

Local Run Manager

Somatisk variantanalysemodul

Arbeidsflytveiledning for MiSeqDx

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

Oversikt	3
Oppgi kjøringsinformasjon	3
Analysemetoder	5
Vise kjørings- og prøvedata	6
Analyserapport	7
Analyseutdatafiler	8
Teknisk hjelp	15



Dette dokumentet og dets innhold er opphavsrettslig beskyttet for Illumina, Inc. og tilknyttede selskaper («Illumina»), og er ment utelukkende for kontraktbruk av sin kunde i forbindelse med bruk av produktet (produktene) beskrevet her, og for intet annet formål. Dette dokumentet og dets innhold skal ikke brukes eller distribueres til andre formål og/eller på annen måte kommuniseres, fremlegges eller reproduseres på noen måte uten forutgående, skriftlig samtykke fra Illumina. Illumina fører ikke noen lisens under sin patent, varemerke, opphavsrett eller sedvanerett eller lignende rettigheter til tredjeparter ved dette dokumentet.

Instruksjonene i dette dokumentet skal være strengt og tydelig fulgt av kvalifisert og tilfredsstillende utdannet personell for å sikre riktig og sikker bruk av produktet (produktene) som er beskrevet i dette dokumentet. Alt innhold i dette dokumentet skal leses fullt ut og være forstått før produktet (produktene) brukes.

HVIS DET UNNLATES Å FULLSTENDIG LESE OG UTTRYKkelig FØLGE ALLE INSTRUKSJONENE I DETTE DOKUMENTET, KAN DETTE FØRE TIL SKADE PÅ PRODUKTET (PRODUKTENE), SKADE PÅ PERSONER, INKLUDERT BRUKERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANNEN EIENDOM.

ILLUMINA PÅTAR SEG IKKE ANSVAR SOM FØLGE AV FEIL BRUK AV PRODUKTET (PRODUKTENE) SOM ER BESKREVET I DETTE DOKUMENTET (INKLUDERT DELER AV DETTE ELLER PROGRAMVARE).

© 2021 Illumina, Inc. Med enerett.

Illumina, MiSeqDx og streamingbase-designen er registrerte eller ventende varemerker som tilhører Illumina, Inc. og/eller tilknyttede selskaper i USA og/eller andre land. Alle andre navn, logoer og andre varemerker tilhører deres respektive eiere.

Oversikt

Local Run Manager somatisk variantanalysemodul er til bruk med Illumina TruSeq Custom Amplicon Kit Dx-analysen. Når analysen brukes med den somatiske variantmodulen, er den ment for klargjøring av biblioteker som anvendes til sekvensering av DNA fra formalinfiksert, parafininnstøpt (FFPE) vev. Analysen oppdager somatiske mutasjoner ved lave variantfrekvenser.

Analysemodulen evaluerer korte regioner av amplifisert DNA, eller PCR-produkter, for varianter. Fokuset på sekvensering av ampliconer muliggjør høy dekning av bestemte regioner på tvers av et stort antall prøver. Analysemodulen utfører sekundær analyse og rapportgenerering fra sekvenseringskjøringer ved bruk av en to-strengt tilnærming som involverer en forover og en reversert oligo-pool. Se pakningsvedlegget *TruSeq Custom Amplicon Kit Dx* (dokumentnr. 1000000029772).

Somatisk variantanalysemodulen krever sekvenseringsforbruksmaterialer fra MiSeqDx Reagent Kit v3. Se pakningsvedlegget *MiSeqDx Reagent Kit v3* (dokumentnr. 1000000030849).

Om denne veiledningen

Denne veiledningen gir instruksjoner for å konfigurere kjøringsparametere for sekvensering og analyse for somatisk variantanalysemodulen. Informasjon om Local Run Manager-instrumentbordet og -systeminnstillingene finnes i *Referanseveiledning for Local Run Manager-programvaren* (dokumentnr. 1000000011880).

Oppgi kjøringsinformasjon

Angi parametere

- 1 Logg deg på Local Run Manager.
- 2 Klikk på **Create Run** (Opprett kjøring), og velg **Somatic Variant** (Somatisk variant).
- 3 Skriv inn et kjøringsnavn som identifiserer kjøringen fra sekvensering til og med analyse. Bruk alfanumeriske tegn, mellomrom, understreker eller bindestreker.
- 4 [Valgfritt] Angi en kjøringsbeskrivelse for å identifisere kjøringen. Bruk alfanumeriske tegn, mellomrom, understreker eller bindestreker.
- 5 Velg antall prøver og indekssett fra rullegardinlisten.

Importere manifestfiler for kjøringen

- 1 Kontroller at manifestene du vil importere, er tilgjengelige på en tilgjengelig nettverksplasing eller på en USB-stasjon.
- 2 Klikk på **Import Manifests** (Importer manifeste).
- 3 Naviger til manifestfilen, og velg manifestene du vil legge til.



MERK

For å gjøre manifestfiler tilgjengelige for alle kjøring ved hjelp av den somatiske analysemodulen legger du til manifestene ved hjelp av modulinnstillingsfunksjonen. Denne funksjonen krever administratorrettigheter. Se *Referanseveiledning for Local Run Manager-programvare* (dokumentnr. 1000000011880) for mer informasjon.

Angi prøver for kjøringen

Angi prøver for kjøringen ved å bruke ett av alternativene og instruksjonene som følger.


- ▶ **Enter samples manually** (Angi prøver manuelt) – Bruk den tomme tabellen i skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).
- ▶ **Import samples** (Importer prøver) – Naviger til en ekstern fil i et format med kommaseparerte verdier (*.csv). En mal er tilgjengelig for nedlasting i skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).

Etter at du har fylt ut prøvetabellen, kan du eksportere prøveinformasjonen til en ekstern fil og bruke filen som referanse når du klargjør bibliotek, eller importere filen til en annen kjøring.

Legge inn prøver manuelt

- 1 Angi et unikt prøvenavn i feltet Sample Name (Prøvenavn).
Bruk alfanumeriske tegn, bindestreker eller understreker.
Prøvenavnet fyller automatisk den tilsvarende brønnen i den andre poolen.
- 2 [Valgfritt] For positive eller negative kontrollprøver, høyreklikk og velg kontrolltypen.
Kontrollen i en prøvebrønn fyller automatisk den tilsvarende brønnen i den andre poolen med samme kontroll.
- 3 [Valgfritt] Skriv inn en prøvebeskrivelse i feltet Sample Description (Prøvebeskrivelse).
Bruk alfanumeriske tegn, bindestreker eller understreker.
Prøvebeskrivelsen fyller automatisk den tilsvarende brønnen i den andre poolen.
Prøvebeskrivelser er knyttet til en prøve-ID. Prøvebeskrivelser overskrives hvis samme prøve-ID brukes igjen i en senere kjøring.
- 4 Velg en indeks 1-adapter fra rullegardinlisten Index 1 (i7) (Indeks 1 (i7)).
- 5 Velg en indeks 2-adapter fra rullegardinlisten Index 2 (i7) (Indeks 2 (i7)).
- 6 Velg en manifestfil fra rullegardinlisten Manifest.
Prøver i pool A krever et annet manifest enn prøver i pool B.
- 7 Velg et alternativ for å vise, skrive ut eller lagre plateoppsettet som en referanse for klargjøring av biblioteker:
 - ▶ Klikk på ikonet  **Print** (Skriv ut) for å vise plateoppsettet. Velg **Print** (Skriv ut) for å skrive ut plateoppsettet.
 - ▶ Klikk på **Export** (Eksporter) for å eksportere prøveinformasjon til en ekstern fil.
Kontroller at manifest- og prøveinformasjon er riktig. Feil informasjon kan påvirke resultatene.
- 8 Klikk på **Save Run** (Lagre kjøring).

Importere prøver

- 1 Klikk på **Import Samples** (Importer prøver), og bla til plasseringen av prøveinformasjonsfilen. Det finnes to typer filer du kan importere.
 - ▶ Klikk på **Template** (Mal) i skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) for å lage et nytt plateoppsett. Malfilen inneholder de riktige kolonneoverskriftene for import. Skriv inn prøveinformasjon i hver kolonne for prøvene i kjøringen. Slett eksempelinformasjon i ubrukte celler, og lagre deretter filen.
 - ▶ Bruk en fil med prøveinformasjon som ble eksportert fra den somatiske variantmodulen med funksjonen Export (Eksporter).
- 2 Klikk på ikonet  **Print** (Skriv ut) for å vise plateoppsettet.

- 3 Velg **Print** (Skriv ut) for å skrive ut plateoppsettet som en referanse for klargjøring av biblioteker.
- 4 [Valgfritt] Klikk på **Export** (Eksporter) for å eksportere prøveinformasjon til en ekstern fil. Kontroller at manifest- og prøveinformasjon er riktig. Feil informasjon kan påvirke resultatene.
- 5 Klikk på **Save Run** (Lagre kjøring).

Redigere en kjøring

Instruksjoner om hvordan du redigerer informasjonen i kjøringen før sekvensering finnes i *Referanseveiledning for Local Run Manager-programvaren (dokumentnr. 1000000011880)*.

Analysemetoder

Den somatiske variantanalysemodulen utfører følgende analysetrinn og skriver deretter analyseutdatafiler til mappen Alignment (Innretting).

- ▶ Demultiplekser indeksavlesninger
- ▶ Genererer FASTQ-filer
- ▶ Innretter etter en referanse
- ▶ Identifiserer varianter

Demultipleksing

Demultipleksing sammenligner hver indeksavlesningssekvens med indekssekvensene som er angitt for kjøringen. Ingen kvalitetsverdier vurderes på dette trinnet.

Indeksavlesninger identifiseres ved hjelp av følgende trinn:

- ▶ Prøvene er nummerert fra 1 basert på rekkefølgen de er oppført i for kjøringen.
- ▶ Prøvenummer 0 er reservert for klynger som ikke ble tildelt en prøve.
- ▶ Klynger tilordnes en prøve når indekssekvensen samsvarer nøyaktig eller når det er opptil ett misforhold per indeksavlesning.

FASTQ-filgenerering

Etter demultipleksing genererer programvaren mellomliggende analysefiler i FASTQ-formatet, som er et tekstformat som brukes til å representere sekvenser. FASTQ-filer inneholder avlesninger for hver prøve og tilhørende kvalitetsscore. Klynger som ikke passerte filter, utelukkes.

Hver FASTQ-fil inneholder avlesninger for bare én prøve, og navnet på denne prøven er inkludert i FASTQ-filnavnet. FASTQ-filer er primære inndata for innretting. Det genereres fire FASTQ-filer per prøve, to fra pool A og to fra pool B.

Innretting

Under innrettingstrinnet innretter den bundne Smith-Waterman-algoritmen klynger fra hver prøve med PCR-produktsekvenser spesifisert i manifestfilen.

Den bundne Smith-Waterman-algoritmen utfører halvglobale sekvensinnrettinger for å bestemme lignende regioner mellom 2 sekvenser. I stedet for å sammenligne den totale sekvensen, sammenligner Smith-Waterman-algoritmen segmenter med alle mulige lengder.

Hver paired-end-avlesning blir evaluert med hensyn til sin innretting med de relevante probesekvensene for denne avlesingen.

- ▶ Read 1 evalueres mot reverskomplementet av nedstrøms lokusspesifikke oligoer (DLSO).
- ▶ Read 2 blir vurdert opp mot oppstrøms lokusspesifikke oligoer (ULSO).
- ▶ Hvis starten på en avlesing samsvarer med en probesekvens med ikke mer enn 3 ulikheter (misforhold eller forskyvninger på grunn av ledende indeler), innrettes den fulle lengden av avlesingen mot PCR-produktmålet for den sekvensen.
- ▶ Indeler innenfor DLSO og ULSO blir ikke observert på grunn av analysekjemien.

Innrettinger filtreres fra innrettingsresultater basert på antall misforhold over enten interesseområdet eller hele PCR-produktet, avhengig av PCR-produktlengden. Filtrerte innrettinger registreres i innrettingsfiler som uinnrettede og brukes ikke i variantbetegnelse.

Variantbetegnelse

Pisces variantbetegner er utviklet av Illumina og identifiserer varianter som er til stede med lav frekvens i DNA-prøven.

Pisces variantbetegner identifiserer SNP-er i tre trinn:

- ▶ Vurderer hver posisjon i referansegenomet separat
- ▶ Teller baser på den angitte posisjonen for innrettede avlesninger som overlapper posisjonen
- ▶ Beregner en variantscore som måler kvaliteten på betegnelsen ved hjelp av Poisson-modellen. Varianter med kvalitetsscore under Q30 utelates.

Varianter betegnes først for hver pool hver for seg. Deretter sammenlignes og kombineres varianter fra hver pool til en enkelt utdatafil. Hvis en variant oppfyller følgende kriterier, merkes varianten som PASS i variantbetegnelsesfilen (VCF):


- ▶ Varianten er til stede i begge pool
- ▶ Har en kumulativ dybde på 900x (minst 450x per pool)
- ▶ Har en variantfrekvens på $\geq 2,6\%$ som rapportert i den fusjonerte VCF-filen


Pisces (somatisk variantbetegner)

Pisces utfører somatisk variantbetegnelse for å identifisere varianter ved lav frekvens i DNA-prøver. Programmet kan kjøre på alle prøver og genererer VCF- og gVCF-filer.

Se github.com/Illumina/Pisces/wiki for mer informasjon.

Vise kjørings- og prøvedata

- 1 Fra Local Run Manager-instrumentbordet klikker du på kjøringsnavnet.
- 2 Fra fanen Run Overview (Kjøringsoversikt) går du gjennom sekvenskjøringsmetrikken.
- 3 [Valgfritt] Klikk på ikonet **Copy to Clipboard**  (Kopier til utklippstavle) for å kopiere banen til utgangskjøringsmappen.
- 4 Klikk på fanen Sequencing Information (Sekvenseringsinformasjon) for å se informasjon om kjøringparametere og forbruksvarer.

- 5 Klikk på fanen Samples and Results (Prøver og resultater) for å vise analyserapportens plassering.
 - ▶ Hvis analysen ble gjentatt, utvider du rullegardinlisten Select Analysis (Velg analyse) og velger den aktuelle analysen.
- 6 Klikk på ikonet **Copy to Clipboard**  (Kopier til utklippstavle) for å kopiere banen til mappen Analysis (Analyse).

Du finner mer informasjon om fanene Run Overview (Kjøringsoversikt) og Sequencing Information (Sekvenseringsinformasjon), og om hvordan analyser settes tilbake i kø, i *Referanseveiledning for Local Run Manager-programvaren (dokumentnr. 1000000011880)*.

Analyserapport

Analyseresultater oppsummeres på fanen Samples and Results (Prøver og resultater) og som en samlet rapport i mappen Alignment (Innretting). En rapport for hver prøve er også tilgjengelig i PDF-format for hver prøve.

Informasjon om fanen Sample and Details (Prøve og detaljer)

- 1 Klikk på en prøve i listen for å se prøverapporten.

Tabell 1 Tabellen Run Information (Kjøringsinformasjon)

Kolonneoverskrift	Beskrivelse
Run Status (Kjøringsstatus)	Angir om sekvenseringskjøringen var godkjent eller mislyktes.
Total Yield (GB) (Total produksjon (GB))	Antall baser betegnet i sekvenseringskjøringen. Viser grenseverdi for godkjenning, og status (godkjent eller mislykket).
% ≥ Q30	Prosentandelen av avlesninger i sekvenseringskjøringen med en kvalitetsscore på 30 (Q30) eller høyere. Viser grenseverdi for godkjenning, og status (godkjent eller mislykket).
Sample Name (Prøvenavn)	Prøvenavnet som ble gitt da kjøringen ble opprettet.
Total PF Reads (PF-avlesninger totalt)	Totalt antall avlesninger som passerer filteret.
Read 1% ≥ Q30	Prosentandelen av avlesninger i Read 1 med en kvalitetsscore på 30 (Q30) eller høyere for prøven.
Read 2% ≥ Q30	Prosentandelen av avlesninger i Read 2 med en kvalitetsscore på 30 (Q30) eller høyere for prøven.
Autosome call rate (Betegnelsesfrekvens for autosomer)	Antallet genomiske posisjoner blant autosomene (kromosom 1 til 22) som oppfyller en forhåndsdefinert konfidensverditerskel, dividert med det totale antallet autosomale genomiske posisjoner som behandles. Betegnelsesfrekvensen på per prøve-basis og rapportert som prosentandel som er beregnet som 1 minus (antall autosomale posisjoner med ufullstendige betegnelser, dividert med totalt antall sekvenserte autosomale posisjoner).

Tabell 2 Tabellen Sample Reports (Prøverapporter)

Kolonneoverskrift	Beskrivelse
Sample (Prøve)	Prøvenavnet som ble gitt da kjøringen ble opprettet.
Report Date (Rapportdato)	Datoen rapporten ble generert.

Kolonneoverskrift	Beskrivelse
Sample Information (Prøveinformasjon)	Prøve-ID-en som ble oppgitt da kjøringen ble opprettet, totalt antall avlesninger som passerte filteret i prøven, prosentandelen av avlesninger for prøven med en kvalitetsscore på 30 (Q30) eller høyere, og den autosomale betegnelsesfrekvensen.
Amplicon Summary (PCR-produktsammendrag)	Totalt antall sekvenserte PCR-produktregioner, og total lengde i basepar av sekvenserte PCR-produkter i målregionene, for prøven i pool A og pool B og manifestfilen som brukes for hver pool. Manifestfilen angir referansegenomet og målrettede referanseregioner som brukes i innrettingstrinnet.
Read Level Statistics (Statistikk på avlesningsnivå)	Antall og prosent av avlesninger for prøven som dekker hver posisjon i referansen, for Read 1 og Read 2 i pool A og pool B.
Variants Summary (Variantsammendrag)	Antall SNV-er, innsettinger og slettinger oppdaget for prøven som passerte foreslåtte verdier, for å avgjøre om kvalitetsresultatene er innenfor et akseptabelt område,
Coverage Summary (Dekningsammendrag)	Det totale antallet justerte baser dividert med målrettet regionstørrelse og prosentandelen av PCR-produktregioner med dekningsverdier som er større enn den lave dekningssterskelen på 0,2* PCR-produktdekning, for prøven i pool A og pool B.
Coverage Plots (Dekningsplott)	Dekningen av PCR-produktregionplottet viser deknningen over PCR-produktregionene for prøven. Regioner med dekningsverdier som er lavere enn dekningssterskelen, er markert i rødt. Gjennomsnittet av alle verdiene er angitt med en oransje linje. Et plott er gitt for dekning av pool A og pool B.
Software Versions (Programvareversjoner)	Programvareversjoner da prøven ble sekvensert. Inkluderer MiSeq Operating Software, Local Run Manager Software, RTA Software, og de somatiske variantmodulversjonene.

Analyseutdatafiler

Følgende analyseutdatafiler genereres for den somatiske variantanalysemodulen og gir analyseresultater for innretting og variantbetegnelse. Analyseutdatafiler finnes i mappen Alignment (Innretting).

Filnavn	Beskrivelse
Demultipleksing (*.txt)	Mellomliggende filer som inneholder sammendrag av resultater fra demultipleksing.
FASTQ (*.fastq.gz)	Mellomliggende filer som inneholder kvalitetsscorede basebetegnelser. FASTQ-filer er den primære inngangen for innrettingstrinnet.
Innrettingsfiler i BAM-format (*.bam)	Inneholder innrettede avlesninger for en gitt prøve.
Filer for variantbetegnelse per pool i VCF-format (*.vcf)	Inneholder varianter som betegnes i hver posisjon fra enten forover pool eller reversert pool.
Variantbetegnelsesfiler i genom-VCF-format (*.genome.vcf.gz)	Inneholder genotypen for hver posisjon, enten den betegnes som en variant eller som en referanse.
Konsensus-variantbetegnelsesfiler i VCF-formatet (*.vcf.gz)	Inneholder varianter som betegnes ved hver posisjon fra begge pool.
AmpliconCoverage_M1.tsv	Inneholder informasjon om dekning per PCR-produkt per prøve for hvert oppgitte manifest. M# angir manifesttallet.

Filformat for demultipleksing

Demultipleksingprosessen leser indekssekvensen for hver klynge for å bestemme hvilken prøve klyngen oppsto fra. Kartleggingen mellom klynger og prøvenummer skrives til en demultipleksingsfil (*.demux) for hver plate av strømningscellen.

Filnavnet for demultipleksingfiler er s_1_X.demux, hvor X er platenummeret.

Demultipleksingfiler starter med en overskrift:

- ▶ Versjon (4 byte heltall), for tiden 1
- ▶ Klyngetall (4 byte heltall)

Resten av filen består av prøvetall for hver klynge fra platen.

Når demultipleksingstrinnet er fullført, genererer programvaren en demultipleksingfil som heter DemultiplexSummaryF1L1.txt.

- ▶ I filnavnet representerer **F1** strømningscellenummeret.
- ▶ I filnavnet representerer **L1** banenummeret.
- ▶ Demultipleksingsresultater i en tabell med én rad per plate og én kolonne per prøve, inkludert prøve 0.
- ▶ De vanligste sekvensene i indeksavlesninger.

FASTQ-filformat

FASTQ er et tekstbasert filformat som inneholder basebetegnelser og kvalitetsverdier per avlesning.

Hver oppføring inneholder 4 linjer:

- ▶ Identifikatoren
- ▶ Sekvensen
- ▶ Et plusstegn (+)
- ▶ Phred-kvalitetsresultatene i et ASCII + 33-kodet format

Identifikatoren er formatert som:

@Instrument:Kjørings-ID:Strømningscelle-ID:Bane:Plate:X:Y Avlesningsnr.:FilterFlagg:0:Prøvenummer

Eksempel:

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

BAM-filformat

En BAM-fil (*.bam) er en komprimert binær versjon av en SAM-fil som brukes til å angi innrettede sekvenser opptil 128 Mb. SAM- og BAM-formater beskrives i detalj på samtools.github.io/hts-specs/SAMv1.pdf.

BAM-filer bruker filnavngivningsformatet SampleName_S#.bam, der # er prøvenummeret som bestemt av rekkefølgen av prøvene som er oppført for kjøringen.

BAM-filer inneholder et overskriftsavsnitt og et innrettingsavsnitt:

- ▶ **Header** (Overskrift) – Inneholder informasjon om hele filen, som prøvenavn, prøvelengde og innrettingsmetode. Innrettinger i innrettingsavsnittet er forbundet med spesifikk informasjon i overskriftsavsnittet.
- ▶ **Alignments** (Innrettinger) – Inneholder avlesningsnavn, avlesningssekvens, avlesningskvalitet, innrettingsinformasjon og tilpassede faner. Avlesningsnavnet inkluderer kromosomet, startkoordinat, innrettingskvalitet og samsvarsindikatorstreng.

Innrettingsavsnittet inneholder følgende informasjon for hver avlesing eller hvert avlesningspar:

- ▶ **AS:** Paired-end innrettingskvalitet
- ▶ **BC:** Strekkode-fane, som indikerer den demultipleksede prøve-ID-en som er knyttet til avlesningen.
- ▶ **SM:** Single-end innrettingskvalitet.
- ▶ **XC:** Samsvarsindikatorstreng
- ▶ **XN:** Navnefane for PCR-produkt, som registrerer PCR-produkt-ID-en som er knyttet til avlesningen

BAM-indeksfiler (*.bam.bai) gir en indeks av den tilsvarende BAM-filen.

VCF-filformat

Variant Call Format (VCF) er et vanlig filformat utviklet av det genomikkvitenskapelige samfunnet. Det inneholder informasjon om varianter funnet i spesifikke posisjoner i et referansegenom. VCF-filer slutter med .vcf-suffikset

VCF-filoverskriften inneholder VCF-filformatversjonen og variantbetegnerversjonen og angir kommentarene som brukes i resten av filen. VCF-overskriften inneholder også referansegenomfilen og BAM-filen. Den siste linjen i overskriften inneholder kolonneoverskriftene for datalinjene. Hver av VCF-fildatalinjene inneholder informasjon om én variant.

VCF-filoverskrifter

Overskrift	Beskrivelse
KROM	Kromosomet på referansegenomet. Kromosomer vises i samme rekkefølge som referanse-FASTQ-filen.
POS	Enkeltbaseposisjonen til varianten i referansegenomet. I SNP-er er denne posisjonen referansebasen med varianten, i indeler eller slettinger er denne posisjonen referansebasen umiddelbart før varianten.
ID	rs-nummeret for varianten, hentet fra dbSNP.txt, hvis dette er aktuelt. Hvis det finnes flere rs-numre på denne plasseringen, blir listen avgrenset med semikolon. Hvis det ikke eksisterer noen dbSNP-oppføring i denne posisjonen, brukes en markør for manglende verdi ('.').
REF	Referansegenotypen. Eksempel: en sletting av en enkel T angis som referanse-TT og alternativ T. En enkel A til T-nukleotidvariant er representert som referanse-A og alternativ T.
ALT	Allelene som er forskjellige fra referanseavlesingen. Eksempel: en innsetting av en enkel T angis som referanse-A og alternativ AT. En enkel A til T-nukleotidvariant er representert som referanse-A og alternativ T.
QUAL	En Phred-skalert kvalitetsscore tildelt av variantbetegneren. Høyere score angir høyere konfidens i varianten og lavere sannsynlighet for feil. I en kvalitetsscore på Q er den anslåtte sannsynligheten for en feil $10^{-(Q/10)}$. Eksempel: settet med Q30-betegnelser har en feilrate på 0,1 %. Mange variantbetegnere tildeler kvalitetsscorer basert på de tilhørende statistikkmodellene, som er høye i forhold til den observerte feilraten.

VCF-filkommentarer

Overskrift	Beskrivelse
FILTER	<p>Hvis alle filtrene godkjennes, blir PASS skrevet i filterkolonnen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • LowDP – Gjelder steder der dekningsdybden er under 450x i en av poolene. For PCR-produktposisjoner som dekkes av avlesning både forover og reversert, svarer dette til 900x enkeltlesningsdekning. • LowGQ – Genotypingkvaliteten (GQ) er under en cut-off. • q30 – Kvalitetsscore < 30. • LowVariantFreq – Variantfrekvensen er lavere enn den angitte terskelen. • PB – Probepool-avvik. Variant ikke funnet, eller funnet med lav frekvens i en eller to probepooler. • R3x6 – Antall tilstøtende repetisjoner (med lengde 1 til 3 bp) til variantbetegnelse ≥ 6. • SB – Strengavviket er mer enn gitt grenseverdi.
INFO	<p>Mulige oppføringer i INFO-kolonnen omfatter:</p> <ul style="list-style-type: none"> • AC – Alleltelling i genotyper for hver ALT-allel, i samme rekkefølge som oppført. • AF – Allelfrekvens for hver ALT-allel, i samme rekkefølge som oppført. • AN – Det totale antallet alleler i betegnede genotyper. • CD – Et flagg som indikerer at SNP opptrer innenfor kodingsområdet med minst 1 RefGene-oppføring. • DP – Dybden (antall basebetegnelser som er innrettet til en posisjon og brukt i variantbetegnelse). • Exon – En kommaseparert liste over eksonregioner avlest fra RefGene. • FC – Funksjonell konsekvens. • GI – En kommaseparert liste over gen-ID-er avlest fra RefGene. • QD – Variantkonfidens / kvalitet etter dybde. • TI – En kommaseparert liste over transkripsjons-ID-er avlest fra RefGene.
FORMAT	<p>Formatkolonnen viser felt adskilt med kolon. For eksempel GT:GQ. Listen over viste felter avhenger av variantbetegnelsen som ble brukt. Følgende felt er tilgjengelige:</p> <ul style="list-style-type: none"> • AD – Oppføring i skjemaet X, Y, der X er antallet referansebetegnelser, og Y er antallet alternative betegnelser. • DP – Omtrentlig avlesingsdybde, avlesinger med MQ=255 eller med feil tilordninger blir filtrert. • GQ – Genotypekvalitet. • GQX – Genotypekvalitet. GQX er minimum av GQ-verdien og QUAL-kolonnen. Generelt sett er disse verdiene like. Bruk av minimum gjør GQX det mest forsiktige målet på genotypekvalitet. • GT – Genotype. 0 tilsvarer referansebasen, 1 tilsvarer den første oppføringen i ALT-kolonnen, osv. Skråstrek (/) angir at ingen fasingsinformasjon er tilgjengelig. • NC – Fraksjon av baser som var ubetegnet eller med basebetegnelleskvalitet under minimumsgrensen. • NL – Støynivå; et estimat av basebetegnellesstøy i denne posisjonen. • PB – Probepool-avvik. Verdier nærmere 0 indikerer større avvik mot én probepool, og mindre konfidens i en variantbetegnelse. • SB – Strengavvik på denne posisjonen. Større negative verdier indikerer mindre avvik; verdier nær 0 angir mer avvik. • VF – Variantfrekvens, prosentandelen av avlesingene som støtter den alternative allelen.
PRØVE	I prøvekolonnen oppgis verdiene som angis i FORMAT-kolonnen.

Genome VCF-filer

Genome VCF (gVCF)-filer er VCF v4.1-filer som følger et sett med konvensjoner for å representere alle områder i genomet i et rimelig kompakt format. gVCF-filene (*.genome.vcf.gz) inneholder alle områdene i interesseregionen i en enkelt fil for hver prøve.

gVCF-filen viser ikke-påvisninger på posisjoner som ikke passerer alle filtre. En genotype (GT)-fane med ./ indikerer en ikke-påvisning.

Se sites.google.com/site/gvcftools/home/about-gvcf for mer informasjon.

VCF-filer per pool og konsensus

Somatisk variant-arbeidsflyten genererer to sett med variant betegnelsesfiler.

- ▶ **VCF-filer per pool** – Inneholder varianter betegnet i enten forover pool eller reversert pool. Filer per pool skrives til mappen VariantCallingLogs (Variantbetegnelseslogger).
- ▶ **Konsensus VCF-filer** – Inneholder varianter betegnet fra begge pooler. Konsensus-filer skrives til mappen Alignment (Innretting).

VCF-filer (VCF) per pool og konsensus omfatter både VCF (*.vcf) og gVCF (*.genome.vcf)-filer, og bruker følgende navngivningskonvensjon, hvor S# representerer rekkefølgen som prøven er oppført i for kjøringen:

- ▶ **Rapporterer for alle steder** – SampleName_S#.genome.vcf
- ▶ **Rapporterer kun varianter** –SampleName_S#.vcf

Programvaren sammenligner VCF-filene per pool og kombinerer dataene i hver posisjon for å lage en konsensus-VCF-fil for prøven.

Variantbetegnelser fra hver pool slås sammen til konsensus-VCF-filer ved hjelp av følgende kriterier.

Kriterier	Resultat
En referansebetegnelse i hver pool	Referansebetegnelse
En referansebetegnelse i en pool og en variantbetegnelse i den andre poolen	Filtrert variantbetegnelse
Matcher variantbetegnelser med lignende frekvenser i hver pool	Variantbetegnelse
Matcher variantbetegnelser med betydelig forskjellige frekvenser i hver pool	Filtrert variantbetegnelse
Umatchedde variantbetegnelser i hver pool	Filtrert variantbetegnelse

Metrikk fra hver pool slås sammen med følgende verdier.

Metrikk	Verdi
Dybde	Tilsetning av dybder fra begge pooler
Varianthypighet	Totalt variantantall dividert med total dekningsdybde
Q-score	Minste verdi av begge pool

Fil for PCR-produktdekning

Én fil for PCR-produktdekning genereres for hver manifestfil. M-nummeret i filnavnet angir manifestnummeret som er oppført i prøvetabellen for kjøringen.

Hver fil omfatter en overskriftsrad som inneholder prøve-ID-ene forbundet med manifestet. Under overskriftsraden er det tre kolonner som viser følgende informasjon:

- ▶ Mål-ID-en slik den er oppført i manifestet.
- ▶ Dekningsdybden av avlesninger som passerer filteret.
- ▶ Den totale dekningsdybden.

Tilleggsutdatafiler

Følgende utdatafiler gir tilleggsinformasjon, eller oppsummerer kjøringresultater og analysefeil. Selv om disse filene ikke er påkrevd for å vurdere analyseresultater, kan de brukes for feilsøkningsformål. Alle filene ligger i mappen Alignment (Innretting) med mindre annet er angitt.

Filnavn	Beskrivelse
AnalysisLog.txt	Behandlingslogg som beskriver hvert trinn som oppstod under analysen av gjeldende kjøringsskype. Denne filen inneholder ingen feilmeldinger. Ligger i mappen Alignment (Innretting).
AnalysisError.txt	Behandlingsloggen som har opplistet eventuelle feil som har oppstått under analyse. Denne filen vil være tom hvis det ikke oppsto noen feil. Ligger i mappen Alignment (Innretting).
DemultiplexSummaryF1L1#.txt	Rapporterer demultiplexingsresultater i en tabell med 1 rad per plate og 1 kolonne per prøve. # representerer bane 1, 2, 3 eller 4 av strømningssellen. Ligger i mappen Alignment (Innretting).
AmpliconRunStatistics.xml	Inneholder oppsummeringsstatistikk som er spesifikk for kjøringen. Ligger i mappen Alignment (Innretting).

Analysemappe

Analysemappen inneholder filene som genereres av Local Run Manager-programvaren.

Forholdet mellom utgangsmappen og analysemappen er oppsummert som følger:

- ▶ Under sekvensering fyller Real-Time Analysis (RTA) utgangsmappen med filer som genereres under bildeanalyse, basebetegnelse og kvalitetsscoring.
- ▶ RTA kopierer filer til analysemappen i sanntid. Etter at RTA har tilordnet en kvalitetsscore til hver base for hver syklus, skriver programvaren filen RTAComplete.txt til begge mappene.
- ▶ Når filen RTAComplete.txt er til stede, begynner analysen.
- ▶ Mens analysen fortsetter, skriver Local Run Manager utdatafiler til analysemappen og kopierer deretter filene til utgangsmappen.

Innrettingsmapper

Hver gang denne analysen settes tilbake i kø, oppretter Local Run Manager en innrettingsmappe som heter **Alignment_N** (Innretting_N), hvor N er et sekvensielt tall.

Mappestruktur

📁 **Alignment** – Inneholder *.bam-, *.vcf-, FASTQ-filer, og filer som er spesifikke for analysemodulen.

📁 **Dato og klokkeslettstempel** – Date_time-stempel av analyse som ÅÅÅÅMMDD_TTMMSS

📄 AnalysisError.txt

📄 AnalysisLog.txt

📄 AmpliconRunStatistics.xml

📄 Sample1.genome.vcf.gz

📄 Sample1.coverage.csv

📄 Sample1.report.pdf

📄 Sample1.summary.csv

📄 Sample1.vcf.gz

📄 Sample1.bam

📁 **FASTQ**

📁 **Sample1**

📁 **Stats**

📄 DemuxSummaryF1L1.txt

📄 FastqSummaryF1L1.txt

📁 **Data**

📁 **Intensities**

📁 **BaseCalls**

📁 **L001** – Inneholder en undermappe per syklus, som hver inneholder *.bcl-filer.

📁 **L001** – Inneholder *.locs-filer, 1 for hver plate.

📁 **RTA Logs** – Inneholder loggfiler fra RTA-programvareanalyse.

📁 **InterOp** – Inneholder binære filer som brukes til å rapportere sekvenseringskjøringsmetrikk.

📁 **Logs** – Inneholder loggfiler som beskriver trinnene som utføres under sekvensering.

📄 RTAComplete.txt

📄 RunInfo.xml

📄 runParameters.xml

Teknisk hjelp

Kontakt Illuminas tekniske støtteavdeling for teknisk hjelp.

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

Telefonnumre til Illuminas kundestøtte

Region	Gratis	Regionalt
Nord-Amerika	+1.800.809.4566	
Australia	+1.800.775.688	
Belgia	+32 80077160	+32 34002973
Danmark	+45 80820183	+45 89871156
Finland	+358 800918363	+358 974790110
Frankrike	+33 805102193	+33 170770446
Hongkong	800960230	
Irland	+353 1800936608	+353 016950506
Italia	+39 800985513	+39 236003759
Japan	0800.111.5011	
Kina	400.635.9898	
Nederland	+31 8000222493	+31 207132960
New Zealand	0800.451.650	
Norge	+47 800 16836	+47 21939693
Singapore	+1.800.579.2745	
Spania	+34 911899417	+34 800300143
Storbritannia	+44 8000126019	+44 2073057197
Sveits	+41 565800000	+41 800200442
Sverige	+46 850619671	+46 200883979
Taiwan	00806651752	
Tyskland	+49 8001014940	+49 8938035677
Østerrike	+43 800006249	+43 19286540
Andre land	+44.1799.534000	

Sikkerhetsdatablad – Tilgjengelige på Illuminas nettsted på support.illumina.com/sds.html.

Produktdokumentasjon – Tilgjengelig for nedlasting i PDF-format fra Illuminas nettsted. Gå til support.illumina.com, velg et produkt, og velg deretter **Documentation & Literature** (Dokumentasjon og litteratur).



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California, 92122 USA
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (utenfor Nord-Amerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

© 2021 Illumina, Inc. Med enerett.



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

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

illumina[®]