. és a 2. kiolvasásnál.

Oszlopfejléc	Leírás
Variants Summary (Variánsok összefoglalása)	A felismert SNV-szám, valamint a beszúrások és törlések száma a javasolt értékeknek megfelelő minta esetében, amelyekkel meghatározható, hogy a minőségi eredmények az elfogadható tartományon belül vannak-e.
Coverage Summary (Lefedettség összefoglalása)	A rendezett bázisok teljes száma osztva a megcélzott régiómérettel, és azon amplikonrégiók százalékos aránya, amelyek lefedettsége nagyobb, mint a $0,2 * \text{amplikon átlag lefedettség alsó határértéke}$ a mintánál.
Coverage Plots (Lefedettségi grafikonok)	Az amplikonrégió-grafikonok az amplikonrégiókon való lefedettséget mutatja a mintánál. Azok a régiók, amelyek lefedettségi értéke alacsonyabb, mint a lefedettségi küszöbérték, pirossal vannak kiemelve. Az összes érték átlagát egy narancssárga vonal jelzi.
Software Versions (Szoftververziók)	Az egyes szoftverek verziószáma a minta szekvenálásakor. Az alábbi szoftverek verziószámát jelzi: NextSeq 550Dx Operating Software (NOS), Local Run Manager, RTA és Germline Variant modul.

Elemzésieredmény-fájlok

A Germline Variant elemzőmodul az alábbi elemzésieredmény-fájlokat hozza létre, amelyek a rendezéshez és a variánsazonosításhoz használt elemzési eredményeket tartalmazzák. Az elemzésieredmény-fájlok az Alignment mappában találhatóak.

Fájlnév	Leírás
Demultiplexelés (*.txt)	Köztes fájlok, amelyek a demultiplexelés összefoglaló eredményeit tartalmazzák.
FASTQ (*.fastq.gz)	Köztes fájlok, amelyek a minőségi pontszámmal ellátott bázisazonosítókat tartalmazzák. A FASTQ-fájlok a rendezési lépés elsődleges forrásai.
BAM formátumú rendezési fájlok (*.bam)	Egy adott minta rendezési kiolvasásait tartalmazzák.
Genom VCF formátumú variánsazonosítási fájlok (*.genome.vcf.gz)	Az egyes pozíciók genotípusát tartalmazzák, függetlenül attól, hogy variánsként vagy referenciaként vannak-e azonosítva.
VCF formátumú variánsazonosítási fájlok (*.vcf.gz)	A célrégióban található összes variánsazonosítást tartalmazzák.
AmpliconCoverage_M1.tsv	A megadott jegyzékek amplikononkénti lefedettségi információit tartalmazza mintánként. Az M# a jegyzékszámot mutatja.

Demultiplexelési fájlformátum

A demultiplexelési eljárás során a rendszer kiolvassa az egyes klaszterekhez csatolt indexszekvenálásokat annak meghatározására, hogy mely mintából származik a klaszter. A klaszterek és a mintaszámok közötti kapcsolatot egy demultiplexelési (*.demux) fájlba írja az áramlási cella minden egyes csempeje esetében.

A demultiplexelési fájl elnevezésének formája s_1_X.demux, ahol X a csempe száma.

A demultiplexelési fájlok fejléccel kezdődnek:

- ▶ Version (Verzió) (4 bájtos egész szám), jelenleg 1
- ▶ Cluster count (Klaszterszám) (4 bájtos egész szám)

A fájl többi része a csempe klasztereinek mintaszámait tartalmazza.

A demultiplexelési lépés befejezése után a szoftver létrehoz egy DemultiplexSummaryF1L1.txt nevű demultiplexelési fájlt.

- ▶ A fájl nevében szereplő **F1** az áramlási cella számát mutatja.
- ▶ A fájl nevében szereplő **L1** a sor számát mutatja.
- ▶ A demultiplexelési eredmények egy táblázatban szerepelnek, ahol minden csempéhez egy sor és minden mintához egy oszlop tartozik (a 0-s mintát is beleértve).
- ▶ Az indexkiolvasások leggyakrabban előforduló szekvenciái.

FASTQ fájlformátum

A FASTQ egy szöveges fájlformátum, amely a bázisazonosítókat és a kiolvasásonkénti minőségértékeket tartalmazza. Minden rekord 4 sort tartalmaz:

- ▶ Az azonosítót
- ▶ A szekvenciát
- ▶ Egy plusz jelet (+)
- ▶ A Phred minőségi pontszámokat ASCII + 33 kódolású formátumban

Az azonosító formátuma:

@Műszer:Futtatási azonosító:Áramláscella-azonosító:Sáv:Csempe:X:Y Kiolvasási szám:Szűrőjelzés:0:Mintaszám

Példa:

```
@SIM:1:FCX:1:15:6329:1045 1:N:0:2
TCGCACTCAACGCCCTGCATATGACAAGACAGAATC
+
<>;##=><9=AAAAAAAAA9#:<#<;<<<?????#=#
```

BAM fájlformátum

A BAM-fájl (*.bam) a SAM-fájl tömörített, bináris változata, amely a rendezett szekvenciák reprezentálására szolgál legfeljebb 128 MB-os méretig. A SAM és a BAM formátum részletes leírását lásd: samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf.

A BAM-fájlok nevének formátuma **SampleName_S#.bam**, ahol # az a mintaszám, amit a futtatásnál felsorolt minták sorrendje határoz meg.

A BAM-fájlok egy fejléc részt és egy rendezési részt tartalmaznak:

- ▶ **Header** (Fejléc) – A fájl egészéről tartalmaz információkat, például a minta nevét, a minta hosszát és a rendezés módszerét. A rendezési részben szereplő rendezések a fejléc részben szereplő információkhoz vannak társítva.
- ▶ **Alignments** (Rendezések) – A kiolvasás nevét, a kiolvasási sorrendet, a kiolvasási minőséget, a rendezési információkat és az egyéni címkéket tartalmazza. A kiolvasási név a kromoszómát, a kezdőkoordinátát, a rendezési minőséget és az egyezési leírósstringet tartalmazza.

A rendezési rész az alábbi információkat tartalmazza minden egyes kiolvasás vagy kiolvasáspár esetében:

- ▶ **AS:** Páros végű rendezési minőség.
- ▶ **RG:** Kiolvasási csoport, amely egy adott minta kiolvasásainak számát mutatja.
- ▶ **BC:** Vonalkódcímke, amely a kiolvasáshoz társított demultiplexelt mintaazonosítót mutatja.
- ▶ **SM:** Egyvégű rendezési minőség.
- ▶ **XC:** Egyezési leírósstring.

- ▶ **XN:** Amplikonnév címke, amely a kiolvasáshoz társított amplitikonazonosítót rögzíti.

A BAM-indexfájlok (*.bam.bai) biztosítják az indexet a megfelelő BAM-fájl részére.

VCF fájlformátum

A .vcf (Variant Call Format, variánsazonosítási formátum) egy, a genommal foglalkozó tudományos közösség által kifejlesztett általános fájlformátum. Ez a referenciagenom meghatározott pozícióiban található variánsokkal kapcsolatos információkat tartalmazza. A VCF-fájlok .vcf-re végződnek.

A VCF-fájl fejléce a VCF fájlformátum és a variánsazonosító verzióját tartalmazza, valamint felsorolja a fájl egyéb részeiben található megjegyzéseket. A VCF-fejléc ezenkívül a referenciagenom fájlt és a BAM-fájlt is tartalmazza. A fejléc utolsó sorában az adatsorok oszlopfejlécei találhatók. A VCF-fájl minden adatsora egy-egy variáns információit tartalmazza.

VCF-fájl fejlécei

Fejléc	Leírás
CHROM (Kromoszóma)	A referenciagenom kromoszómája. A kromoszómák ugyanabban a sorrendben jelennek meg, mint a referencia FASTQ-fájlban.
POS (Pozíció)	A variáns egybázisú pozíciója a referenciakromoszómában. SNP-k esetében ez a pozíció a variáns referenciabázisa; indelek vagy törlések esetében ez a pozíció a közvetlenül a variáns előtti referenciabázis.
ID (Azonosító)	A variáns dbSNP.txt fájlból származó rs-száma (ha van). Ha az adott helyen több rs-szám is található, akkor a lista egyes elemei pontosvesszővel vannak elválasztva. Ha az adott helyen nincs dbSNP bejegyzés, akkor a rendszer ezt egy hiányzóérték-jelölővel ('.') jelöli.
REF (Referencia)	A referencia genotípus. Például egyetlen T törlése referencia TT és eltérő T értéként van jelölve. Egyetlen A–T nukleotidvariáns referencia A és eltérő T értéként van jelölve.
ALT (Eltérés)	A referenciakiolvasástól eltérő allélok. Például egyetlen T beszúrása referencia A és eltérő AT értéként van jelölve. Egyetlen A–T nukleotidvariáns referencia A és eltérő T értéként van jelölve.
QUAL (Minőség)	A variánsazonosító által hozzárendelt, Phred-skála szerinti minőségi pontszám. A nagyobb pontszám magasabb variánskonfidenciát és alacsonyabb hibalehetőséget jelez. A Q minőségi pontszámnál a hiba becsült előfordulási lehetősége $10^{-(Q/10)}$. Például Q30 esetén a hiba előfordulási gyakorisága 0,1%. Számos variánsazonosító statisztikai modell alapján határozza meg a minőségi pontszámot, amely szoros összefüggésben van a megfigyelt hibaelőfordulási gyakorisággal.

VCF-fájl megjegyzései

Fejléc	Leírás
FILTER (Szűrő)	<p>Az összes szűrőn való áthaladás esetén a rendszer PASS (Megfelelt) értéket ír a szűrő oszlopba.</p> <ul style="list-style-type: none"> • LowDP (Alacsony DP) – Ezt a besorolást azok a régiók kapják meg, amelyek mélységfedettsége 150x alatt van. Azon amplikonpozíciók esetében, amelyeknél oda-vissza olvasás ment végbe, ez 300 átfedő, páros végű kiolvasást jelent. • q20 – 20-nál alacsonyabb minőségi pontszám. • MultiAllelicSite (Többallélos régió) – A variáns nem felel meg a diploid modellnek. • R5x9 – A szomszédos ismétlések száma (1–5 bp hosszúság) a variánsazonosításoknál ≥ 9. • SB – A szálirány-eltérés nagyobb, mint a megadott küszöbérték.
INFO (Információk)	<p>Az INFO oszlopban az alábbi bejegyzések szerepelhetnek:</p> <ul style="list-style-type: none"> • AC – A genotípus allélszáma az egyes ALT alléloknál, a felsorolás sorrendjében. • AF – Allélgyakoriság az egyes ALT alléloknál, a felsorolás sorrendjében. • AN – Az allélok össz-száma a meghívott genotípusoknál. • CD – Figyelmeztet, hogy legalább egy RefGene (Referenciagén) bejegyzés kódolási régiójánál SNP fordul elő. • DP – Egy pozícióhoz rendezett és a variánsazonosításoknál használt bázisazonosítók mélységszáma. • Exon – A RefGene (Referenciagén) bejegyzésből kiolvasott exonrégiók vesszővel elválasztott listája. • FC – Funkcionális következmény. • GI – A RefGene (Referenciagén) bejegyzésből kiolvasott génazonosítók vesszővel elválasztott listája. • QD – Variánskonfidencia/mélység szerinti minőség. • TI – A RefGene (Referenciagén) bejegyzésből kiolvasott másolatazonosítók vesszővel elválasztott listája.
FORMAT (Formátum)	<p>A formátum oszlopban a mezők vannak felsorolva, kettősponttal elválasztva. Példa: GT:GQ. A megadott mezők listája a használt variánsazonosítótól függ. Az elérhető mezők az alábbiak:</p> <ul style="list-style-type: none"> • AD – Egy X,Y formátumú bejegyzés, ahol az X a referenciaazonosítások száma, az Y pedig az eltérő azonosítások száma. • DP – Hozzávetőleges kiolvasási mélység; az MQ=255 értékkel, valamint a rossz párral rendelkező kiolvasásokat kiszűri. • GQ – Genotípus minősége. • GT – Genotípus. A 0 a referenciabázisnak felel meg, az 1 az ALT oszlop első bejegyzésének és így tovább. A perjel (/) azt jelzi, hogy a fázisolási információ nem elérhető. • NC – Azoknak a bázisoknak a frakciója, amelyek nem lettek azonosítva, vagy amelyek minősége nem éri el az alsó küszöbértéket. • NL – Zajsztint; a bázisazonosító zajsztintjének becsült értéke az adott pozícióban. • SB – Szálirányeltérés az adott pozícióban. A nagyobb negatív értékek kisebb szöveget jeleznek; a 0 közeli értékek nagyobb szöveget jeleznek. • VF – Variánsyakoriság; az eltérő allélt támogató kiolvasások százalékos aránya.
SAMPLE (Minta)	A minta oszlopban a FORMAT (Formátum) oszlopban meghatározott értékek láthatók.

Genome VCF-fájlok

A Genome VCF (gVCF) fájlok olyan VCF v4.1 fájlok, amelyek meghatározott konvenciók szerint a genom összes régióját reprezentálják egy észszerűen kis méretű formátumban. A gVCF (*.genome.vcf.gz) fájlok a vizsgált terület összes régióját tartalmazzák, mintánként egy-egy fájlban.

A gVCF-fájlokban azokon a pozíciókon, amelyek nem haladtak át az összes szűrőn, nincsenek azonosítások. Az azonosítás hiányát a ./ genotípus (GT) jelzi.

További információ: sites.google.com/site/gvcftools/home/about-gvcf.

Amplikonlefedettség fájl

A rendszer minden jegyzékfájlhoz létrehoz egy amplikonlefedettségi fájlt. A fájlnevében található M# a jegyzékszámot jelöli.

Minden fájl tartalmaz egy fejlécsort, ahol a jegyzékhez tartozó mintaazonosító szerepel. A fájl az alábbi információkat tartalmazza.

- ▶ A jegyzékben feltüntetett célazonosító.
- ▶ A szűrőn átjutó kiolvasások lefedettségi mélysége.

Kiegészítő kimeneti fájlok

Az alábbi kimeneti fájlok kiegészítő információkkal szolgálnak, vagy összefoglalják a futtatás eredményeit és az elemzés során fellépő hibákat. Habár ezek a fájlok nem szükségesek az elemzés eredményeinek kiértékeléséhez, hasznosak lehetnek hibaelhárításkor. Minden fájl az Alignment mappában található, hacsak nincs másként jelezve.

Fájlnev	Leírás
AnalysisLog.txt	Feldolgozási naplófájl, amely az aktuális futtatás elemzése során előfordult összes lépést leírja. A fájl nem tartalmaz hibaüzeneteket. Az Alignment mappában található.
AnalysisError.txt	Feldolgozási naplófájl, amely az elemzés során felmerült összes hibát felsorolja. Ha nem történt hiba, akkor ez a fájl üres. Az Alignment mappában található.
DemultiplexSummaryF1L1#.txt	A demultiplexelési eredményeket tartalmazza táblázatos formában, ahol minden csempéhez egy sor és minden mintához egy oszlop tartozik. A # az áramlási cella 1., 2., 3. vagy 4. sorát jelzi. Az Alignment mappában található.
AmpliconRunStatistics.xml	A futtatásra vonatkozó összefoglaló statisztikákat tartalmazza. Az Alignment mappában található.

Elemzés mappa

Az elemzés mappa tartalmazza a Local Run Manager szoftver által létrehozott fájlokat.

A kimeneti mappa és az elemzés mappa közötti kapcsolat az alábbiak szerint foglalható össze:

- ▶ Szekvenáláskor a Real-Time Analysis (RTA) szoftver a képelemzés, a bázisazonosítás és a minőségi pontszám kiszámítása során létrehozott fájlokat elhelyezi a kimeneti mappában.
- ▶ Az RTA valós időben átmásolja a fájlokat az elemzés mappába. Miután az RTA hozzárendelte a minőségi pontszámot az egyes bázisokhoz az egyes ciklusoknál, a szoftver mindkét mappában létrehozza az RTAComplete.txt fájlt.
- ▶ Amikor az RTAComplete.txt fájl a helyére kerül, megkezdődik az elemzés.
- ▶ Az elemzés során a Local Run Manager a kimeneti fájlokat az elemzés mappába helyezi, majd visszamásolja azokat a kimeneti mappába.

Rendezési mappák

Amikor az elemzést újraütemezik, a Local Run Manager létrehoz egy **Alignment_N** nevű rendezési mappát, ahol az N egy sorszám.

Mappaszerkezet

Alignment – *.bam, *.vcf, FASTQ-fájlokat és olyan fájlokat tartalmaz, amelyek az elemzőmodulhoz tartoznak.

Date and Time Stamp – Az elemzés időbélyegzője. Formátuma: ÉÉÉÉHHNN_ÓÓPPMM

- 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 – *.bcl fájlokat tartalmaz.

L001 – *.locs fájlokat tartalmaz.

RTA Logs – Az RTA szoftver elemzéséből származó naplófájlokat tartalmazza.

InterOp – A szekvenálási futtatás mérőszámainak jelentésére szolgáló bináris fájlokat tartalmazza.

Logs – A szekvenálás során végrehajtott lépések leírásait tartalmazó naplófájlokat tartalmazza.

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

Bázisazonosítás és indexdiverzitás

A NextSeq 550Dx műszeren végzett mintaszekvenáláskor a bázisazonosító határozza meg a bázist (A, C, G vagy T) egy adott csempe minden klasztere esetében, vagy a képkötési területet az áramlási cellán egy meghatározott ciklus mellett. A NextSeq 550Dx kétcsatornás szekvenálást alkalmaz, így mindössze két képre van szükség ahhoz, hogy az adatokat négy DNS-bázishoz kódolja: az egyiket a piros csatornáról, a másikat pedig a zöld csatornáról.

A bázisazonosító indexek kiolvasásának folyamata eltér az egyéb kiolvasások során végzett bázisazonosítástól.

Az indexkiolvasásoknak az első két ciklus valamelyikében legalább egy, a G-től eltérő bázissal kell kezdődniük. Ha az indexkiolvasás két G bázisazonosítóval kezdődik, akkor a rendszer nem generál jelintenzitást. A jelnek az első két ciklus valamelyikében jelen kell lennie, máskülönben a demultiplexelés kellő hatásfoka nem biztosított.

Ha az indexek kiválasztása vagy egy futtatás létrehozása során az indexek nem felelnek meg a diverzitásra vonatkozó követelményeknek, akkor a rendszer alacsony diverzitás figyelmeztetést jelenít meg. Az „alacsony diverzitás” figyelmeztetés elkerülése érdekében olyan indexszekvenciákat válasszon ki, amelyek minden ciklusnál mindkét csatornánál adnak jelet.

- ▶ Piros csatorna – A vagy C
- ▶ Zöld csatorna – A vagy T

Ez a bázisazonosítási eljárás biztosítja a pontosságot low-plex minták elemzésekor. Az indexek szekvenálásával kapcsolatos további információkért lásd a *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* (dokumentumszám: 1000000029772) tájékoztatóját.

Amikor létrehoz egy futtatást a Local Run Manager szoftverben, ki kell választania a tesztelni kívánt minták számát. A szoftver automatikusan megad egy olyan indexkombináció-számot, amely megfelel az indexdiverzitásra vonatkozó követelményeknek. Ezen érték használata nem kötelező, de ajánlott.

Módosítási előzmények

Dokumentum	Dátum	Módosítások leírása
1000000030329 sz. dokumentum v04	2021. augusztus	Az európai uniós meghatalmazott képviselő címének frissítése.
1000000030329 sz. dokumentum v03	2020. április	Az európai uniós meghatalmazott képviselő címének frissítése. Az ausztráliai szponzor címének frissítése.
1000000030329 sz. dokumentum, v02 változat	2019. január	Új információk a v2.5 reagenskészletekről.
1000000030329 sz. dokumentum v01	2018. augusztus	Frissített szabályozási jelölések.
1000000030329 sz. dokumentum v00	2017. november	Első kiadás.

Műszaki támogatás

Ha műszaki támogatásra van szüksége, vegye fel a kapcsolatot az Illumina műszaki ügyfélszolgálatával.

Weboldal: www.illumina.com
E-mail: techsupport@illumina.com

Az Illumina ügyfélszolgálati telefonszámai

Régió	Ingyenesen hívható	Regionális
Észak-Amerika	+1-800-809-4566	
Ausztrália	+1-800-775-688	
Ausztria	+43 800006249	+43 19286540
Belgium	+32 80077160	+32 34002973
Dánia	+45 80820183	+45 89871156
Egyesült Királyság	+44 8000126019	+44 2073057197
Finnország	+358 800918363	+358 974790110
Franciaország	+33 805102193	+33 170770446
Hollandia	+31 8000222493	+31 207132960
Hongkong	800960230	
Írország	+353 1800936608	+353 016950506
Japán	0800.111.5011	
Kína	400.066.5835	
Németország	+49 8001014940	+49 8938035677
Norvégia	+47 800 16836	+47 21939693
Olaszország	+39 800985513	+39 236003759
Spanyolország	+34 911899417	+34 800300143
Svájc	+41 565800000	+41 800200442
Svédország	+46 850619671	+46 200883979
Szingapúr	+1.800.579.2745	
Tajvan	00806651752	
Új-Zéland	0800.451.650	
Egyéb országok	+44.1799.534000	

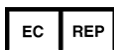
Biztonsági adatlapok (SDS-ek) – Az Illumina support.illumina.com/sds.html címen elérhető weboldalán találhatóak.

A termék dokumentációja – PDF formátumban tölthető le az Illumina weboldaláról. Lépjen a support.illumina.com weboldalra, válasszon egy terméket, majd válassza a **Documentation & Literature** (Dokumentáció és szakirodalom) menüpontot.



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 Egyesült Államok
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (Észak-Amerikán kívül)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE



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

Ausztrál szponzor

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

IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA

© 2021 Illumina, Inc. Minden jog fenntartva.

illumina®