

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 innholdet 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).

© 2016 Illumina, Inc. Med enerett.

Illumina, MiSeq, MiSeqDx, den gresskaroransje fargen og streamingbase-designen er 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.

Revisjonslogg

| Dokumentnr. | Dato | Beskrivelse av endring |
|-------------------------------|------------------|---|
| Dokumentnr. 15038356 v02 | November 2017 | Oppdaterte regulatoriske merkinger |
| Dokumentnr. 15038356 v01 | Desember 2016 | Korrigert informasjon i måltabellen for universalsett 1.0 ved å endre innsettinger til slettinger i raden Deletions (Slettinger). Fjernet Chrome fra listen over støttede nettlesere til bruk med MiSeq Reporter på en maskin utenfor instrumentet. Korrigert formateringsfeil. |
| Delenummer 15038356 Rev. A | Mars 2014 | Første versjon |

Innholdsfortegnelse

| | |
|---|-----------|
| Revisjonslogg | iii |
| Innholdsfortegnelse | iv |
| Kapittel 1 Oversikt | 1 |
| Innledning | 2 |
| Vise MiSeq Reporter | 3 |
| Begreper i MiSeq Reporter | 4 |
| MiSeq Reporter-grensesnittet | 5 |
| Sette analyse tilbake i kø | 12 |
| Analysemetrikk | 13 |
| Analyseprosedyrer | 14 |
| MiSeqAnalysis-mappen | 15 |
| Kapittel 2 Datavisualisering | 17 |
| Innledning | 18 |
| Krav til inndatafiler | 19 |
| Tilpasset amplitikonarbeidsflyt | 20 |
| Analyseutgangsfiler for CF-analyser | 31 |
| Kapittel 3 Installasjon og feilsøking | 33 |
| MiSeq Reporter-krav utenfor instrumentet | 34 |
| Installere MiSeq Reporter utenfor instrumentet | 35 |
| Bruke MiSeq Reporter utenfor instrumentet | 37 |
| Feilsøke MiSeq Reporter | 38 |
| Vedlegg A Universalsett 1.0 Analyseutdatafiler | 41 |
| Analyseutgangsfiltyper | 42 |
| BAM-filformat | 43 |
| VCF-filformat | 44 |
| Fil for PCR-produktdekning | 47 |
| Tilleggsutgangsfiler | 48 |
| Indeks | 49 |
| Teknisk hjelp | 51 |

[Denne siden er blank med hensikt]

Oversikt

| | |
|------------------------------------|----|
| Innledning | 2 |
| Vise MiSeq Reporter | 3 |
| Begreper i MiSeq Reporter | 4 |
| MiSeq Reporter-grensesnittet | 5 |
| Sette analyse tilbake i kø | 12 |
| Analysemetrikk | 13 |
| Analyseprosedyrer | 14 |
| MiSeqAnalysis-mappen | 15 |



Innledning

MiSeqDx™-instrumentet inneholder tre programvareprogrammer som fungerer i sekvens for å gi bilder av klynger på strømningscellen, utføre bildeanalyse og basebetegnelser og utføre sekundæranalyse på instrumentet.

- ▶ I løpet av kjøringen fanger MiSeq Operating Software (MOS) opp bilder av klynger på strømningscellen for bildeanalyse, i tillegg til at den styrer strømningscellestadiet, gir kommandoer om dispensering av reagenser og endrer temperaturer i strømningscellen.
- ▶ Den integrerte programvaren for primæranalyse, sanntidsanalyse (RTA), utfører bildeanalyse og basebetegnelse, i tillegg til at den tildeler en kvalitetscore for hver base for hver sekvenseringscyklus. Når primæranalysen av RTA er fullført, starter MiSeq Reporter med sekundæranalysen.
- ▶ MiSeq Reporter utfører sekundæranalysen på instrumentet av basebetegnelser og kvalitetscore, generert av RTA under sekvenseringskjøringen. MiSeq Reporter kjører som en Windows-service og vises gjennom en nettleser. Som et alternativ kan den installeres på en datamaskin utenfor instrumentet. Du finner mer informasjon under *Installere MiSeq Reporter utenfor instrumentet* på side 35.

Om Windows-tjenesteapplikasjoner

Windows-tjenesteapplikasjoner utfører spesifikke funksjoner uten brukermedvirkning og fortsetter å kjøre i bakgrunnen så lenge Windows kjører. Fordi MiSeq Reporter kjører som en Windows-tjeneste, starter den sekundære analysen automatisk når primæranalysen er fullført.

Sekvensering under analyse

MiSeqDx-instrumentets databehandlingsressurser skal brukes til enten sekvensering eller analysering. Hvis en ny sekvenseringskjøring startes på MiSeqDx før sekundæranalysen for en tidligere kjøring er ferdig, vises en bekreftelsesdialogboks. Når sekvenskjøringen er bekreftet, stopper sekundæranalysen.

Bruk funksjonen **Requeue** (Sett i kø på nytt) på MiSeq Reporter-grensesnittet etter at den nye sekvenseringskjøringen er fullført. På dette tidspunktet starter sekundæranalysen fra begynnelsen.

Vise MiSeq Reporter

MiSeq Reporter-grensesnittet kan kun vises via en nettleser. MiSeq Reporter-grensesnittet vises ved å åpne en nettleser på en datamaskin med tilgang til det samme nettverket som MiSeqDx-instrumentet. Koble til HTTP-tjenesten på port **8042** ved hjelp av én av følgende metoder:

- ▶ Du kobler deg opp ved å bruke instrumentets IP-adresse etterfulgt av 8042.

| IP-adresse | HTTP-tjenesteport | HTTP-adresse |
|---------------------------|-------------------|------------------|
| 10.10.10.10, for eksempel | 8042 | 10.10.10.10:8042 |

- ▶ Koble til ved hjelp av nettverksnavnet for MiSeqDx etterfulgt av 8042

| Nettverksnavn | HTTP-tjenesteport | HTTP-adresse |
|------------------|-------------------|----------------|
| F.eks. MiSeqDx01 | 8042 | MiSeqDx01:8042 |

Når det gjelder installasjoner av MiSeq Reporter som er installert utenfor instrumentet, må disse tilkobles ved hjelp av metoden for lokalt installerte tjenesteprogrammer, **lokalvert** etterfulgt av 8042.

| Utenfor instrumentet | HTTP-tjenesteport | HTTP-adresse |
|----------------------|-------------------|----------------|
| localhost | 8042 | localhost:8042 |

Du finner mer informasjon under *Installere MiSeq Reporter utenfor instrumentet* på side 35.


Begreper i MiSeq Reporter

Følgende begreper og vilkår er vanlige i MiSeq Reporter.

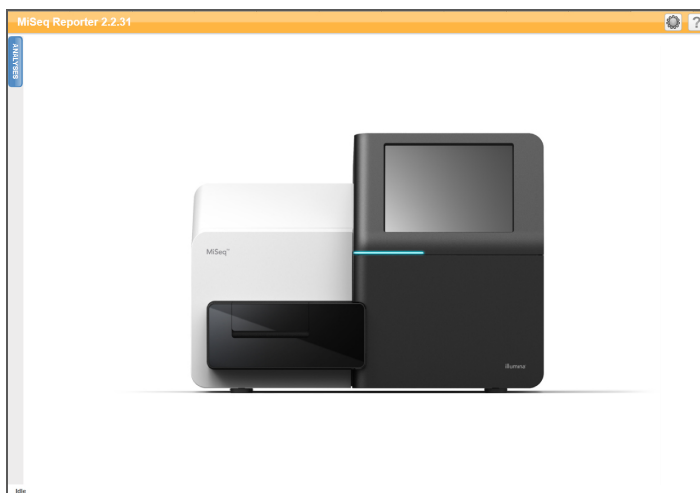
| Begrep | Beskrivelse |
|---------------|--|
| Manifest | <p>Filen som angir et referansegenom og målrettede referanseregioner som skal brukes i innrettingstrinnet.</p> <p>Manifestfilen som brukes av cystisk fibrose-analysene, er forhåndsinstallert på MiSeqDx.</p> |
| Depot | <p>En mappe som inneholder dataene som genereres under sekvenseringskjøringer. Hver kjøringsmappe er en undermappe i depotet.</p> |
| Kjøringsmappe | <p>Mappestrukturen som fylles av RTA-primæranalyseprogramvaren (MiSeqOutput-mappe) eller mappen som fylles av MiSeq Reporter (MiSeqAnalysis).</p> |
| Prøveark | <p>En fil (*.csv) med kommaseparerte verdier som inneholder informasjon som kreves for å sette opp og analysere en sekvenseringskjøring, inkludert en liste over prøver og deres indekssekvenser. Dette opprettes utenfor instrumentet ved hjelp av Illumina Worklist Manager.</p> <p>Prøvearket må være klart under trinnene for kjøringsoppsett på MiSeqDx. Etter at kjøringen har begynt, får prøvearket automatisk det nye navnet SampleSheet.csv og kopieres til kjøringsmappene: MiSeqOutput og MiSeqAnalysis.</p> |
| Arbeidsflyt | <p>En sekundær analyseprosedyre utført av MiSeq Reporter.</p> <p>Arbeidsflyten for hver kjøring er spesifisert i prøvearkinformatjonen.</p> |

MiSeq Reporter-grensesnittet

Når MiSeq Reporter åpnes i nettleseren, vises hovedskjermen med et bilde av instrumentet i midten. Innstillingsikonet og hjelpeikoner er i øverste høyre hjørne og analysefanen er i øverste venstre hjørne.

- ▶ **MiSeq Reporter Help** (MiSeq Reporter-hjelp) – Velg hjelpeikonet for å åpne MiSeq Reporter-dokumentasjonen i nettleservinduet.
- ▶ **Innstillinger** – Velg ikonet Settings (Innstillinger)  for å endre server-URL og depotbanen.
- ▶ Fanen **Analyses** (Analyser) – Velg Analyses (Analyser) for å utvide fanen. Analysefanen viser en liste over analysekjøringer som enten er ferdig, satt i kø for analyse eller under behandling.

Figur 1 Hovedskjermen for MiSeq Reporter

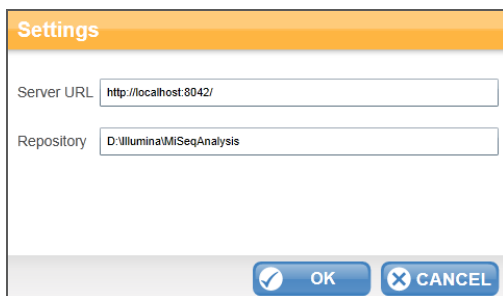


Server-URL eller depotinnstillinger

Bruk funksjonen Settings  (Innstillinger) til å endre server-URL og depotbane:

- ▶ **Server-URL** – Serveren der MiSeq Reporter kjører.
- ▶ **Repository path (Depotbane)** – Plasseringen til analysemappen der utgangsfilene skrives

Figur 2 Innstillinger for server-URL og depot



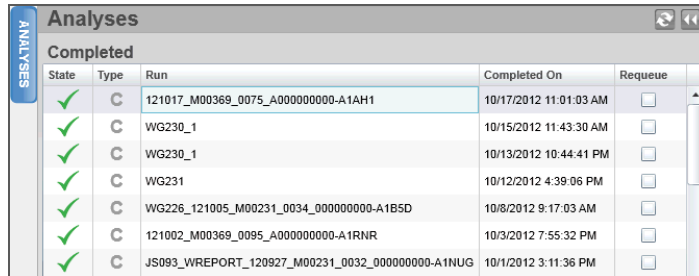
Vanligvis er det ikke nødvendig å endre disse innstillingene med mindre MiSeq Reporter kjører utenfor instrumentet. I dette tilfellet innstilles depotbanen på nettverksplassetten for MiSeqOutput-mappen. Du finner mer informasjon under *Bruke MiSeq Reporter utenfor instrumentet* på side 37.

Fanen Analyses (Analyser)

Fanen Analyses (Analyser) lister opp alle sekvenseringskjøringene som finnes i det angitte depotet. Fra denne fanen kan resultatene fra noen av kjøringene som er oppført, åpnes, eller en valgt kjøring kan settes tilbake i kø for analyse.

Velg ikonet **Refresh Analysis List** (Oppdater analyselisten)  øverst til høyre for å oppdatere listen når som helst.

Figur 3 Analyser Utvidet analysefane






| Analyses | | | | |
|-----------|------|--|------------------------|--------------------------|
| Completed | | | | |
| State | Type | Run | Completed On | Requeue |
| ✓ | C | 121017_M00369_0075_A000000000-A1AH1 | 10/17/2012 11:01:03 AM | <input type="checkbox"/> |
| ✓ | C | WG230_1 | 10/15/2012 11:43:30 AM | <input type="checkbox"/> |
| ✓ | C | WG230_1 | 10/13/2012 10:44:41 PM | <input type="checkbox"/> |
| ✓ | C | WG231 | 10/12/2012 4:39:06 PM | <input type="checkbox"/> |
| ✓ | C | WG226_121005_M00231_0034_000000000-A1B5D | 10/8/2012 9:17:03 AM | <input type="checkbox"/> |
| ✓ | C | 121002_M00369_0095_A000000000-A1RNR | 10/3/2012 7:55:32 PM | <input type="checkbox"/> |
| ✓ | C | JS093_WREPORT_120927_M00231_0032_000000000-A1NUG | 10/1/2012 3:11:36 PM | <input type="checkbox"/> |

Kolonnene i analysefanen er State (Status), Type, Run (Kjøring), Completed On (Fullført den) og Requeue (Sette tilbake i kø):

- ▶ **State** (Status) – Viser gjeldende status for analysen med ett av tre statusikoner

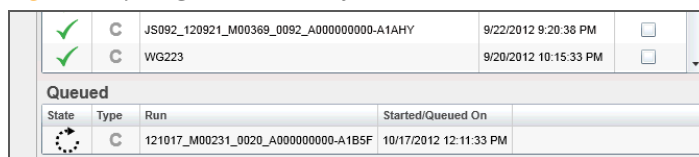
Tabell 1 Analysestatusikoner


| Ikon | Beskrivelse |
|---|---|
|  | Angir at sekundæranalysen er fullført. |
|  | Angir at sekundæranalysen pågår. |
|  | Angir at feil oppstod og sekundæranalysen ikke ble fullført på en vellykket måte. |

- ▶ **Type** – Oppgir analysearbeidsflyten forbundet med hver kjøring ved hjelp av en indikator på én bokstav. For CF-analysene og universaltsett 1.0 er bokstavindikatoren C.
- ▶ **Run** (Kjøring) – Navnet på kjøringsskjemmet i MiSeqOutput- og MiSeqAnalysis-mappene.
- ▶ **Completed On** (Fullført den) – Datoen da sekundæranalysen ble fullført.
- ▶ **Requeue** (Sette tilbake i kø) – Velg avmerkingsboksen for å sette en spesifikk analysejobb tilbake i kø. Knappen Requeue (Sette tilbake i kø) vises. Du finner mer informasjon under *Sette analyse tilbake i kø* på side 12.

Når analysen er satt i kø, vises kjøringen nederst på analysefanen og angis som pågående med ikonet .

Figur 4 Kjøring satt i kø i analysefanen

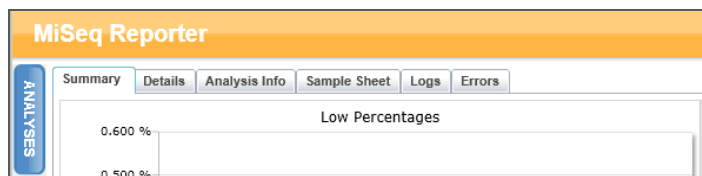


| ✓ | C | JS092_120921_M00369_0092_A000000000-A1AHY | 9/22/2012 9:20:38 PM | <input type="checkbox"/> |
|---|------|---|------------------------|--------------------------|
| ✓ | C | WG223 | 9/20/2012 10:15:33 PM | <input type="checkbox"/> |
| Queued | | | | |
| State | Type | Run | Started/Queued On | |
|  | C | 121017_M00231_0020_A000000000-A1B5F | 10/17/2012 12:11:33 PM | |

Analyseinformasjons- og resultatfaner

Etter at du har valgt en kjøring fra fanen Analyses (Analyser), vises informasjon og resultater for den aktuelle kjøringen i en serie faner i MiSeq Reporter-grensesnittet: Sammendrag (Oppsummering), Details (Detaljer), Analysis Info (Analyseinfo), Sample Sheet (Prøveark), Logs (Logger) og Errors (Feil). Informasjonen på fanene Analysis Info og Sample Sheet vises først. Alle fanene blir fylt når analysen er ferdig.

Figur 5 Informasjons- og resultatfaner

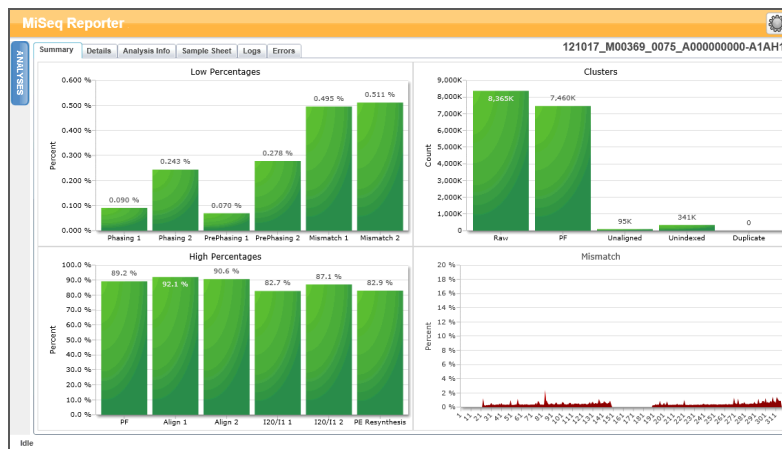


Fanen Summary (Oppsummering)

Fanen Summary (Oppsummering) inneholder en oppsummering av analyseresultater. Fire grafer vises på fanen Summary (Oppsummering):

- ▶ **Low Percentages Graph** (Lav prosent-graf) – Viser fasing, prefasing og misforhold i prosentverdiene. Lav prosent angir god kjøringstatistikk. Du finner mer informasjon under *Fasing og prefasing* på side 13.
- ▶ **High Percentages Graph** (Høy prosent-graf) – Viser klyngepasseringsfilter, innretting til en referanse og intensiteter i prosenter. Høy prosent angir god kjøringstatistikk.
- ▶ **Clusters Graph** (Klyngegraf) – Viser antallet rå klynger, klyngepasseringsfilter, klynger som ikke innrettes, klynger som ikke er forbundet med en indeks, og duplikater.
- ▶ **Mismatch Graph** (Misforhold-graf) – Viser misforhold per syklus. Et misforhold viser til ethvert misforhold mellom sekvenseringsavlesingen og et referansegenom eller innretting.

Figur 6 Oppsummeringsfanen



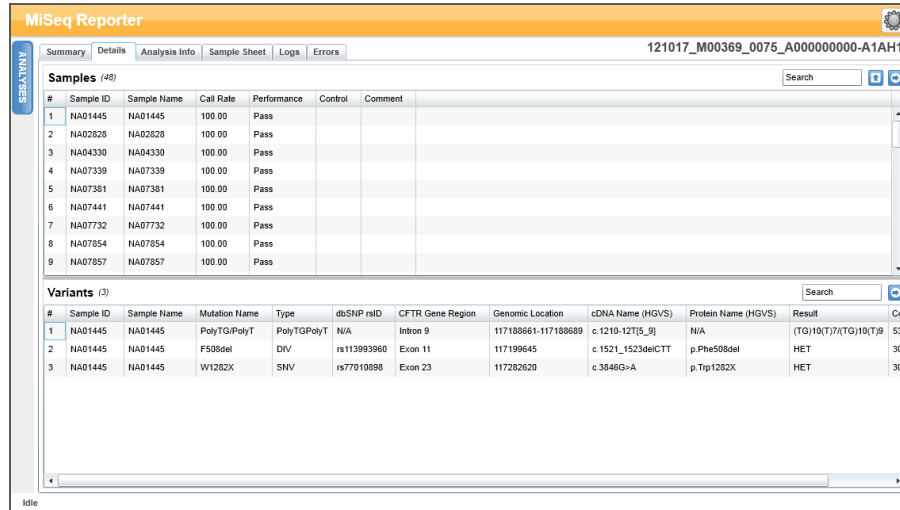
Detaljfanen

Detaljfanen inneholder detaljer fra analyseresultater. Følgende tabeller og grafer kan vises på fanen Details (Detaljer), avhengig av analysen eller settet som brukes:

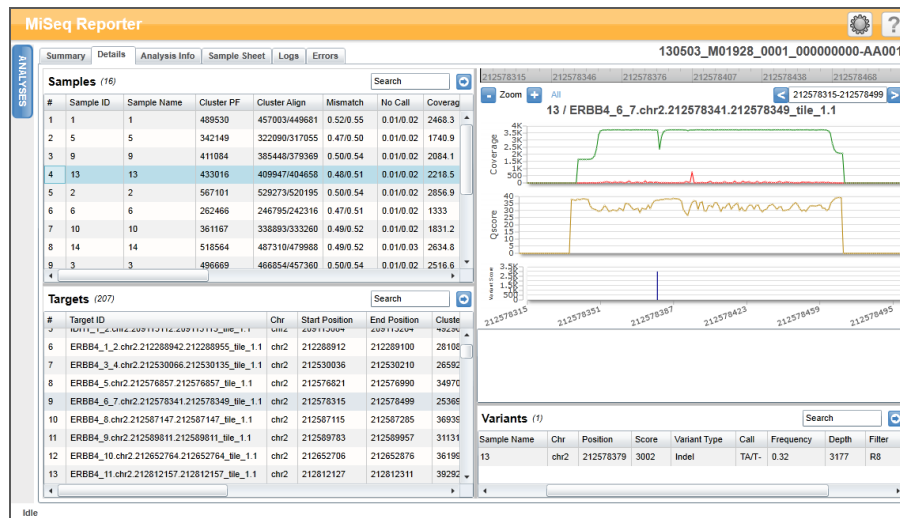
- ▶ **Samples Table** (Prøvetabell) – Oppsummerer sekvenseringsresultatene for hver prøve.
- ▶ **Targets Table** (Måltabell) – Viser statistikk for målrettede regioner i en valgt prøve. (Kun universalsett 1.0)

- ▶ **Variants Table** (Varianttabelle) – Viser forskjellene mellom prøve-DNA og referansen.
- ▶ **Coverage Graph** (Dekningsgraf) – Viser hvor dypt prøven ble sekvensert ved å måle antallet baser til stede i prøvesekvensen for hver posisjon i referansen.
- ▶ **Qscore Graph** (Q-scoregraf) – Viser gjennomsnittlig kvalitetsscore, som er den anslåtte sannsynligheten for en basebetegnelsesfeil. Du finner mer informasjon under *Q-scoregraf* på side 29.
- ▶ **Variant Score Graph** (Variantscoregraf) – Viser plasseringen av SNV-er og indeler.

Figur 7 Fanen Details (Detaljer) for CF 139-variantanalyse, eksempel



Figur 8 Fanen Details (Detaljer) for universalsett 1.0, eksempel



Resultater i tabellene Samples (Prøver), Targets (Mål) eller Variants (Varianter) kan eksporteres individuelt til en tekstfil ved hjelp av ikonet **Export table data to text file** (Eksporter tabelldata til tekstfil). Denne eksporten endrer ikke analyserapporteringsfilen.

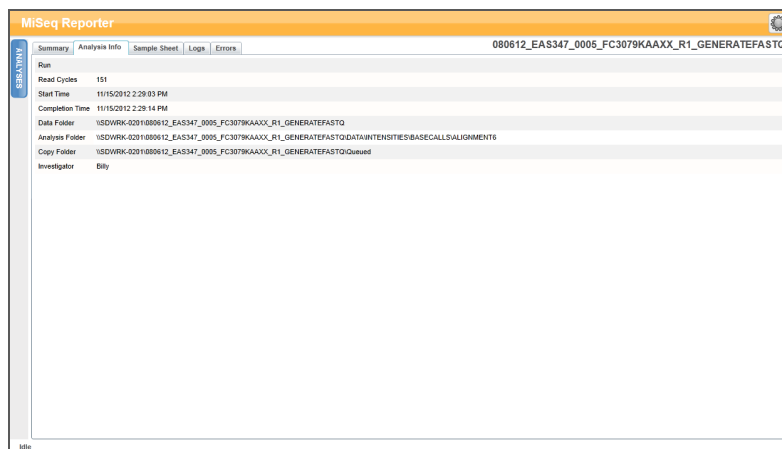


CF-analyseresultater kan eksporteres til CF-analyserapporteringsfilen med ikonet **Export data to CF report** (Eksporter data til CF-rapport). Du finner mer informasjon under *Analyseutgangsfiler for CF-analyser* på side 31.

Analyseinformasjonsfanen

Fanen Analysis Info (Analyseinformasjon) inneholder logistikkinformasjon om kjøring og analyse.

Figur 9 Analyseinformasjonsfanen



Tabell 2 Analyseinformasjonsfanen

| Rad | Beskrivelse |
|------------------|--|
| Avleste sykluser | En representasjon av antallet sykluser i hver avlesing, inkludert notasjon for eventuelle indeksavlesinger. En kjøring som for eksempel er oppgitt som 151, 8 (I), 8 (I), angir 151 at det er 151 sykluser for den første avlesingen, 8 sykluser for den første avleste indeksen, 8 sykluser for den andre avleste indeksen og deretter en endelig avlesing av 151 sykluser. |
| Starttid | Klokkeslettet da sekundæranalysen startet. |
| Sluttid | Klokkeslettet da sekundæranalysen var fullført. |
| Datamappe | Rotnivået i utgangsmappen produsert av RTA-primæranalyseprogramvare (MiSeqOutput), som inneholder alle primære og sekundære analyseutgangsdata for kjøringen. |
| Analysemappe | Den fulle banen til innrettingsmappen i MiSeqAnalysis-mappen (Data \ Intensities \ BaseCalls \ Alignment). |
| Kopier mappe | Den fulle banen til den køplasserte undermappen i MiSeqAnalysis-mappen. |

Prøvearkfanen

Fanen Sample Sheet (Prøveark) inneholder kjøringsparametre angitt i prøvearket, og gir verktøy for redigering av prøvearket og for å sette kjøringen tilbake i kø.

Figur 10 Fanen Sample Sheet (Prøveark), eksempel universalsett 1.0

| Sample_ID | Sample_Name | Sample_Well | Control | T_Index_ID | Index | IS_Index_ID | Index2 | Manifest | GenomeFolder |
|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|-------------|----------|----------|--|
| 4 | | B01 | | A701 | ATCACGAC | A502 | TCCTAAGT | A | Home_sapiens/UCSC/hg19/Sequence/WholeGenomeF |
| 5 | | B02 | | A702 | ACAATGGT | A502 | TCCTAAGT | A | Home_sapiens/UCSC/hg19/Sequence/WholeGenomeF |

Tabell 3 Innholdet i prøvearkfanen

| Rad | Beskrivelse |
|---------------|--|
| Dato | Datoen sekvenseringskjøringen ble utført. |
| Arbeidsflyt | Analysearbeidsflyt for kjøringen For CF -analyser og universalsett 1.0 er arbeidsflytnavnet Custom Amplicon (Tilpasset amplicon). |
| Applikasjon | Applikasjonsnavn Dette feltet brukes av Illumina Worklist Manager-programvaren og angir hvilken analyse eller sett som brukes for kjøringen. |
| Analyse | Navn på analyse eller sett. |
| Kjemi | Kjeminavnet identifiserer oppskriftsfragmenter som brukes til å bygge den kjøringsspesifikke oppskriften. For MiSeqDx-kjøring er kjeminavnet amplicon. |
| Manifester | Navnet på manifestfilen som angir et referansegenom og målrettede referanseregioner som skal brukes i innrettingstrinnet. |
| Avleser | Antallet sykluser som utføres i Read 1 og Read 2. Indeksavlesingene er ikke inkludert i dette avsnittet. |
| Innstillinger | Alternative kjøringssparametre |
| Data | Prøve-ID, prøvenavn, indekssekvenser og bane til genomappen. Kravene varierer med arbeidsflyten. |

Fanen Logs (Logger)

Logs (Logger) lister opp alle trinnene som utføres under analyse. Disse trinnene blir registrert i loggfilene i mappen Logs (Logger). En oppsummering blir skrevet til AnalysisLog.txt, som er en viktig fil for feilsøkingformål.

Fanen Errors (Feil)

Fanen Errors (Feil) har opplistet eventuelle feil som har oppstått under analyse. En oppsummering blir skrevet til AnalysisError.txt, som er en viktig fil for feilsøkingformål.

Redigere prøvearket i MiSeq Reporter

Prøvearkdata kan redigeres for en spesifikk kjøring fra fanen Sample Sheet (Prøveark) på MiSeq Reporters nettgrensesnitt. Du trenger mus og tastatur for å redigere prøvearket.



FORSIKTIG

Redigering av prøvearkinformasjonen skal gjøres med stor varsomhet og forsiktighet. Prøvesporing kan endres og kan føre til uriktig resultatrapportering.

- ▶ For å redigere en rad i prøvearket, klikk i feltet og gjør de nødvendige endringene.
- ▶ Klikk i raden og velg **Add Row** (Legg til rad) for å legge til en rad på prøvearket. Den nye raden vises under den valgte raden.

ADD ROW

- ▶ Klikk i raden og velg **Delete Row** (Slett rad) for å slette en rad på prøvearket.

DELETE ROW

- ▶ Når endringene i prøvearket er gjort, velger du **Save and Requeue** (Lagre og sett tilbake i køen). Dette lagrer endringene og starter sekundæranalysen med det redigerte prøvearket.

SAVE AND REQUEUE

- ▶ Hvis en endring i prøvearket var utilsiktet, klikk på en tilliggende fane før du lagrer endringene. Et varsel vises som sier at endringene ikke ble gjort. Klikk på **Discard** (Forkaste) for å omgjøre endringene.

DISCARD

Lagre grafer som bilder

MiSeq Reporter gjør det mulig å lagre et bilde av grafer som er generert for en kjøring. Høyreklikk over et sted på fanen Summary (Oppsummering) eller grafplasseringen på fanen Details (Detaljer), og venstreklikk på **Save Image As** (Lagre bilde som). Følg ledeteksten og gi filen navn og bla til en plassering for å lagre filen.

Alle bilder blir lagret i JPG-format. Grafer blir eksportert som en enkel grafikk for alle grafer vist i fanen. En mus er påkrevd for å kunne bruke dette alternativet.

Sette analyse tilbake i kø

Det er mulig sette analyser tilbake i kø i MiSeq Reporters nettgrensesnitt. Før du fortsetter må du kontrollere at en sekvenseringskjøring ikke er i gang.

Hver gang analysen settes tilbake i kø, blir en ny innrettingsmappe opprettet i MiSeqAnalysis-mappen med et sekvenseringsnummer knyttet til mappenavnet.

For eksempel Alignment, Alignment1, Alignment2.

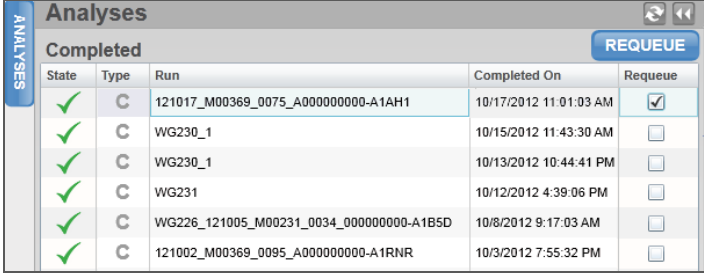
MiSeqAnalysis \<RunFolderName> \Data \Intensities \BaseCalls \Alignment2

- 1 Klikk på **Analyses** (Analyser) i MiSeq Reporters nettgrensesnitt.
- 2 Finn kjøringen på listen over tilgjengelige kjøring og klikk i avmerkingsboksen for Requeue (Stille tilbake i kø) ved siden av kjøringens navn.

Hvis kjøringen ikke er opplistet, endres det spesifiserte depotet til riktig plassering.

Du finner mer informasjon under *Server-URL* eller *depotinnstillinger* på side 5.

Figur 11 Sette analyse tilbake i kø



| Analyses | | | | |
|-----------|------|--|------------------------|-------------------------------------|
| Completed | | | | |
| State | Type | Run | Completed On | Requeue |
| ✓ | C | 121017_M00369_0075_A000000000-A1AH1 | 10/17/2012 11:01:03 AM | <input checked="" type="checkbox"/> |
| ✓ | C | WG230_1 | 10/15/2012 11:43:30 AM | <input type="checkbox"/> |
| ✓ | C | WG230_1 | 10/13/2012 10:44:41 PM | <input type="checkbox"/> |
| ✓ | C | WG231 | 10/12/2012 4:39:06 PM | <input type="checkbox"/> |
| ✓ | C | WG226_121005_M00231_0034_000000000-A1B5D | 10/8/2012 9:17:03 AM | <input type="checkbox"/> |
| ✓ | C | 121002_M00369_0095_A000000000-A1RNR | 10/3/2012 7:55:32 PM | <input type="checkbox"/> |

- 3 Klikk på **Requeue** (Sette tilbake i kø). Ikonet State (Status) til venstre for kjøringens navn endres og viser at analysen pågår 🔄.



MERK

Hvis analysen ikke starter, må du påse at følgende inndatafiler er til stede i analysekjøringens mappe: SampleSheet.csv, RTAComplete.txt og RunInfo.xml.

Analysemetrikk

Under sekvenseringskjøringen genererer sanntidsanalyse (RTA) datafiler som inkluderer analysemetrikk som brukes av MiSeq Reporter til sekundæranalyser. Metrikk som vises i sekundæranalyserapporter, er klynger som passerer filteret, kvalitetsscorer for basebetegnelse samt fasing- og prefasingverdier.

Klyngepasserende filter

Klyngepasserende filter er et mål på klyngekvaliteten. Dette filteret fjerner de minst pålitelige dataene ved å filtrere rå data for å fjerne eventuelle avlesinger som ikke oppfyller de generelle kravene for kvaliteten. Klyngepasseringsfilter angis som PF i analyserapporter.

Kvalitetsscorer

En kvalitetsscore, eller Q-score, er en prediksjon av sannsynligheten for en feil basebetegnelse. Under sekvenseringskjøringen blir kvaliteten på basebetegnelse scorert for hver syklus. Under analysen blir kvalitetsscore registrert i FASTQ-filer i et ASCII-kodet format.

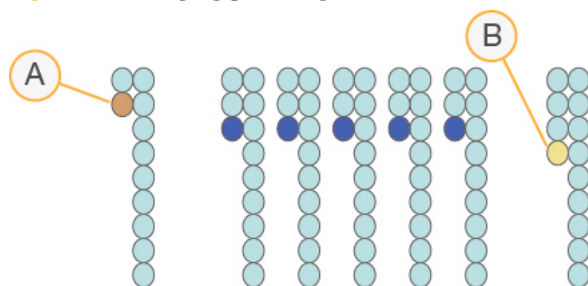
Følgende tabell viser forholdet mellom kvalitetsscore og sannsynlighet for feil.

| Kvalitetsscore | Sannsynlighet for feil |
|----------------|------------------------|
| Q40 | 0,0001 (1 av 10 000) |
| Q30 | 0,001 (1 av 1000) |
| Q20 | 0,01 (1 av 100) |
| Q10 | 0,1 (1 av 10) |

Fasing og prefasing

Under sekvenseringsreaksjonen utvides hver DNA-streng i en klynge med én base per syklus. En liten del av strengen kan komme ut av fase med gjeldende inkorporeringssyklus, enten falle bak en base (fasing) eller hoppe frem en base (prefasing). Fasings- og prefasingsfrekvensen indikerer et estimat av fraksjonen av molekyler som ble faset eller prefaset i hver syklus.

Figur 12 Fasing og prefasing



- A Avles med en base som er fasing
- B Avles med en base som er prefasing

Antallet sykluser som utføres i en avlesning, er 1 syklus mer enn antallet sykluser som analyseres. Eksempel: en paired-end 150-syklus kjøring utfører to 151-syklusavlesninger (2 x 151) med totalt 302 sykluser. På slutten av kjøringen blir 2 x 150 sykluser analysert. Den ene ekstra syklusen for Read 1 og Read 2 er påkrevd for prefasingsberegninger.

Analyseprosedyrer

MiSeq Reporter utfører sekundæranalyse med en rekke analyseprosedyrer, som inkluderer demultipleksing, FASTQ-filgenerering, innretting og variantbetegnelse.

Demultipleksing

Demultipleksing er det første trinnet i analysen hvis prøvearket har oppført flere prøver og kjøringen har indeksavlesinger.

Demultipleksing skiller data fra samlede prøver, basert på korte indekssekvenser som merker prøver fra ulike biblioteker. Hver indeksavlest sekvens sammenlignes med indekssekvensene som er spesifisert i prøvearket. Ingen kvalitetsverdier vurderes på dette trinnet.

FASTQ-filgenerering

Etter demultipleksing genereres mellomliggende filer i FASTQ-filformatet, som er et tekstformat som brukes til å representere sekvenser. FASTQ-filer er den primære inngangen for innrettingstrinnet. FASTQ-filer inneholder avlesingene for hver prøve og kvalitetscorene, uten avlesinger fra eventuelle klynger som ikke passerer filteret.

Innretting

Innretting sammenligner sekvenser mot referansen for å identifisere et forhold mellom sekvenser og tildeler en score basert på likhetsområder. Innrettede avlesinger skrives til filer i BAM-format.

Til data generert på MiSeq Reporter bruker MiSeqDx en bundet Smith-Waterman-algoritme som utfører lokale sekvensinnrettinger for å bestemme lignende regioner mellom to sekvenser. I stedet for å se på den totale sekvensen, sammenligner Smith-Waterman-algoritmen segmenter med alle mulige lengder. Lokale innrettinger er nyttige for forskjellige sekvenser som mistenkes å inneholde regioner med likhet innenfor den større sekvensen.

Variantbetegnelse

Variantbetegnelse registrerer enkelt nukleotidpolymorfismer (SNP-er), innsettinger og slettinger (indeler) og andre strukturelle varianter.

For data generert på MiSeqDx-instrumentet utføres variantbetegnelse av Starling-variantbetegneren i MiSeq Reporter. Starling betegner SNP-er og små indeler og oppsummerer dybden og sannsynligheten for feil for alle steder i genomet. For hver SNP- eller indelbetegnelse er sannsynligheten for en feil gitt som en variantkvalitetsscore.

Etter fullføring produserer Starling html-formaterte rapporter for SNP-er og indeler og faneavgrensede tekstfiler som inneholder varianter i variantbetegningsformatet (VCF). Mer informasjon, *VCF-filformat* på side 44.

MiSeqAnalysis-mappen

MiSeqAnalysis-mappen er hovedkjøringsmappen for MiSeq Reporter. Forholdet mellom MiSeqOutput- og MiSeqAnalysis-kjøremappene er oppsummert som følger:

- ▶ Under sekvensering vil sanntidsanalysen (RTA) fylle MiSeqOutput-mappen med filer, generert under primæranalysen.
- ▶ Med unntak av fokusbilder og miniatyrbilder, kopierer TRA filene til MiSeqAnalysis-mappen i sanntid. Når primæranalysen er ferdig, skriver RTA filen RTAComplete.xml til begge kjøringmappene.
- ▶ MiSeq Reporter overvåker MiSeqAnalysis-mappen og starter sekundæranalysen når filen RTAComplete.xml vises.
- ▶ Mens sekundæranalysen fortsetter, skriver MiSeq Reporter analyseutgangsfilene til MiSeqAnalysis-mappen og kopierer deretter filene til MiSeqOutput-mappen.

[Denne siden er blank med hensikt]

Datavisualisering

| | |
|---|----|
| Innledning | 18 |
| Krav til inndatafiler | 19 |
| Tilpasset amplitikonarbeidsflyt | 20 |
| Analyseutgangsfiler for CF-analyser | 31 |



Innledning

MiSeq Reporter utfører sekundæranalyse og generer ulike typer informasjon som er spesifikk for analysen når analysen er fullført. Resultatene vises på MiSeq Reporter-nettgrensesnittet i form av grafer og tabeller for hver kjøring. MiSeqDx-produkter inkluderer de som er oppført i tabellen nedenfor:

| Produkt | Beskrivelse |
|--|---|
| Cystisk fibrose 139-variantanalyse | Detekterer 139 klinisk relevante varianter i CFTR-genet fra maksimum 48 prøver. |
| Klinisk sekvenseringsanalyse for cystisk fibrose | Detekterer mutasjoner i proteinkodingsregionene, inkludert intron/ekson-grensene, to store slettinger og to dype introniske mutasjoner i CFTR-genet fra maksimum 8 prøver. |
| Universalsett 1.0 | Sett med reagenser og forbruksmaterieell som brukes sammen med brukerlevert, tilpasset oligo for å utføre målrettet resekvensering av spesifikke genomiske regioner av interesse. |

Krav til inndatafiler

MiSeq Reporter krever at følgende primæranalysefiler genereres under sekvenseringskjøringen for å kunne utføre sekundæranalyse eller sette analysen tilbake i kø. Primæranalysefiler, som *.bcl, *.filter, and *.locs, er påkrevd for å utføre analyse.

Det er ikke nødvendig å flytte eller kopiere filer til en annen plassering før analysen begynner. Nødvendige filer kopieres automatisk til MiSeqAnalysis-mappen under sekvenseringsprosessen.

| Filnavn | Beskrivelse |
|-----------------|--|
| RTAComplete.txt | En markørfil som angir at RTA-behandlingen er ferdig. Tilstedeværelsen av denne filen trigger MiSeq Reporter til å sette analysen i kø. |
| SampleSheet.csv | Gir parametre for kjøringen og påfølgende analyser. Ved starten på kjøringen blir prøvearket kopiert til rotnivået i kjøringsskjemmet og får det nye navnet SampleSheet.csv. |
| RunInfo.xml | Inneholder kjøringssinformasjon på høyt nivå, som antallet avlesninger og sykluser i sekvenseringskjøringen og hvorvidt en avlesning er indeksert. |

Forhåndsinstallerte databaser og genomer

MiSeqDx omfatter forhåndsinstallerte databaser og genomer.

| Forhåndsinstallert | Beskrivelse |
|--------------------|---|
| Databaser | dbSNP for mennesker, versjon 131 refGene for mennesker |
| Genomer | humane (<i>Homo sapiens</i>) versjon 19 |

Tilpasset amplikonarbeidsflyt

Den tilpassede Amplicon-arbeidsflyten som brukes til CF-analysene og universalsett 1.0, evaluerer korte regioner av amplifisert DNA eller amplikoner for varianter. Fokuset på sekvensering av amplikoner muliggjør høy dekning av bestemte regioner på tvers av et stort antall prøver.

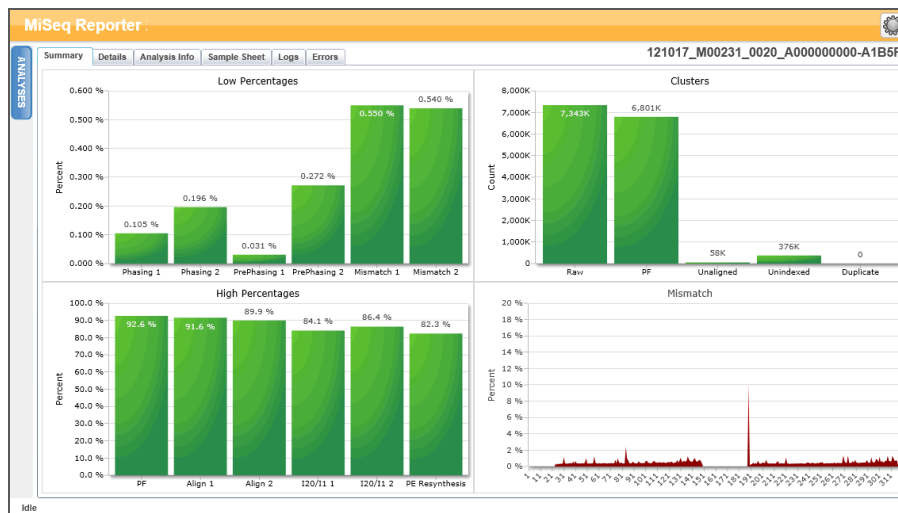
Etter demultipleksing og FASTQ-filgenerering, utfører arbeidsflyten følgende trinn:

- ▶ **Alignment** (Innretting) – Klynger fra hver prøve blir innrettet mot amplikonsekvenser angitt i manifestfilen.
 - For paired-end-data, blir hver avlesning innledningsvis evaluert med hensyn til sin innretting med de relevante probesekvensene for denne avlesingen. Read 1 blir vurdert opp mot det reverskomplementet av nedstrøms lokusspesifikke oligoer (DLSO) og Read 2 blir vurdert opp mot oppstrøms lokusspesifikke oligoer (ULSO). Hvis starten på en avlesingssekvens samsvarer med en probesekvens med ikke mer enn ett misforhold, er den fulle lengden av avlesingen deretter innrettet mot amplikonets målsekvens for den probe-sekvensen. Denne innrettingen utføres langs hele lengden på amplikonets målsekvenser ved hjelp av en bundet Smith-Waterman-innretting.
 - Indeler innenfor DLSO og ULSO blir ikke observert på grunn av analysekjemien.
- ▶ **Paired-end evaluation** (Paired-end-vurdering) – For paired-end-kjøringer blir toppscoreinnrettingen for hver avlesing vurdert. Hvis en avlesing ikke ble innrettet eller ble innrettet til ulike kromosomer, blir avlesingene flagget som et uløst par. Dessuten, hvis to innrettinger kommer fra ulike amplikoner (for eksempel ulike rader i målseksjonen i manifestet), blir avlesingene flagget som et uløst par.
- ▶ **Bin/Sort** (Kaste/sortere) – Avlesingene blir gruppert etter prøve og kromosom og deretter sortert etter kromosomposisjonen. Resultatene blir skrevet til én BAM-fil per prøve.
- ▶ **Variant calling** (Variantbetegnelse) – Mutasjoner blir identifisert med variantbetegnelsen. Du finner mer informasjon under *Variantbetegnelse* på side 14.
- ▶ **Variant analysis and annotation** (Variantanalyse og kommentarer) – Ved bruk av en forhåndsinstallert SNP-database (dbsnp.txt) blir alle kjente mutasjoner flagget i analyserapportfilen.
- ▶ **Statistics reporting** (Statistikkrapportering) – Statistikk blir oppsummert og rapportert.

Oppsummeringsfanen

Informasjonen som vises på oppsummeringsfanen, inkluderer en lav prosent-graf, høy prosent-graf, klyngegraf og misforholdsgraf.

Figur 13 Eksempel på oppsummeringsfane



Lav prosent-graf

| Y-akse | X-akse | Beskrivelse |
|---------|--------------|---|
| Prosent | Fasing 1 | Prosentverdien av molekyler i en klynge som faller bak gjeldende syklus i Read 1. |
| | Fasing 2 | Prosentverdien av molekyler i en klynge som faller bak gjeldende syklus i Read 2. |
| | Prefasing 1 | Prosentverdien av molekyler i en klynge som faller foran gjeldende syklus i Read 1. |
| | Prefasing 2 | Prosentverdien av molekyler i en klynge som faller foran gjeldende syklus i Read 2. |
| | Misforhold 1 | Gjennomsnittlig prosentverdi for misforhold for Read 1 over alle sykluser. |
| | Misforhold 2 | Gjennomsnittlig prosentverdi for misforhold for Read 2 over alle sykluser. |

Høy prosent-graf

| Y-akse | X-akse | Beskrivelse |
|---------|--------------|---|
| Prosent | PF | Prosentverdien for klyngepasserende filtre. |
| | Innrett 1 | Prosentverdien for klynger som innrettet til referansen i Read 1. |
| | Innrett 2 | Prosentverdien for klynger som innrettet til referansen i Read 2. |
| | I20 / I1 1 | Forholdet mellom intensitetene ved syklus 20 og intensitetene på syklus 1 for Read 1. |
| | I20 / I1 2 | Forholdet mellom intensitetene ved syklus 20 og intensitetene på syklus 1 for Read 2. |
| | PE-resyntese | Forholdet mellom første syklus-intensiteter for Read 1 til første syklus-intensiteter for Read 2. |

Klyngegraf

| Y-akse | X-akse | Beskrivelse |
|---------|------------|---|
| Klynger | Rå | Det totale antallet klynger som er oppdaget i kjøringen. |
| | PF | Det totale antallet klynger som passerer filteret i kjøringen. |
| | Uinnrettet | Det totale antallet klynger som passerer filteret som ikke var innrettet til referansegenomet, hvis dette er aktuelt. Uindekserte klynger inkluderes ikke i det ikke-innrettede antallet. |
| | Uindeksert | Det totale antallet klynger som passerer filteret, som ikke var forbundet med noen indekssekvens i kjøringen. |
| | Duplikat | Denne verdien gjelder ikke for CF-analyser eller universalsett 1.0 og vil derfor alltid være null. |

Misforhold-graf

| Y-akse | X-akse | Beskrivelse |
|---------|--------|---|
| Prosent | Syklus | Plotter prosentverdien for misforhold etter syklus for alle klynger i en kjøring. |

Fanen Details (Detaljer) for CF 139-variantanalyse

Informasjonen som vises på detaljfanen for CF 139-Variant-analysen, inkluderer en prøvetabell og en varianttabell.

Figur 14 Fanen Details (Detaljer) for CF 139-variantanalyse, eksempel

| MiSeq Reporter | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------|-------------|-----------|-------------|---------|---------|--|--|--|-------------------------------------|
| Summary | | | | | | | | | | 121017_M00369_0075_A000000000-A1AH1 |
| Samples (49) | | | | | | | | | | |
| # | Sample ID | Sample Name | Call Rate | Performance | Control | Comment | | | | |
| 1 | NA01445 | NA01445 | 100.00 | Pass | | | | | | |
| 2 | NA02828 | NA02828 | 100.00 | Pass | | | | | | |
| 3 | NA04330 | NA04330 | 100.00 | Pass | | | | | | |
| 4 | NA07339 | NA07339 | 100.00 | Pass | | | | | | |
| 5 | NA07381 | NA07381 | 100.00 | Pass | | | | | | |
| 6 | NA07441 | NA07441 | 100.00 | Pass | | | | | | |
| 7 | NA07732 | NA07732 | 100.00 | Pass | | | | | | |
| 8 | NA07854 | NA07854 | 100.00 | Pass | | | | | | |
| 9 | NA07857 | NA07857 | 100.00 | Pass | | | | | | |

| Variants (3) | | | | | | | | | | | |
|--------------|-----------|-------------|---------------|-------------|-------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|----------------------|-----|
| # | Sample ID | Sample Name | Mutation Name | Type | dbSNP rsID | CFTR Gene Region | Genomic Location | cDNA Name (HGVS) | Protein Name (HGVS) | Result | Cor |
| 1 | NA01445 | NA01445 | PolyTG/PolyT | PolyTGPolyT | N/A | Intron 9 | 117188661-117188689 | c.1210-12T[S_G] | N/A | (TG)10(T)?(TG)10(T)? | 53 |
| 2 | NA01445 | NA01445 | F508del | DEL | rs113993960 | Exon 11 | 117199645 | c.1521_1523delCTT | p.Phe508del | HET | 307 |
| 3 | NA01445 | NA01445 | W1282X | SNV | rs77010898 | Exon 23 | 117282620 | c.3846G>A | p.Tip1282X | HET | 307 |

Prøvetabell for CF 139-variantanalyse

| Kolonne | Beskrivelse |
|-----------|---|
| # | Et ordinalt identifikasjonstall i tabellen. |
| Prøve-ID | Prøve-ID-en fra prøvearket. Prøve-ID-en skal alltid være en unik verdi. |
| Prøvenavn | Prøvenavnet fra prøvearket. |

| Kolonne | Beskrivelse |
|---------------------|---|
| Betegnelsesfrekvens | Antallet mutasjonsposisjoner som oppfyller en forhåndsdefinert konfidensverditerskel, dividert med de totale mutasjonsposisjonene som ble behandlet. Betegnelsesfrekvensen på per prøve-basis og rapportert som prosentandel som er beregnet som 1 minus [antall posisjoner med ufullstendige betegnelser, dividert med totalt antall sekvenserte posisjoner]. |
| Ytelse | Bestått eller ikke bestått-rangering, basert på betegnelsesfrekvens. For en positiv kontrollprøve: <ul style="list-style-type: none"> • BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens $\geq 99\%$ • IKKE BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens $< 99\%$ For en negativ kontrollprøve: <ul style="list-style-type: none"> • BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens $\leq 10\%$ • IKKE BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens $> 10\%$ For en prøve ikke merket som en positiv eller negativ kontroll: <ul style="list-style-type: none"> • BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens $\geq 99\%$ • IKKE BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens $< 99\%$ |
| Kontroll | Typen kontroll som oppført i prøvearket. Verdiene er positive eller negative. Et blankt felt angir kun prøve. |
| Kommentar | Et valgfritt testfelt for kommentarer. Kommentarer som angis i dette feltet, blir lagret i analyserapportfilen, MiSeqDxCF139VariantAssay.txt. Hvis analysen settes tilbake i kø, blir det skrevet en ny rapportfil. Kommentarer fra en tidligere analysekjøring blir ikke overført til neste analysekjøring. |

Varianttabell for CF 139-variantanalyse

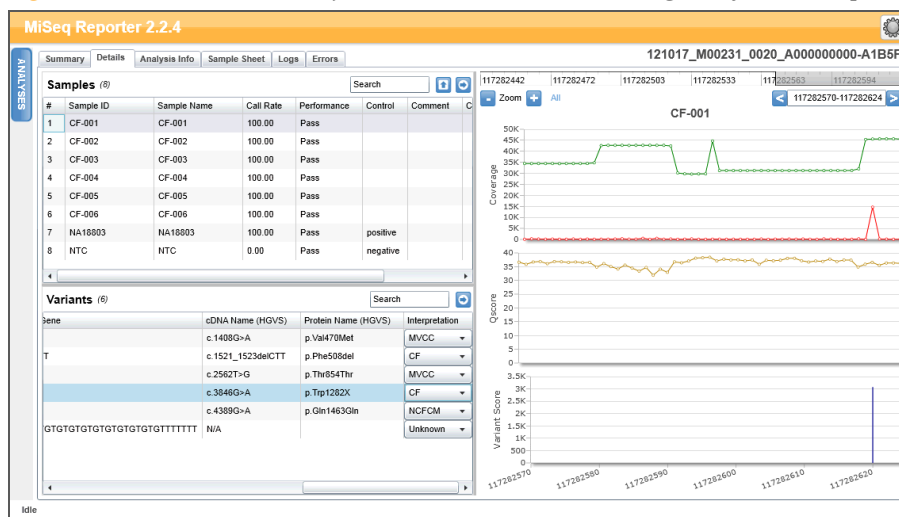
| Kolonne | Beskrivelse |
|--------------------------|---|
| # | Et ordinalt identifikasjonstall i tabellen. |
| Prøve-ID | Prøve-ID-en fra prøvearket. Prøve-ID-en skal alltid være en unik verdi. |
| Prøvenavn | Prøvenavnet fra prøvearket. |
| Mutasjoner (vanlig navn) | Vanlig navn på cystisk fibrose-varianten som beskrevet i CFTR2-databasen. |
| Mutasjonstype | Varianttypen. <ul style="list-style-type: none"> • SNV – Enkelt nukleotidvariant • DIV – Sletting/innsetting-variant • DEL – Stor sletting • PolyTGPolyT – PolyTG/PolyT-genotype i CF-gen |
| dbSNP rsID | dbSNP rsID av varianten, hvis dette er aktuelt. |
| CFTR-genregion | CFTR-genregion (eksonnummer eller intronnummer) der varianten er tilstede. |

| Kolonne | Beskrivelse |
|---------------------|--|
| Genomisk plassering | Den genomiske plasseringen til varianten. |
| cDNA navn (HGVS) | Beskrivelse av en variant på DNA-nivået som bruker kode-DNA-sekvensnomenklatur (cDNA-sekvensnomenklatur) som anbefalt av Human Genome Variation Society (HGVS). |
| Proteinnavn (HGVS) | Beskrivelse av en variant på proteinnivået som bruker proteinsekvensnomenklatur som anbefalt av Human Genome Variation Society (HGVS). |
| Resultat | Variantgenotype. For SNV-er, DIV-er og DEL-er: <ul style="list-style-type: none"> • HET- Heterozygot • HOM – Homozygot For Poly TGPolyT-varianten blir den faktiske genotypen rapportert. MERK: PolyTGPolyT blir kun rapportert når R117H-varianten er detektert. |

Fanen Details (Detaljer) for klinisk CF-sekvenseringsanalyse

Informasjonen som vises på detaljfanen for CF klinisk sekvensering, inkluderer en prøvetabell, varianttabell, dekningsgraf, Q-scoregraf og variantscoregraf.

Figur 15 Fanen Details (Detaljer) for klinisk CF-sekvenseringsanalyse, eksempel



Prøvetabell for klinisk CF-sekvenseringsanalyse

| Kolonne | Beskrivelse |
|-----------|---|
| # | Et ordinært identifikasjonstall i tabellen. |
| Prøve-ID | Prøve-ID-en fra prøvearket. Prøve-ID-en skal alltid være en unik verdi. |
| Prøvenavn | Prøvenavnet fra prøvearket. |

| Kolonne | Beskrivelse |
|----------------------------|---|
| Betegnelsesfrekvens | Antallet baser som oppfyller en kvalitetsscoreterskel, dividert med det totale antallet baser som ble behandlet. Betegnelsesfrekvensen på per prøve-basis og rapportert som prosentandel som er beregnet som 1 minus [antall posisjoner med ufullstendige betegnelser, dividert med totalt antall sekvenserte baser/posisjoner]. |
| Ytelse | Bestått eller ikke bestått-rangering, basert på betegnelsesfrekvens. For en positiv kontrollprøve: <ul style="list-style-type: none"> • BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens ≥ 99 % • IKKE BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens < 99 % For en negativ kontrollprøve: <ul style="list-style-type: none"> • BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens ≤ 10 % • IKKE BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens > 10 % For en prøve ikke merket som en positiv eller negativ kontroll: <ul style="list-style-type: none"> • BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens ≥ 99 % • IKKE BESTÅTT – med en betegnelsesfrekvens < 99 % |
| Kontroll | Typen kontroll som oppført i prøvearket. Verdiene er positive eller negative. Et blankt felt angir kun prøve. |
| Kommentar | Et valgfritt testfelt for kommentarer. Kommentarer som angis i dette feltet, blir lagret i analyserapportfilen MiSeqDxCFClinicalSequencing.txt. Hvis analysen settes tilbake i kø, blir det skrevet en ny rapportfil. Kommentarer fra en tidligere analysekjøring blir ikke overført til neste analysekjøring. |
| Koordinatene ikke betegnet | Genomkoordinater innen den målrettede regionen der en betegnelse ikke ble rapportert på grunn av lav konfidensverdi. |

Varianttabell for klinisk CF-sekvenseringsanalyse

| Kolonne | Beskrivelse |
|-------------|---|
| # | Et ordinalt identifikasjonstall i tabellen. |
| Prøve-ID | Prøve-ID-en fra prøvearket. Prøve-ID-en skal alltid være en unik verdi. |
| Prøvenavn | Prøvenavnet fra prøvearket. |
| Kr | Referansemålet eller kromosomnavnet. |
| Posisjon | Posisjonen der varianten ble funnet. |
| Varianttype | Varianttypen. <ul style="list-style-type: none"> • SNV – Enkelt nukleotidvariant • DIV – Sletting/innsetting-variant • DEL – Stor sletting • PolyTGPolyT – PolyTG/PolyT-genotype i CF-gen |
| Betegnelse | En streng angir hvordan basen eller basene ble endret på denne plassen i referansen. |

| Kolonne | Beskrivelse |
|--------------------|--|
| Frekvens | Fraksjonen av avlesinger for prøven som inkluderer varianten. Hvis referansebasen i en spesiell posisjon for eksempel er A, og prøve 1 har 60 A-avlesinger og 40 T-avlesinger, har SNV en variantfrekvens på 0,4. |
| Dybde | Antallet avlesinger for en prøve som dekker en spesiell posisjon. |
| Filter | Kriteriene for en filtrert variant. |
| dbSNP ID | dbSNP-navnet på varianten. |
| RefGene | Genet i henhold til RefGene der denne varianten vises. |
| cDNA navn (HGVS) | Beskrivelse av en variant på DNA-nivået som bruker kode-DNA-sekvensnomenklatur (cDNA-sekvensnomenklatur) som anbefalt av Human Genome Variation Society (HGVS). |
| Proteinnavn (HGVS) | Beskrivelse av en variant på proteinnivået som bruker proteinsekvensnomenklatur som anbefalt av Human Genome Variation Society (HGVS). |
| Tolking | <p>Dette feltet gir den medisinske genetikerer mulighet til å gi en klinisk tolkning av mutasjonen i hver prøve. Følgende alternativer er inkludert i rullegardinlisten for hver prøve:</p> <ul style="list-style-type: none"> • CF – CF-forårsakende • MVCC – Mutasjon med varierende kliniske konsekvenser • MOUS – Mutasjon av ukjent signifikans • NCFCM –Ikke-CF-forårsakende mutasjon • Ukjent <p>En ny rapport kan genereres med ikonet.</p> |

Tolkningskolonne for varianttabellell

Tolkningskolonnen har valg som gir den medisinske genetikerer mulighet til å foreta en klinisk tolkning av mutasjonen i hver prøve. Følgende alternativer er inkludert i nedtrekkslisten for Interpretation (Tolking):

- **CF** – CF-forårsakende
- **MVCC** – Mutasjon med varierende kliniske konsekvenser
- **MOUS** – Mutasjon av ukjent signifikans
- **NCFCM** – Ikke-CF-forårsakende mutasjon
- **Ukjent**

Figur 16 Tolkningskolonne



Resultater i tabellen Variants (Varianter) kan eksporteres individuelt til en tekstfil som bruker ikonet **Export table data to text file** (Eksporter tabelldata til tekstfil). Denne eksporten endrer ikke analyserapporteringsfilen.



Når den medisinske genetiker har bestemt variantsignifikans, kan tolkningsinnstillingene lagres i analyserapporten. Filnavnet i den opprinnelige analyserapporten vil automatisk bli tilføyd med et tid/dato-stempel.

Dekningsgraf for klinisk CF-sekvenseringsanalyse

| Y-akse | X-akse | Beskrivelse |
|---------|----------|---|
| Dekning | Posisjon | Den grønne kurven er antallet innrettede avlesinger som dekker hver posisjon i referansen. Den røde kurven er antallet innrettede avlesinger som har en feil benevnelse i denne posisjonen i referansen. SNV-er og andre varianter vises som topp i den røde kurven. |

Q-scoregraf

| Y-akse | X-akse | Beskrivelse |
|---------|----------|--|
| Q-score | Posisjon | Gjennomsnittlig kvalitetsscore av baser i en gitt posisjon i referansen. |

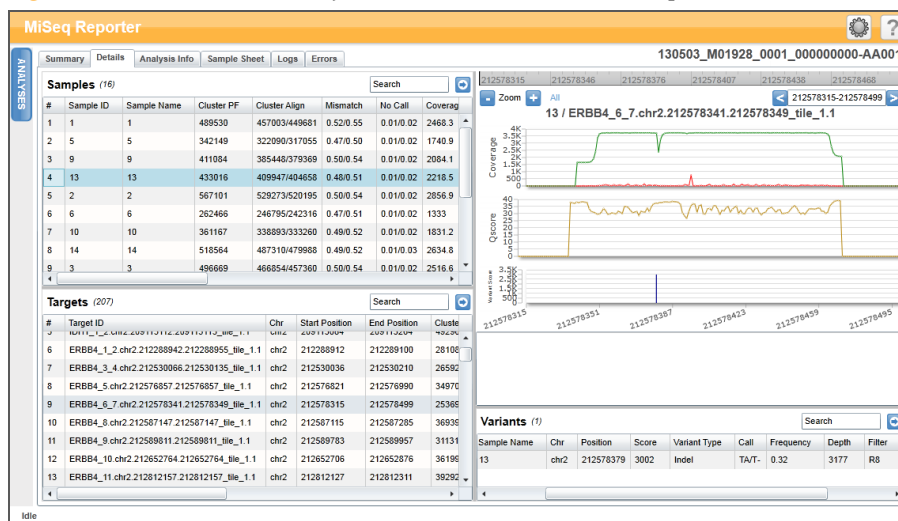
Variantscoregraf for klinisk CF-sekvenseringsanalyse

| Y-akse | X-akse | Beskrivelse |
|--------|----------|---|
| Score | Posisjon | Gir en grafisk visning av variantkvalitetsscoren og posisjonen til SNV-er og indeler. |

Detaljane for universalsett 1.0

Informasjonen som vises på fanen Details (Detaljer) for universalsett 1.0, inkluderer en prøvetabell, måltabell, dekningsgraf, Q-scoregraf og variantscoregraf og varianttabell.

Figur 17 Fanen Details (Detaljer) for universalsett 1.0, eksempel



Prøvetabell for universalsett 1.0

| Kolonne | Beskrivelse |
|-------------------|--|
| # | Et ordinalt identifikasjonstall i tabellen. |
| Prøve-ID | Prøve-ID-en fra prøvearket. Prøve-ID-en skal alltid være en unik verdi. |
| Prøvenavn | Prøvenavnet fra prøvearket. |
| Klynge-PF | Antallet klynger som passerer filteret for prøven. |
| Klyngeinnretting | Det totale antallet PF-klynger innrettet for prøven (Read 1/Read 2). |
| Misforhold | Det prosentvise misforholdet til referansen i gjennomsnitt over sykluser per avlesing (Read 1/Read 2). |
| Ingen betegnelser | Prosentverdien av baser som ikke kunne betegnes (ingen betegnning) for prøven i gjennomsnitt over sykluser per avlesing (Read 1/Read 2). |
| Dekning | Mediandekning (antallet baser innrettet til en gitt referanseposisjon) i gjennomsnitt over alle posisjoner. |
| Het SNPs | Antallet heterozygote SNP-er detektert for prøven. |
| Hom SNPs | Antallet homozygote SNP-er detektert for prøven. |
| Innsettinger | Antallet innsettinger detektert for prøven. |
| Slettinger | Antallet slettinger detektert for prøven. |
| Manifest | Filen som angir et referansegenom og målrettede referanseregioner som skal brukes i innrettingstrinnet. |
| Genom | Navnet på referansegenomet |

Måltabell for universalsett 1.0

| Kolonne | Beskrivelse |
|---------------|--|
| # | Et ordinalt identifikasjonstall i tabellen. |
| Mål-ID | Navnet på målet i manifestet. |
| Kr | Referansemålet eller kromosomnavnet. |
| Startposisjon | Startposisjonen i målregionen |
| Sluttposisjon | Sluttposisjonen i målregionen |
| Klynge-PF | Antallet klyngepasserende filtre for målet som vises per avlesing (Read 1/Read 2). |
| Misforhold | Prosentandelen av uoverstemmende baser for målet i gjennomsnitt over alle syklusene, vises per avlesing. Misforhold = [gjennomsnitt (antall feil i sykluser) / klynge PF] * 100. |

| Kolonne | Beskrivelse |
|-------------------|---|
| Ingen betegnelser | Prosentandelen av ubetegnedede baser for målet i gjennomsnitt over sykluser, vises per avlesing. |
| Het SNPs | Antallet heterozygote SNP-er detektert for målet i alle prøvene. |
| Hom SNPs | Antallet homozygote SNP-er detektert for målet i alle prøvene. |
| Innsettinger | Antallet innsettinger detektert for målet i alle prøvene. |
| Slettinger | Antallet slettinger registrert for målet i alle prøvene. |
| Manifest | Filen som angir et referansegenom og målrettede referanseregioner som skal brukes i innrettingstrinnet. |

Dekningsgraf for universalsett 1.0

| Y-akse | X-akse | Beskrivelse |
|---------|----------|---|
| Dekning | Posisjon | Den grønne kurven er antallet innrettede avlesinger som dekker hver posisjon i referansen. Den røde kurven er antallet innrettede avlesinger som har en feil benevnelse i denne posisjonen i referansen. SNP-er og andre varianter vises som topper i den røde kurven. |

Q-scoregraf

| Y-akse | X-akse | Beskrivelse |
|---------|----------|--|
| Q-score | Posisjon | Gjennomsnittlig kvalitetsscore av baser i en gitt posisjon i referansen. |

Variantscoregraf for universalsett 1.0

| Y-akse | X-akse | Beskrivelse |
|--------|----------|---|
| Score | Posisjon | Gir en grafisk visning av variantkvalitetsscoren og posisjonen til SNV-er og indeler. |

Varianttabell for universalsett 1.0

| Kolonne | Beskrivelse |
|-----------|---|
| # | Et ordinalt identifikasjonstall i tabellen. |
| Prøve-ID | Prøve-ID-en fra prøvearket. Prøve-ID-en skal alltid være en unik verdi. |
| Prøvenavn | Prøvenavnet fra prøvearket. |
| Kr | Referansemålet eller kromosomnavnet. |
| Posisjon | Posisjonen der varianten ble funnet. |
| Score | Variantkvalitetsscoren for denne varianten. |

| Kolonne | Beskrivelse |
|-------------|--|
| Varianttype | Varianttypen, som enten kan være SNP eller indel. |
| Betegnelsen | <p>En representasjon av hvordan basen eller basene ble endret på denne plasseringen i referansen.</p> <ul style="list-style-type: none"> • SNP-er er opplistet i formatet Reference > AlleleA/AlleleB. • Innsetninger er opplistet i formatet Reference/Insertion (Referanse/Innsetting). G-/GA viser innsettingen av A. • Slettinger er opplistet i formatet Reference/Deletion (Referanse/Sletting). AGG/A-- viser sletting av GG. |
| Frekvens | Fraksjonen av avlesinger for prøven som inkluderer varianten. Eksempel: hvis referansebasen er A og prøven 1 har 60 A-avlesinger og 40 T-avlesinger, da har SNP en variantfrekvens på 0,4. |
| Dybde | Antallet avlesinger for en prøve som dekker en spesiell posisjon. |
| Filter | Kriteriene for en filtrert variant. Hvis alle filtrene godkjennes, blir PASS skrevet i filterkolonnen. Du finner mer informasjon under <i>VCF-filoverskrifter og kommentarer</i> på side 45. |
| dbSNP | dbSNP-navnet på varianten, hvis dette er aktuelt. |
| RefGene | Genet i henhold til RefGene der denne varianten vises. |

Analyseutgangsfiler for CF-analyser

Analyseresultater for CF-analyser vises på detaljfanen.

Figur 18 Fanen Details (Detaljer) for CF 139-variantanalyse, eksempel

| # | Sample ID | Sample Name | Call Rate | Performance | Control | Comment |
|---|-----------|-------------|-----------|-------------|---------|---------|
| 1 | NA01445 | NA01445 | 100.00 | Pass | | |
| 2 | NA02828 | NA02828 | 100.00 | Pass | | |
| 3 | NA04330 | NA04330 | 100.00 | Pass | | |
| 4 | NA07339 | NA07339 | 100.00 | Pass | | |
| 5 | NA07381 | NA07381 | 100.00 | Pass | | |
| 6 | NA07441 | NA07441 | 100.00 | Pass | | |
| 7 | NA07732 | NA07732 | 100.00 | Pass | | |
| 8 | NA07854 | NA07854 | 100.00 | Pass | | |
| 9 | NA07857 | NA07857 | 100.00 | Pass | | |

| # | Sample ID | Sample Name | Mutation Name | Type | dbSNP rsID | CFTR Gene Region | Genomic Location | cDNA Name (HGVS) | Protein Name (HGVS) | Result | Col |
|---|-----------|-------------|---------------|---------------|-------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|----------------------|-----|
| 1 | NA01445 | NA01445 | PolyTG/PolyT | Poly/TG/PolyT | N/A | Intron 9 | 117188661-117188689 | c.1210-12T[S_9] | N/A | (TG)10(T)7(TG)10(T)9 | 53 |
| 2 | NA01445 | NA01445 | F508del | DEL | rs113893980 | Exon 11 | 117199645 | c.1521_1523delCTT | p.Phe508del | HET | 307 |
| 3 | NA01445 | NA01445 | W1282X | SNV | rs77010898 | Exon 23 | 117282620 | c.3846G>A | p.Trp1282X | HET | 307 |



Resultater i tabellen Variants (Varianter) kan eksporteres individuelt til en tekstfil som bruker ikonet **Export table data to text file** (Eksporter tabelldata til tekstfil). Denne eksporten endrer ikke analyserapporteringsfilen.



Når den medisinske genetikeren har bestemt variantsignifikans, kan tolkningsinnstillingene lagres i analyserapporten. Filnavnet i den opprinnelige analyserapporten vil automatisk bli tilføyd med et tid/dato-stempel.

Utgangsfiler for CF-analyse blir også oppsummert i én faneavgrenset tekstfil, kalt etter analysen som brukes til kjøringen. Disse resultatene er identiske med det som finnes i detaljfanen.

- ▶ Til CF 139-variantanalysen blir filen kalt MiSeqDxCf139VariantAssay.txt.
- ▶ Til CF klinisk variantanalyse blir filen kalt MiSeqDxCfClinicalSequencingAssay.txt.

Når analysen er ferdig, blir utgangsfiler skrevet til innrettingsmappen for kjøringen. Eksempel:

```
MiSeqAnalysis \<RunFolderName> \Data \ Intensities \ BaseCalls \ Alignment
```

Hvis analysen har vært gjentatt eller satt tilbake i kø, blir en ny rapport skrevet til innretningen for denne analysekjøringen. Du finner mer informasjon under *Sette analyse tilbake i kø* på side 12.

Utgangsfiler har en overskrift som inkluderer følgende informasjon om kjøringen:

| Overskrift | Beskrivelse |
|----------------|--|
| Test | Dette beskriver testen som ble utført. |
| Kjørings-ID | Dette er kjøring-ID-en som ble generert av MOS ved starten på sekvenseringskjøringen |
| Kjøringsdato | Dette er datoen (DDMMÅÅ) da sekvenseringskjøringen startet i MOS. |
| Analyseversjon | Dette er versjonen av MiSeq Reporter som ble brukt til analyse. |

Figur 19 Overskrift for CF 139-variantanalysens utgangsfil, eksempel

```
Test CF 139-variantanalyse  
Til in vitro-diagnostisk bruk  
Kjørings-ID 140212_M01018_0071_000000000-A2618  
Kjøringsdato 140212  
Analyseversjon 2.2.31.1
```

Under overskriften er et oppsummeringsavsnitt for hver prøve-ID som inneholder kolonner for hver rapporterte verdi. Se informasjon om kolonnebeskrivelser på fanen *Fanen Details (Detaljer) for CF 139-variantanalyse* på side 22 og fanen *Fanen Details (Detaljer) for klinisk CF-sekvenseringsanalyse* på side 24.



MERK

Analyseringsforløpet der utdatafiler blir generert, er ikke identisk for CF-analysene og universalsett 1.0. Utdatafiler generert for universalsett 1.0 er *.bam-filer, *.vcf-filer og AmpliconCoverage_M#.tsv-filer. Du finner mer informasjon om utdatafiler for universalsett 1.0 i Vedlegg A Universalsett 1.0 Analyseutdatafiler.

Installasjon og feilsøking

| | |
|--|----|
| MiSeq Reporter-krav utenfor instrumentet | 34 |
| Installere MiSeq Reporter utenfor instrumentet | 35 |
| Bruke MiSeq Reporter utenfor instrumentet | 37 |
| Feilsøke MiSeq Reporter | 38 |



MiSeq Reporter-krav utenfor instrumentet

Hvis du installerer en kopi av MiSeq Reporter på en Windows-datamaskin utenfor instrumentet, er det tillatt med sekundær analyse av sekvenseringsdata mens MiSeqDx utfører en påfølgende sekvenseringskjøring.

Du finner mer informasjon på *Installere MiSeq Reporter utenfor instrumentet* på side 35.

Databehandlingskrav

MiSeq Reporter-programvaren krever følgende databehandlingskomponenter:

- ▶ 64-bit Windows OS (Vista, Windows 7, Windows Server 2008 64-bit)
- ▶ ≥ 8 GB RAM minimum; ≥ 16 GB RAM anbefalt
- ▶ ≥ 1 TB diskplass
- ▶ Quad core processor (2,8 GHz eller høyere)
- ▶ Microsoft .NET 4

Støttede nettlesere

MiSeq Reporter kan vises med følgende nettlesere:

- ▶ Safari 5.1.7 eller nyere
- ▶ Firefox 13.0.1 eller nyere
- ▶ Internet Explorer 8 eller nyere

Nedlasting og lisensiering

- 1 Last ned en kopi av MiSeq Reporter-programvaren fra Illumina-nettstedet. Det er nødvendig å ha en MyIllumina-konto.
- 2 Aksepter lisensavtalen for sluttbrukere (EULA) når du blir bedt om det under installasjonen. Ingen lisensnøkkel er nødvendig fordi denne ekstra kopien er gratis.

Installere MiSeq Reporter utenfor instrumentet

Når du skal installere MiSeq Reporter på en Windows-maskin utenfor instrumentet, må du først sette opp tillatelsen **Log on as a service** (Logg på som en tjeneste), og deretter kjøre installasjonsveiviseren. Deretter konfigurerer du programvaren til å vise til riktig depotbane og genombane.

Sette opp bruker- eller gruppekontoer i Windows 7

Administratorrettigheter er påkrevd for å konfigurere bruker- eller gruppekontoer for å aktivere tillatelsen **Log on as a service** (Logg på som en tjeneste). Hvis det er behov for det, kontakt den lokale administratoren i institusjonen for hjelp.

- 1 I **Start**-menyen i Windows velger du **Control Panel** (Kontrollpanel) og klikker på **System and Security** (System og sikkerhet).
- 2 Klikk på **Administrative Tools** (Administrative verktøy), og dobbeltklikk deretter på **Local Security Policy** (Lokal sikkerhetspolicy).
- 3 Fra treet Security Settings (Sikkerhetsinnstillinger) til venstre dobbeltklikker du på **Local Policies** (Lokale policyer) og deretter på **User Rights Assignments** (Tilordning av brukerrettigheter).
- 4 I detaljruten til høyre, dobbeltklikk på **Log on as a service** (Logg på som en tjeneste).
- 5 I dialogboksen Properties (Egenskaper) klikker du på **Add User or Group** (Legg til bruker eller gruppe).
- 6 Oppgi navnet på bruker- eller gruppekontoen for denne datamaskinen. Klikk på **Check Names** (Kontroller navn) for å validere kontoen.
- 7 Klikk på **OK** i en åpen dialogboks, og lukk deretter kontrollpanelet.

Du finner mer informasjon på [technet.microsoft.com/en-us/library/cc739424\(WS.10\).aspx](http://technet.microsoft.com/en-us/library/cc739424(WS.10).aspx) på Microsofts nettsider.

Kjøre MiSeq Reporter-installasjonsveiviser

- 1 Last ned og pakk ut MiSeq Reporter-installasjonspakken fra Illuminas nettsted.
- 2 Dobbeltklikk på setup.exe-filen.
- 3 Klikke på **Next** (Neste) gjennom ledetekstene i installasjonsveiviseren.
- 4 Følg ledeteksten, og angi brukernavnet og passordet for en konto med tillatelsen **Log on as a service** (Logg på som en tjeneste), slik det ble satt opp i forrige trinn.
- 5 Fortsett med eventuell gjenværende ledetekst.

Konfigurere MiSeq Reporter

Når du skal konfigurere MiSeq Reporter til å finne kjøremappen og referansegenommappen, må du redigere konfigurasjonsfilen i et tekstredigeringsprogram, for eksempel Notepad (Notisblokk).

- 1 Naviger til installasjonsmappen (C:\Illumina\MiSeq Reporter som standard) og åpne filen MiSeq Reporter.exe.config i et tekstredigeringsprogram.
- 2 Finn fanen **Repository** (Depot) og endre **verdien** til standard dataplassering på datamaskinen utenfor instrumentet.

Eksempel:

```
<add key="Repository" value="E:\Data\Repository" />
```

Som et alternativ kan denne plasseringen være et nettverkssted tilgjengelig fra datamaskinen utenfor instrumentet.

- 3 Finn fanen **GenomePath** (Genombane) og endre **verdien** til plasseringen til mappen som inneholder referansegenomfilene i FASTA-format.

Eksempel:

```
<add key="GenomePath" value="E:\MyGenomes\FASTA" />
```


Starte MiSeq Reporter-service

Når installasjonen er fullført, starter MiSeq Reporter-tjenesten automatisk. Hvis tjenesten ikke starter, starter du den manuelt ved hjelp av følgende instruksjoner, eller start datamaskinen på nytt.

- 1 I **Start** -menyen i Windows høyreklikker du på **Computer** (Datamaskin) og velger **Manage** (Administrere).
- 2 I treet Computer Management (Datamaskinhåndtering) til venstre dobbeltklikker du på **Services and Applications** (Tjenester og applikasjoner). Klikk deretter på **Services** (Tjenester).
- 3 Høyreklikk på **MiSeq Reporter** og velg **Properties** (Egenskaper).
- 4 I fanen General (Generelt) må du sjekke at **Startup Type** (Starttype) er innstilt på **Automatic** (Automatisk). Klikk deretter på **Start**.
- 5 I fanen Log On (Logg inn) må du angi **brukeravn** og **passord** for en servicekonto som har tillatelser til å skrive til serveren. Illumina anbefaler kontoen **Local System** (Lokalt system) for de fleste brukere. For hjelp eller stedsspesifikke nettverkskrav, ta kontakt med den lokale administratoren i institusjonen.
- 6 Klikk på **OK** i en åpen dialogboks, og lukk deretter vinduet Computer Management (Datamaskinhåndtering).
- 7 Når du har startet MiSeq Reporter-tjenesten, må du koble til programvaren lokalt ved hjelp av localhost: 8042 i en nettleser.

Bruke MiSeq Reporter utenfor instrumentet

Hvis du skal bruke MiSeq Reporter utenfor instrumentet, må mapper som inneholder kjøringsdata og referansegenomer, være tilgjengelige.

- 1 Med mindre det brukes et nettverkssted for sekvensering av data og referansegenomer, kopieres følgende mapper til den lokale datamaskinen.
 - Kopier kjøringsdata fra MiSeqDx-datamaskinen i D:\MiSeqOutput\ - Kopier referansegenomene fra MiSeqDx-datamaskinen i C:\Illumina\MiSeq Reporter\Genomes.
- 2 Gå til <http://localhost:8042> i en nettleser for å åpne MiSeq Reporters nettgrensesnitt.
- 3 Bytt depotbanen ved hjelp av ikonet **Settings**  (Innstillinger) i øverste høyre hjørne av nettgrensesnittet.



MERK

Den oppgitte depotbanen i Settings (Innstillinger) er midlertidig. Neste gang datamaskinen startes på nytt, går banen til depotplasseringen angitt i MiSeq Reporter.exe.config.

- 4 Velg **Analyses** (Analyser) på venstre side av nettgrensesnittet for å vise kjøring som er tilgjengelige i den angitte depotplasseringen.
- 5 Før analysen av en kjøring kan settes tilbake i kø ved hjelp av en installasjon av MiSeq Reporter utenfor instrumentet, må banen til GenomeFolder oppdateres i prøvearket, noe som kan gjøres fra fanen Sample Sheet (Prøveark). Når GenomeFolder-banen er oppdatert, må du klikke på **Save and Requeue** (Lagre og sett tilbake i kø). Du finner mer informasjon under *Redigere prøvearket i MiSeq Reporter* på side 11.

Feilsøke MiSeq Reporter

MiSeq Reporter kjører som Windows-tjenesteapplikasjon. Brukerkontoer må konfigureres for å aktivere tillatelsen **Log on as a service** (Logg på som en tjeneste) før du installerer MiSeq Reporter. Du finner mer informasjon under *Sette opp bruker- eller gruppekontoer i Windows 7* på side 35.

Du finner mer informasjon på msdn.microsoft.com/en-us/library/ms189964.aspx.


Tjenesten starter ikke

Hvis tjenesten ikke klarer å starte, må du sjekke vinduet Event Log (Hendelseslogg) og vise detaljene i feilmeldingen.

- 1 Åpne **Control Panel** (Kontrollpanel) og velg **Administrative Tools** (Administrative verktøy).
- 2 Velg **Event Viewer** (Hendelsesliste).
- 3 I vinduet Event Viewer (Hendelsesliste) velger du **Windows Logs** (Windows-logger) | **Application** (Program). Feilen som oppgis i hendelsesloggen, beskriver eventuelle syntaksfeil i MiSeq Reporter.exe.config. Feil syntaks i MiSeq Reporter.exe.config-filen kan føre til at tjenesten mislykkes.

Filer kopieres ikke

Hvis filene ikke blir kopiert til ønsket sted, må du kontrollere følgende innstillinger:

- 1 Sjekk banen til den spesifiserte depotmappen eller MiSeqOutput-mappen:
 - Når det gjelder installasjoner som er utenfor instrumentet, må du sjekke depotmappeplasseringen ved hjelp av Settings (Innstillinger)  på MiSeq Reporters nettgrensesnitt.
 - Når det gjelder installasjoner på instrumentet, må du sjekke MiSeqOutput-mappens plassering i skjermbildet MOS Run Options (MOS-kjøringsalternativer), fanen Folder Settings (Mappeinnstillinger).

Den fulle UNC-banen (for eksempel \\server1\Runs) skal brukes. Fordi MiSeq Reporter kjører som en Windows-tjeneste, gjenkjenner den ikke brukerdannede stasjoner (f.eks. Z:\Runs).

- 2 Bekreft skrivetilgang til utgangsmappeplasseringen. Kontakt den lokale administratoren i institusjonen for hjelp.
- 3 Kontroller at kopiering ikke er deaktivert i MiSeq Reporter.exe.config. Denne innstillingen finnes i avsnittet <appSettings>, og verdien skal innstilles på **1**.

```
<add key="CopyToRTAOutputPath" value="1"/>
```

Vise loggfiler for en mislykket kjøring

Visning av loggfiler kan bidra til å identifisere bestemte feil til feilsøkingsformål.

- 1 Du kan vise loggfilene med MiSeq Reporters nettlesergrensesnitt ved å velge kjøringen i fanen Analyses (Analyser).
- 2 Velg Logs (Logger) for å vise en liste over hvert trinn som forekom under analysen. Logginformasjonen registreres i AnalysisLog.txt som ligger i rotnivået i MiSeqAnalysis-mappen.

- 3 Velg feilfanen for å vise en liste over feil som forekom under analysen. Feilinformasjonen blir registrert i AnalysisError.txt som ligger i rotnivået i MiSeqAnalysis-mappen.

[Denne siden er blank med hensikt]

Universalsett 1.0

Analyseutdatafiler

| | |
|----------------------------------|----|
| Analyseutgangsfiltyper | 42 |
| BAM-filformat | 43 |
| VCF-filformat | 44 |
| Fil for PCR-produktdekning | 47 |
| Tilleggsutgangsfiler | 48 |



Analyseutgangsfiltyper

Følgende tabell beskriver utgangsfiler som er generert for universalsett 1.0, som gir analyseresultater for innretting, variantbetegnelse og dekning.

| Filnavn | Beskrivelse |
|-------------------------|---|
| *.bam-filer | Inneholder innrettede avlesinger for en gitt prøve. Ligger i Data\Intensities\BaseCalls\Alignment. |
| *.vcf files | Inneholder informasjon om varianter funnet i spesifikke posisjoner i et referansegenom. Ligger i Data\Intensities\BaseCalls\Alignment. |
| AmpliconCoverage_M#.tsv | Inneholder detaljer om resulterende dekning per ampikon per prøve. M# angir manifesttallet. Ligger i Data\Intensities\BaseCalls\Alignment. |



MERK

Analyseringsforløpet der utdatafiler blir generert, er ikke identisk for CF-analysene og universalsett 1.0. Denne delen beskriver kun analyseutdatafiler for universalsett 1.0.

BAM-filformat

En BAM-fil (*.bam) er en komprimert binær versjon av en SAM-fil som brukes til å angi innrettede sekvenser. SAM- og BAM-formater er beskrevet i detalj på SAM Tools-nettstedet: samtools.sourceforge.net.

BAM-filer skrives til innrettingsmappen i `Data\Intensities\BaseCalls\Alignment` i filnavnformatet `SampleName_S#.bam`, der # er prøvetallet som bestemmes av hvilken rekkefølge prøvene har i prøvearket.

BAM-filer inneholder et overskriftsavsnitt og et innrettingsavsnitt.

- ▶ **Header** (Overskrift) – Inneholder informasjon om hele filen, som prøvenavn og prøvelengde. Innrettinger i innrettingsavsnittet er forbundet med spesifikk informasjon i overskriftsavsnittet.
- ▶ **Alignments** (Innrettinger) – Inneholder avlesingsnavn, avlesingssekvens, avlesingskvalitet og tilpassede faner.

Figur 20 Eksempel, BAM File Alignment Section

```
GA23_40:8:1:10271:11781 64 chr22 17552189 8 35M * 0 0
TACAGACATCCACCACCACCCCAGCTAATTTTTG
IIIII>FA?C::B=:GGGB>GGGEGIIIIHI3EEE#
BC:Z:ATCACG XD:Z:55 SM:I:8
```

Avlesingsnavnet inkluderer kromosomet og startkoordinat (**chr22 17552189**), innrettingskvalitet (**8**) og samsvarsindikatoren (**35M * 0 0**).

BAM-filer er egnet for visning med et eksternt visningsprogram som IGV eller UCSC Genome Browser.

VCF-filformat

VCF er et hyppig brukt filformat som er utviklet av det genomikkvitenskapelige samfunnet og inneholder informasjon om varianter som finnes på bestemte posisjoner i et referansegenom.

VCF-filer bruker filnavngivingsformatet `SampleName_S#.vcf`, der # er prøvenummeret som bestemt av rekkefølgen av prøvene som er oppført i prøvearket.

- ▶ **VCF-filoverskrift** – Inkluderer VCF-filformatversjonen og variantbetegnelserversjonen. Overskriften inneholder kommentarene som benyttes i resten av filen. Den siste linjen i overskriften er kolonneoverskrifter for datalinjer. Du finner mer informasjon under *VCF-filoverskrifter og kommentarer* på side 45.

Figur 21 Eksempel, VCF-filoverskrift

```
##fileformat=VCFv4.1
##FORMAT=<ID=GQX,Number=1,Type=Integer,Description="Minimum of
  {Genotype quality assuming variant position,Genotype quality
  assuming non-variant position}">
##FORMAT=<ID=GT,Number=1,Type=String,Description="Genotype">
##FORMAT=<ID=GQ,Number=1,Type=Float,Description="Genotype
  Quality">
##FORMAT=<ID=AD,Number=.,Type=Integer,Description="Allelic depths
  for the ref and alt alleles in the order listed">
##FORMAT=<ID=VF,Number=1,Type=Float,Description="Variant
  Frequency, the ratio of the sum of the called variant depth to
  the total depth">
##INFO=<ID=TI,Number=.,Type=String,Description="Transcript ID">
##INFO=<ID=GI,Number=.,Type=String,Description="Gene ID">
##INFO=<ID=EXON,Number=0,Type=Flag,Description="Exon Region">
##INFO=<ID=FC,Number=.,Type=String,Description="Functional
  Consequence">
##INFO=<ID=AC,Number=A,Type=Integer,Description="Allele count in
  genotypes, for each ALT allele, in the same order as listed">
##INFO=<ID=AF,Number=A,Type=Float,Description="Allele Frequency,
  for each ALT allele, in the same order as listed">
##INFO=<ID=AN,Number=1,Type=Integer,Description="Total number of
  alleles in called genotypes">
##INFO=<ID=DP,Number=1,Type=Integer,Description="Approximate read
  depth; some reads may have been filtered">
##FILTER=<ID=LowVariantFreq,Description="Low variant frequency <
  0.20">
##FILTER=<ID=LowGQ,Description="GQ below < 20.00">
##FILTER=<ID=LowQual,Description="QUAL below < 100.00">
##FILTER=<ID=R8,Description="IndelRepeatLength is greater than
  8">
##fileDate=20130506
##source=Starling 0.3
##phasing=none
#CHROM POS ID REF ALT QUAL FILTER INFO FORMAT
```

- ▶ **VCF-fildatalinjer** – Inneholder informasjon om en enkeltvariant. Datalinjer er oppført under kolonneoverskriftene som er inkludert i overskriften.

VCF-filoverskrifter og kommentarer

VCF-filformatet er fleksibelt og utvidbart. Følgende tabeller beskriver VCF-filoverskrifter og -kommentarer generert av MiSeq Reporter.

VCF-filoverskrifter

| Overskrift | Beskrivelse |
|------------|--|
| KROM | Kromosomet på referansegenomet Kromosomer vises i samme rekkefølge som referanse-FASTA-filen. |
| POS | Enkeltbaseposisjonen til varianten i referansekromosomet. I SNP-er er denne posisjonen referansebasen med varianten, i indeler eller slettinger er denne posisjonen referansebasen umiddelbart før varianten. |
| ID | rs-nummeret for SNP-en, 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. |
| ALT | Allelene som er forskjellige fra referanseavlesingen. Eksempel: en innsetting av en enkel T angis som referanse-A og alternativ A. |
| 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 feilfrekvens på 0,1 %. Mange variantbetegnere tildeler kvalitetsscorer basert på de tilhørende statistikkmodellene, som er høye i forhold til den observerte feilfrekvensen. |

VCF-filkommentarer

| Overskrift | Beskrivelse |
|------------|---|
| FILTER | Hvis alle filtrene godkjennes, blir PASS skrevet i filterkolonnen. <ul style="list-style-type: none"> • LowDP – Gjelder steder der dekningsdybden er under cut-off. • LowGQ – Genotypingkvaliteten (GQ) er under cut-off. • LowQual – Variantkvaliteten (QUAL) er under cut-off. • LowVariantFreq – Variantfrekvensen er lavere enn terskelen. • R8 – For en indel er antallet tilstøtende gjentakelser (1-base eller 2-base) i referansen større enn 8. |
| INFO | <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 • Exon – En kommaseparert liste over eksonregioner avlest fra RefGene. • FC – Funksjonell konsekvens. • GI – En kommaseparert liste over gen-ID-er avlest fra RefGene. • TI – En kommaseparert liste over transkripsjons-ID-er avlest fra RefGene. |

| Overskrift | Beskrivelse |
|------------|---|
| FORMAT | <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. • VF – Variantfrekvens, prosentandelen av avlesingene som støtter den alternative allelen. |
| PRØVE | I prøvekolonnen oppgis verdiene som angis i FORMAT-kolonnen. |

Fil for PCR-produktdekning

Én fil for PCR-produktdekning genereres for hvert manifest. M-tegnet i filnavnet angir manifestnummeret som er oppført i prøvearket.

Hver fil begynner med en overskriftsrad som inneholder prøve-ID-er forbundet med manifestet. Den første kolonnen inneholder mål-ID-ene. Hver ekstra kolonne lister opp dekningsdybden for den tilhørende prøve-ID-en.

Tilleggsutgangsfiler

Følgende utgangsfiler gir tilleggsinformasjon, eller oppsummerer kjøringsresultater og analysefeil. Selv om disse filene ikke er påkrevd for å vurdere analyseresultater, kan de brukes for feilsøkingsformål.

| Filnavn | Beskrivelse |
|---|---|
| AnalysisLog.txt | Behandlingslogg som beskriver hvert trinn som oppstod under analysen av gjeldende kjøringsmappe. Denne filen inneholder ingen feilmeldinger. Ligger på rotnivået i kjøringsmappen. |
| AnalysisError.txt | Behandlingsloggen som har opplistet eventuelle feil som har oppstått under analyse. Denne filen er kun til stede hvis det oppstår feil. Ligger på rotnivået i kjøringsmappen. |
| AmpliconRunStatistics.xml | Inneholder oppsummeringsstatistikk som er spesifikk for kjøringen. Ligger på rotnivået i kjøringsmappen. |
| CompletedJobInfo.xml | Skrevet etter at analysen er ferdig, inneholder informasjon om kjøringen, som dato, strømningscelle-ID, programvareversjon og andre parametre. Ligger på rotnivået i kjøringsmappen. |
| DemultiplexSummaryF1L1.txt | Rapporterer demultipleksingsresultater i en tabell med én rad per plate og én kolonne per prøve. Ligger i Data\Intensities\BaseCalls\Alignment. |
| ErrorsAndNoCallsByLaneTileReadCycle.csv | En fil med kommaseparerte verdier som inneholder prosentandelen av feil og manglende betegnelser for hver plate, avlesning og syklus. Ligger i Data\Intensities\BaseCalls\Alignment. |
| Mismatch.htm | Inneholder histogrammer over misforhold per syklus og ingen betegnelser per syklus for hver plate. Ligger i Data\Intensities\BaseCalls\Alignment. |
| Summary.xml | Inneholder en oppsummering av misforholdfrekvens og andre basebetegnelsesresultater. Ligger i Data\Intensities\BaseCalls\Alignment. |
| Summary.htm | Inneholder en oppsummeringsnettside, generert fra Summary.xml. Ligger i Data\Intensities\BaseCalls\Alignment. |

*

*.bam 43
*.bam.bai 43
*.vcf 44

A

analyse
 under sekvensering 2
analysemappe 9, 15
analyser 18
AnalysisError.txt 38
AnalysisLog.txt 38
arbeidsflyt
 MiSeqDx-programvare 2
 tilpasset amplikon 20
avlesningssykluser 9

B

BAM-filer
 filformat 43
BAM-indeksfiler 43

C

CF 139-variantanalyse 18

D

databaser, forhåndsinstallert 19
databehandlingskrav 34
datamappe 9
dbsnp-database 19
dekningsgraf 7
demultipleksing 14
depotbane 5, 36
DLSO 20
dokumentasjon 51

F

fasing, prefasing 13
FASTQ-filer 14
feilsøking
 filer kunne ikke kopieres 38
 loggfiler 38
 tjenesten starter ikke 38
filer kunne ikke kopieres 38

G

genombane 36
GI-gen-ID 45
GT-genotype 45

H

hjelp, teknisk 51

I

Ikoner, analysestatus 6
inndatafiler 19
innretting 14
installasjon, utenfor instrument 35
IP-adresse, MiSeq Reporter 3

K

kjøremappe
 forhold 15
kjøringsmappe
 om 4
Klinisk CF-sekvenseringsanalyse 18
klyngegraf 7
klyngepasseringsfilter 13
kopimappe 9
kundestøtte 51
kvalitetsscore 13

L

lav prosent-graf, høy prosent-graf 7
lisens (EULA) 34
logg på som en tjeneste 35
loggfiler 38
lokal sikkerhetspolicy 35
lokal systemkonto 36
Lokalvert 3
LowDP 45
LowGQ 45
LowVariantFreq 45

M

manifestfil 4, 9
MiSeqAnalysis-mappe 15
MiSeqDxCF139VariantAssay.txt 31
MiSeqDxCFClinicalSequencingAssay.txt
 31
MiSeqOutput-mappe 15
misforhold-graf 7

P

passeringsfilter (PF) 13
prøveark
 om 4
 redigering 11
prøvetabell 7

Q

Q-score 13
Qscore-graf 7

R

r8 45
redigere prøvearket 11

referansegenomer, forhåndsinstallert 19
refGene-database 19
RTAComplete.txt 19
RunInfo.xml 19

S

SAM-verktøy 43
SampleSheet.csv 19
sannsynlighet for feil 13
server-URL 5
sett 18
sette analyse i kø 6
sette analyse tilbake i kø 11-12
Smith-Waterman 14, 20

T

teknisk støtte 51
TI-avskrift-ID 45
tilpasset Amplicon-arbeidsflyt 20
tjenesten starter ikke 38

U

ULSO 20
Universalsett 1.0 18

V

variantscoregraf 7
varianttabell 7
VCF-filer
 filformat 44
 kommentarer 45
VF-variantfrekvens 45
vise MiSeq Reporter 3

W

Windows-service
 logg på som en tjeneste 38
Windows-tjeneste
 om 2

Teknisk hjelp

Kontakt Illuminas tekniske støtteavdeling for teknisk støtte.

Tabell 4 Generell kontaktinformasjon for Illumina

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

Tabell 5 Generell kontaktinformasjon for Illumina

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

Tabell 6 Telefonnumre til Illuminas kundestøtte

| Region | Kontaktnummer | Region | Kontaktnummer |
|--------------|----------------|---------------|-----------------|
| Nord-Amerika | 1.800.809.4566 | New Zealand | 0800.451.650 |
| Australia | 1.800.775.688 | Norge | 800.16836 |
| Belgia | 0800.81102 | Østerrike | 0800.296575 |
| Danmark | 80882346 | Spania | 900.812168 |
| Finland | 0800.918363 | Storbritannia | 90800.917.0041 |
| Frankrike | 0800.911850 | Sveits | 0800.563118 |
| Irland | 1.800.812949 | Sverige | 020790181 |
| Italia | 800.874909 | Tyskland | 0800.180.8994 |
| Nederland | 0800.0223859 | Andre land | +44.1799.534000 |

Sikkerhetsdatablad

Sikkerhetsdatablad er tilgjengelige på Illuminas nettsider på support.illumina.com/sds.html.

Produktdokumentasjon

Produktdokumentasjon i PDF er tilgjengelig for nedlasting fra Illumina-nettsidene. Gå til support.illumina.com, velg et produkt, og klikk deretter på **Documentation & Literature** (Dokumentasjon og litteratur).

