

# Модул за анализ Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx

## Ръководство за работния процес за MiSeqDx

ЗА ИНВИТРО ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА

Общ преглед	3
Въвеждане на информация за изпълняването	3
Методи за анализ	5
Преглед на изпълняването и резултатите	6
Отчет с резултати	6
Изходни файлове на анализ	7
Хронология на редакциите	11
Техническа помощ	12



Настоящият документ и съдържанието му са собственост на Illumina, Inc. и нейните филиали („Illumina“) и са предназначени само за употреба по силата на договор от страна на клиента и във връзка с използването на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ, и с никаква друга цел. Този документ и съдържанието му не трябва да се използват или разпространяват за никаква друга цел и/или по друг начин да бъдат съобщавани, разкривани или възпроизвеждани по какъвто и да е начин без предварителното писмено съгласие от страна на Illumina. Illumina не предоставя посредством този документ никакъв лиценз за свой патент, търговска марка, авторско право или права по силата на общото право, нито подобни права на която и да е трета страна.

Инструкциите в този документ трябва да се следват строго и изрично от страна на квалифициран и правилно обучен персонал, за да се гарантират правилната и безопасната употреба на продукта(ите), описан(и) в настоящия документ. Цялото съдържание на този документ трябва да бъде прочетено и разбрано напълно, преди да се използва(т) такъв(таква) продукт(и).

АКО ВСИЧКИ ИНСТРУКЦИИ, СЪДЪРЖАЩИ СЕ В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ, НЕ БЪДАТ НАПЪЛНО ПРОЧЕТИ И ИЗРИЧНО СПАЗВАНИ, ТОВА МОЖЕ ДА ДОВЕДЕ ДО ПОВРЕДА НА ПРОДУКТ(ИТЕ), НАРАНЯВАНЕ НА ЛИЦАТА, ВКЛЮЧИТЕЛНО НА ПОТРЕБИТЕЛИТЕ ИЛИ ДРУГИ ЛИЦА, И УВРЕЖДАНЕ НА ДРУГО ИМУЩЕСТВО, И ЩЕ ОТМЕНИ ВСЯКАКВА ГАРАНЦИЯ, ПРИЛОЖИМА ЗА ПРОДУКТ(ИТЕ).

ILLUMINA НЕ ПОЕМА НИКАКВА ОТГОВОРНОСТ В РЕЗУЛТАТ НА НЕПРАВИЛНАТА УПОТРЕБА НА ПРОДУКТА (ИТЕ), ОПИСАН(И) В НАСТОЯЩИЯ ДОКУМЕНТ (ВКЛЮЧИТЕЛНО ТЕХНИ ЧАСТИ ИЛИ СОФТУЕР).

© 2022 Illumina, Inc. Всички права запазени.

Всички търговски марки са собственост на Illumina, Inc. или съответните им притежатели. За специфична информация относно търговските марки посетете [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Общ преглед

Модулът Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx първо демултиплексира индексираният разчитания. Ако е налице, DNA GenerateFASTQ Dx генерира междинни изходни файлове във файловия формат FASTQ и след това излиза от работния процес. Не се извършва подравняване или допълнителен анализ. FASTQ файловете са необходими входни данни за анализ с инструменти за анализ на трети страни.

Модулът Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx може да бъде изпълняван на Local Run Manager v3.1.0 (или по-късен) и е съвместим с Windows 10. Модулът за анализ поддържа секвениране за анализиране за анализ Illumina DNA Prep With Enrichment Dx.

## За това ръководство

Това ръководство предоставя инструкции за настройка на параметри на изпълняване на секвениране и анализ за модула DNA GenerateFASTQ Dx. Използването на софтуера изисква основни познания за текущата операционна система Windows и потребителски интерфейс, базиран на уеб браузър. За информация относно таблото за управление на Local Run Manager и системните настройки направете справка с Local Run Manager Software Reference Guide for MiSeqDx (*Справочно ръководство за софтуера Local Run Manager за MiSeqDx*) (документ № 200003931).

## Въвеждане на информация за изпълняването

### Задаване на параметри

- 1 Влезте в Local Run Manager.
- 2 Изберете **Create Run** (Създаване на изпълняване) и след това изберете **DNA GenerateFASTQ Dx**.
- 3 Въведете уникално име на изпълняването, което идентифицира изпълняването от секвенирането до анализа (40 знака или по-малко).  
Името на изпълняването може да съдържа буквено-цифрови знаци, интервали и специални знаци ``.~!@#%$_-_{}`. Не можете да използвате име от предишно изпълняване.
- 4 **[Незадължително]** Въведете описание на изпълняването, за да подпомогнете идентифицирането на изпълняването (150 знака или по-малко).  
Описанието на изпълняването може да съдържа буквено-цифрови знаци, интервали и следните специални знаци:  
``.~!@#%$_-_{}`.
- 5 Конфигуриране на следните настройки на изпълняване:
  - ▶ Индексна плака – Изберете подредбата на индексната плака, използвана по време на подготовката на библиотеката. Може да изберете от Index Set A (Индексен комплект A), Index Set B (Индексен комплект B) и Index Set AB (Индексен комплект AB). Направете справка с *Illumina DNA Prep With Enrichment Dx Package Insert* (Листовка на Illumina DNA Prep With Enrichment Dx) за информация за подредба на индексна плака.  
Индексни комплекти A и B съдържат 96 проби и съответните уникални двойни праймери (UDP). Индексен комплект AB съдържа 192 проби и съответните UDP.
  - ▶ Read Type (Тип разчитане) – единично разчитане или със сдвояване на краища. Типът разчитане по подразбиране е със сдвояване на краища.

- ▶ **Read Lengths** (Дължини на разчитане) – Въведете дължината на разчитането. Дължината на разчитане по подразбиране е 151.
- 6 Под **Module-Specific Settings** (Специфични за модула настройки) задайте опцията **Adapter Trimming** (Изрязване на адаптера).  
Изрязване на адаптера е активирано по подразбиране.
- 7 Изберете броя проби за секвениране. Избраният брой проби включва автоматично попълнени UDP препоръки. Ако не искате да използвате UDP препоръки, изберете **Custom** (Персонализирано).  
Ако броят проби, които секвенирате, не е включен в падащия списък, изберете най-близкия брой проби. Уверете се, че избраният номер е по-малък от номера, който се секвенира, и за да добавите допълнителни UDP, ако е необходимо. Например, за да изследвате 18 проби, изберете опцията с 16 проби.

## Посочване на проби за изпълняването

Посочете пробите за изпълнение чрез една от опциите по-долу.

- ▶ **Enter samples manually** (Ръчно въвеждане на пробите) – Използвайте празната таблица на екрана **Create Run** (Създаване на изпълняване).
- ▶ **Import samples** (Импортиране на проби) – Посочете път до външен файл във формат със стойности, разделени със запетая (\*.csv). На екрана **Create Run** (Създаване на изпълняване) се предлага шаблон за изтегляне.

## Ръчно въвеждане на пробите

- 1 Въведете уникален ИД на пробата в раздела **Sample ID** (ИД на пробата). Използвайте буквено-цифрови знаци и/или тирета (40 знака или по-малко).  
Идентификаторът на пробата и съответното описание на пробата и позицията на UDP са маркирани в синьо, за да се покаже, че пробата е въведена.
- 2 **[Незадължително]** За да изберете положителни и отрицателни контролни проби, щракнете с десния бутон върху ямките за проби.
- 3 **[Незадължително]** Въведете описание на пробата в раздела **Description** (Описание) на пробата. Примерното описание може да съдържа буквено-цифрови знаци, точки и специални знаци `~!@#%\$\_-\_{}`. Интервалите не са разрешени.  
Ако идентификаторът на пробата, свързан с описанието на пробата, се използва отново в по-късен цикъл, първоначалното описание на пробата се презаписва.
- 4 Променете препоръчителните UDP позиции според нуждите. Предложените позиции на ямките за проби са подчертани в жълто, лилаво, оранжево и розово.  
Ако се използват предложени ямки за проби, софтуерът автоматично попълва UDP индексни адаптери, които отговарят на разнообразните индексни изисквания. Ако избраният от вас брой проби не е точният брой проби, които тествате, уверете се, че сте избрали UDP индексни адаптери за допълнителните ямки.
- 5 **[Незадължително]** Изберете **Export Samples** (Експортиране на проби) за експортиране на информация за проба към файл.
- 6 Изберете **Save Run** (Записване на изпълняване).

## Импортиране на бланка за проба

Можете да импортирате информация за проба от файл с информация за проба, експортиран преди това от модула DNA GenerateFASTQ Dx, като използвате функцията Export Samples (Експортиране на проби) или шаблонен файл, който може да бъде генериран чрез избиране на **Template** (Шаблон) на екрана Create Run (Създаване на изпълняване). Вижте *Ръчно въвеждане на пробите на страница 4* за инструкции как да създадете и експортирате информация за проба. Шаблонният файл не включва автоматично попълнените UDP препоръки.

За да редактирате шаблонния файл:

- 1 Изберете **Template** (Шаблон) от екрана Create Run (Създаване на изпълняване), за да направите нова подредба на плаките. Файлът с шаблона съдържа правилните заглавия на колони за импортиране. Редактирайте файла, както следва.
  - a Отворете лист за пробата в текстов редактор.
  - b Въведете необходимата информация за пробата.
  - c Запазете файла във формат със стойности, разделени със запетая (\*.csv). Уверете се, че идентификаторите за пробата са уникални.

За да импортирате информация за проба:

- 2 Изберете **Import Samples** (Импортиране на проби) и след това изберете CSV файла.
- 3 **[Незадължително]** Изберете **Export** (Експортиране) за експортиране на информация за проба към външен файл.
- 4 Изберете **Save Run** (Записване на изпълняване).

## Редактиране на изпълняване

За инструкции за редактиране на информацията във вашето изпълняване преди секвениране направете справка с *Local Run Manager Software Reference Guide for MiSeqDx (Справочно ръководство на софтуера Local Run Manager за MiSeqDx) (документ № 200003931)*.

## Методи за анализ

Модулът на анализ DNA GenerateFASTQ Dx изпълнява следните стъпки за анализ и след това записва изходните файлове на анализа в папката Alignment (Подравняване).

- ▶ Демултиплексиране на индексни разчитания
- ▶ Генериране на FASTQ файлове

## Демултиплексиране

Демултиплексирането сравнява всяка последователност от индексни разчитания с индексните последователности, специфични за изпълняването. В тази стъпка не се вземат предвид никакви стойности на качеството.

Индексните разчитания се идентифицират чрез следните стъпки:

- ▶ Пробите се номерират, започвайки от 1, в зависимост от последователността, в която са изброени за изпълняването.
- ▶ Номер на проба 0 е запазен за клъстери, които не са били зададени в проба.

- ▶ Клъстерите се задават към проба, когато индексната последователност съвпада точно или когато има единично несъвпадение на индексно разчитане.

## Генериране на FASTQ файл

След демултиплексиране софтуерът генерира междинни файлове за анализ във формат FASTQ, който е текстов формат, използван за представяне на последователности. FASTQ файловете съдържат разчитания за всяка проба и свързаните с тях резултати за качество. Всякакви контроли, използвани за изпълняването и клъстерите, които не са преминали филтри, са изключени.

Всеки FASTQ файл съдържа разчитания само за една проба и името на тази проба е включено в името на FASTQ файла. FASTQ файловете са основната входна информация за подравняване.

## Преглед на изпълняването и резултатите

- 1 От таблото за управление на Local Run Manager изберете името на изпълняването.
- 2 От раздела Run Overview (Общ преглед на изпълняването) прегледайте показателите за изпълняване на секвенирането.
- 3 За да промените местоположението на файла с данните от анализа за бъдещи повторни нареждания на опашката на избраното изпълняване, изберете иконата **Edit** (Редактиране) и редактирайте пътеката на файла от изходната папка с изпълняването. Не можете да редактирате името на папката за изпълнение на изхода.
- 4 **[Незадължително]** Изберете **Copy to Clipboard** (Копиране в клипборда) за копиране на пътя до файла за изходната папка за изпълняване.
- 5 Изберете раздела Sequencing Information (Информация за секвениране), за да прегледате параметрите на изпълняване и информацията за консумативите.
- 6 Изберете раздела Samples & Results (Проби и резултати), за да прегледате анализа от отчет.
  - ▶ Ако анализът е поставен повторно, изберете подходящия анализ от падащия списък Select Analysis (Избор на анализ).
  - ▶ От лявата лента за навигация изберете идентификатора на проба, за да видите отчета за друга проба.
- 7 **[Незадължително]** Изберете **Copy to Clipboard** (Копиране в клипборда) за копиране на пътя на файла от папката за анализ.

## Отчет с резултати

Резултатите са обобщени в раздел Проби и резултати.

## Проби

Таблица 1 Таблица с проби

Заглавие на колона	Описание
Sample ID (ИД на проба)	ИД на пробата, предоставен при създаването на изпълняването.
Плака	Плаката, предоставена с индексната плака при създаването на серията. Колоната се показва само ако е избрана индексната плака АВ.
Индексна ямка	Индексната ямка, предоставена с местоположението на ямката с проба, когато е създадено изпълняването.
Описание	Описание на пробата, предоставено, когато изпълняването е създадено.
UDP	UDP, използван с пробата.
Контрола	Положителната или отрицателната контрола, използвана с пробата.

## Индексиране

Таблица 2 Таблица за индексиране

Заглавие на колона	Описание
Индексен номер	Назначен идентификатор, основан на подредбата, в която пробите са посочени в таблицата с проби.
Sample ID (ИД на проба)	ИД на пробата, предоставен при създаването на изпълняването.
UDP	UDP, използван с пробата.
% идентифицирани разчитания (PF)	Процентът на разчитанията, преминали през филтрите.

## Изходни файлове на анализ

Следните изходни файлове за анализ се генерират за модула за анализ DNA GenerateFASTQ Dx.

Име на файла	Описание
Демултиплексиране (*.demux)	Междинни файлове, които съдържат резултати за демултиплексирането.
FASTQ (*.fastq.gz)	Междинни файлове, които съдържат обозначавания на бази с резултат за качество. FASTQ файловете са основната входна информация за стъпката на подравняване.

## Файлов формат за демултиплексиране

Процесът на демултиплексиране разчита индексната последователност, прикрепена към всеки клъстер, за да се определи от коя проба произхожда клъстерът. Съпоставянето между клъстери и номер на проба се записва във файл на демултиплексиране (\*.demux) за всяка плочка на поточната клетка.

Форматът за името на файла за демултиплексиране е **s\_1\_X.demux**, където X е номерът на плочката.

Файловете за демултиплексиране започват с горен колонтитул:

- ▶ Версия (4 байта целочислени типове данни), в момента 1
- ▶ Брой клъстери (4 байта целочислени типове данни)

Останалата част от файла се състои от номера на проби за всеки клъстер от плочката. Когато стъпката за демултиплексиране е завършена, софтуерът ще създаде файл на демултиплексиране, наименуван **DemultiplexSummaryF1L1.txt**.

- ▶ **F1** представлява номера на поточната клетка в името на файла.
- ▶ **L1** представлява номера на линията в името на файла.
- ▶ Демултиплексирането завършва с таблица с един ред на плочка и една колона на проба, включително проба 0.
- ▶ Най-често срещаните секвенции в индексни разчитания.

## Файлов формат FASTQ

FASTQ е текстово-базиран файлов формат, който съдържа обозначавания на бази и стойности на качеството на едно разчитане. Всеки запис съдържа 4 линии:

- ▶ Идентификаторът
- ▶ Последователността
- ▶ Знак плюс (+)
- ▶ Резултатът за качество Phred се оценява в кодиран формат ASCII + 33

Идентификаторът е представен във формат:

**@Инструмент:Идентификатор на изпълняването:Идентификатор на поточна клетка:Линия:Плочка:X:Y Номер разчитане:Флаг за филтър:0:Номер на проба**

Пример:

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

## Допълнителни изходни файлове

Следните изходни файлове осигуряват допълнителна информация или обобщават резултатите от изпълняванията и грешки в анализа. Въпреки че тези файлове не са необходими за оценяване на резултатите от анализа, те могат да се използват за целите на отстраняване на неизправности. Всички файлове се намират в папката Alignment (Подравняване), освен ако не е посочено друго.

Име на файла	Описание
<b>AdapterTrimming.txt</b>	Показва броя на подрязаните бази и процента на базите за всяка плака. Този файл присъства само ако изрязването на адаптера е посочено за изпълняването.
<b>AnalysisLog.txt</b>	Хронология на обработването, която описва всяка стъпка, която се е случила по време на анализа на сегашната папка за изпълнявания. Файлът не съдържа съобщения за грешки. Намира се в основното ниво на папката за изпълняване.



Име на файла	Описание
<b>AnalysisError.txt</b>	Хронология на обработването, която изброява всякакви грешки, които са се случили по време на анализа. Този файл ще бъде празен, ако не са настъпили никакви грешки. Намира се в основното ниво на папката за изпълняване.
<b>CompletedJobInfo.xml</b>	Написан след приключване на анализа, съдържа информация за цикъла, като дата, идентификатор на проточна клетка, версия на софтуера и други параметри. Намира се в основното ниво на папката за изпълняване.
<b>Checksum.csv</b>	Съдържа имената на файловете и уникалните стойности на контролна сума за определени и неопределени FASTQ файлове, BCL файлове и файла <b>SampleSheetUsed.csv</b> .
<b>DemultiplexSummaryF1L1.txt</b>	Отчита резултати от демултиплексирането в таблица с 1 ред на плочка и 1 колона на проба.
<b>GenerateFASTQRunStatistics.xml</b>	Съдържа обобщаващи статистики, специфични за изпълняването. Намира се в основното ниво на папката за изпълняване.

## Папка Analysis (Анализ)

Папката Analysis (Анализ) съдържа файловете, генерирани от софтуера Local Run Manager. Връзката между изходната папка и папката Analysis (Анализ) е обобщена, както следва:

- ▶ По време на секвенирането анализът в реално време (RTA) попълва изходна папка с файловете, генерирани по време на анализа на изображения, обозначаване на бази и резултати за качество.
- ▶ RTA копира файлове в папката Analysis (Анализ) в реално време. След като RTA назначи резултат за качеството за всяка база за всеки цикъл, софтуерът записва файла RTAComplete.xml и в двете папки.
- ▶ Когато файлът RTAComplete.xml е наличен, анализът започва.
- ▶ Докато анализът продължава, Local Run Manager записва изходните файлове в папката Analysis (Анализ) и след това копира файловете обратно в изходната папка.

## Папки Alignment (Подравняване)

Всеки път, когато анализът се нарежда отново на опашката, Local Run Manager създава папка Alignment (Подравняване) с име **Alignment\_N**, където N е пореден номер.

## Структура на папката

### Данни

### Alignment\_## или Alignment\_Imported\_##

#### [Клеймо за време на изпълняване]

#### DataAccessFiles

#### Fastq

FastqSummaryF1L1.txt

Sample1\_S1\_L001\_R1\_001.fastq.gz

Sample2\_S2\_L001\_R2\_001.fastq.gz

Undetermined\_S0\_L001\_R1\_001.fastq.gz

- 📁 Undetermined\_S0\_L001\_R2\_001.fastq.gz
- 📁 **Регистриране**
  - 📁 BuildFastq0.stdout.txt
  - 📁 BuildFastq1.stdout.txt
  - 📁 commands.txt
- 📁 **Графики**
  - 📁 AdapterCounts.txt
  - 📁 AdapterTrimming.txt
  - 📁 AnalysisError.txt
  - 📁 AnalysisLog.txt
  - 📁 Checkpoint.txt
  - 📁 Checksum.csv
  - 📁 CompletedJobInfo.xml
  - 📁 DemultiplexSummaryF1L1.txt
  - 📁 GenerateFASTQRunStatistics.xml
  - 📁 SampleSheetUsed.csv

## Обозначаване на бази и разнообразие на индекси

Когато пробите се секвенират на инструмента MiSeqDx, обозначаването на базите определя база (A, C, G или T) за всеки клъстър на дадена плочка или изобразявана област на поточната клетка в специфичен цикъл. Инструментът MiSeqDx използва четириканално секвениране, което изисква четири изображения за кодиране на данните за четири ДНК бази, две от червения канал и две от зеления канал.

Процесът за индексни разчитания на обозначаване с база се различава от обозначаването на бази по време на други разчитания.

Когато се избират индекси по време на създаването на изпълняване, предупреждение за ниско разнообразие ще се появи, ако индексите не отговарят на изискванията за разнообразие. За да предотвратите предупреждението за ниско разнообразие, изберете индексни последователности, които осигуряват сигнал и в двата канала за всеки цикъл.

- ▶ Червен канал – A или C
- ▶ Зелен канал – G или T

Този процес на обозначаване на бази обезпечава точността, когато се анализират малкоплексни проби. За повече информация относно секвенциите на вашите индекси направете справка с *Illumina DNA Prep With Enrichment Dx Package Insert* (Листовка на Illumina DNA Prep With Enrichment Dx).

По време на създаването на изпълняване в Local Run Manager ще изберете броя на пробите, които ще бъдат изследвани. Предложените индексни комбинации, които отговарят на изискванията за индексно разнообразие, се попълват автоматично от софтуера. Въпреки че не е задължително да използвате предложените UDP индексни комбинации, това е препоръчително.

## Хронология на редакциите

Документ	Дата	Описание на промяната
Документ № 200015661 v01	Май 2022 г.	Добавен адрес на австралийския спонсор. Изяснено ограничение на описание на проба.
Документ № 200015661 v00	Февруари 2022 г.	Първоначална версия

## Техническа помощ

За техническа помощ се свържете с отдела за техническа поддръжка на Illumina.

Уеб сайт: [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
Имейл: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

Телефонни номера на отдела за техническа поддръжка на Illumina

Регион	Безплатен	Регионален
Северна Америка	+1.800.809.4566	
Австралия	+1.800.775.688	
Австрия	+43 800006249	+43 19286540
Белгия	+32 80077160	+32 34002973
Германия	+49 8001014940	+49 8938035677
Дания	+45 80820183	+45 89871156
Ирландия	+353 1800936608	+353 016950506
Испания	+34 911899417	+34 800300143
Италия	+39 800985513	+39 236003759
Китай	400.066.5835	
Нидерландия	+31 8000222493	+31 207132960
Нова Зеландия	0800.451.650	
Норвегия	+47 800 16836	+47 21939693
Обединеното кралство	+44 8000126019	+44 2073057197
Сингапур	+1.800.579.2745	
Тайван, Китай	00806651752	
Финландия	+358 800918363	+358 974790110
Франция	+33 805102193	+33 170770446
Хонконг, Китай	800960230	
Швейцария	+41 565800000	+41 800200442
Швеция	+46 850619671	+46 200883979
Южна Корея	+82 80 234 5300	
Япония	0800.111.5011	
Други държави	+44.1799.534000	

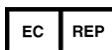
Информационни листове за безопасност (ИЛБ) – налични на уеб сайта на Illumina на адрес [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

Документация на продукта – налична за изтегляне от [support.illumina.com](http://support.illumina.com).



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California 92122, САЩ  
+1.800.809.ILMN (4566)  
+1.858.202.4566 (извън Северна Америка)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com

CE



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

**Спонсор в Австралия**  
Illumina Australia Pty Ltd  
Nursing Association Building  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Австралия

ЗА ИНВИТРО ДИАГНОСТИЧНА УПОТРЕБА

© 2022 г. Illumina, Inc. Всички права запазени.

**illumina**<sup>®</sup>