

# Applied Biosystems Variant Reporter™ ソフトウェア v1.0

## リファレンス配列を指定する解析手順

このクイックリファレンスカードはApplied Biosystems Variant Reporter™ ソフトウェア v1.0でリファレンス配列を指定する場合のプロジェクトを作成する手順を要約しています。このワークフローを使用して、シーケンスサンプルファイルを解析し、個々の変異を同定します。

Variant Reporter™ ソフトウェア v1.0の総合的な情報に関しては、以下をご覧ください。

- ・ Variant Reporter™ ソフトウェアオンラインヘルプ及びFAQ
- ・ Variant Reporter™ ソフトウェア Getting Started Guide

### 解析前のワークフロー

The screenshot displays the software interface with the following components and annotations:

- Project View (Left Panel):**
  - Setup:** Import and Manage Traces, Set Analysis Parameters, Define Reference, Define Project Details.
  - Analyze:** (Highlighted in green)
  - Log:**
  - Quality Control:** Project Quality Summary, Trace Quality Review.
  - Results:** Project Results Summary, Amplicon Overview, Variant Review.
  - Report:** (Highlighted in blue)
- Import and Manage Traces (Top):** Import, Remove, Exclude, Include, Auto Assign.
- Amplicon and Specimen Trace Grid (Main Area):**

	con1	con2
Specimen2	2	2
Specimen5	2	2
Specimen6	2	2

**Annotations:**

- 1** データをインポートし、PCR増幅産物別に割り当てる
- 2** プロジェクトにおけるリファレンス配列の設定
- 3** プロジェクトの解析

## リファレンス配列を用いたプロジェクトのセットアップ

### サンプルファイルのインポート

Variant Reporter™ソフトウェアにシーケンスサンプルファイルをインポートする手順

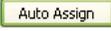
1. Dashboard画面でアプリケーションツールバーのNewをクリックし、プロジェクトを作成します。
2. プロジェクトビュー画面でタスクアクションツールバーの  をクリックします。
3. Import Tracesダイアログボックスで、インポートするサンプルファイルを含むフォルダか、ファイルを選択します。次に  をクリックします。
4. シーケンスサンプルファイルがImport Tracesダイアログボックスの中のTraces To Addボックスに表示されたことを確認し、OKをクリックします。
5. サンプルファイルの分類方法を選択する画面が開きます。

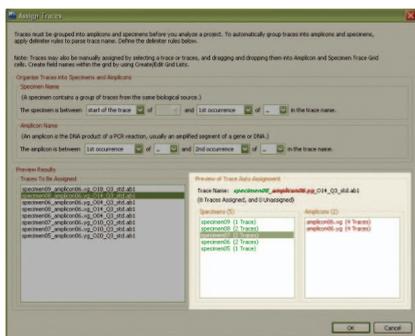
**注:** 直接、シーケンスサンプルファイルをドラッグしてVariant Reporter™ソフトウェアにインポートすることも可能です。移動元のフォルダまたはファイルを開き、Project View画面のImport and Manage Tracesウィンドウへシーケンスサンプルファイルをドラッグします。

### サンプルファイルの割り当て

インポートされたサンプルファイルは検体とPCR増幅産物で分類します。(Amplicon:PCR増幅産物、Specimen: 検体)

インポートされたサンプルファイルを割り当てる手順

1.  をクリックするとAssign Traces画面が開きます。
2. Find Specimen Nameウィンドウで適切な区切り文字( . , \_ , - )を選択してシーケンスサンプルファイル名から検体名を抽出します。
3. Find Amplicon Nameウィンドウで適切な区切り文字を選択してシーケンスサンプルファイル名からPCR増幅産物名を抽出します。
4. 選択した区切り文字で、検体名とPCR増幅産物名がPreview Trace Auto Assignmentウィンドウに正しく表示されることを確認します(下図参照)。



5. OKをクリックします。

**注:** シーケンスサンプルファイル名にPCR増幅産物名と検体名の両方を含まない場合、 をクリックして、AmpliconとSpecimen Trace Gridを作成します。

### 解析パラメータの設定(任意)

1. Set Analysis Parameters画面を開き、次にそれぞれの解析パラメータについてのセクションを展開します。
2. ベースコールパラメータは以下の初期設定を使用するか、必要に応じて変更します。
  - Mobility File : **Use Mobility File from Trace**
  - Mixed Base Threshold : **25%**
  - Analyzed Data Scaling : **True Profile**
3. トリミングパラメータは以下の初期設定を使用するか、必要に応じて変更します。
  - **Trim Using Quality Values**
  - **Mask M13 universal sequencing primers to exclude M13 primers from the clear range**
  - **Mask amplicon primers to exclude amplicon primer sequences from the clear range**
4. フィルタリングパラメータは以下の初期設定を使用するか、必要に応じて変更します。
  - **Filter traces with a minimum Trace Score < 25**
  - **Filter traces with a median PUP Score < 4**
  - **Filter traces with % Expected TRL < 50%**

**注:** セクションを展開すると、それぞれの解析パラメータの初期設定を変更することが可能です。また、 をクリックし、いつでも推奨設定値に戻すことができます。

その他の方法として、開いているプロジェクトへこれまでに保存された解析パラメータ・ファイルを直接ロードすることができます。保存された解析パラメータのリストはDashboardに表示されます。

### プロジェクトにおけるリファレンス配列の設定

リファレンス配列を用意していない場合は、Variant Reporter™ソフトウェア「リファレンス配列を自動作成する解析手順QR」をご参照ください。

リファレンスとする塩基配列を読み込む手順

1. Define Reference画面を開き、タスクアクションツールバーの  をクリックします。
2. Import Referenceダイアログボックスで **New Reference Name** にリファレンス配列の名前を入力します。

3. **Import Reference from File**を選択し、インポートするリファレンスファイル(ファイル型式: .vrr, .fsta, .fasta, .txt, .seq, .ab1, .gb, .rdg.ctf)をブラウズします。

4. ファイルを選択し、**Open**をクリックし、次に**Finish**をクリックします。

**注:** プロジェクトにリファレンス配列をインポートする際、引き続き**Next**をクリックし、プライマー配列(.txt, .primer)や既知の多型情報(.txt, .variant)ファイルをImport Referenceダイアログボックスへインポートすることができます。

### PCR増幅産物の指定(任意)

プライマーシーケンスをインポートし、リファレンス配列に対して位置合わせします。

1. Define Reference画面で

 **Amplicon Primers/Known Variants** をクリックし、ドロップダウンリストからAdd/Edit Primer Sequencesを選択します。

2. **Add/Edit Primer Sequences**ダイアログボックスで**Import**をクリックします。

3. ブラウズしてインポートする .txtや .primerファイルを選択し、**Open**をクリックします。

**注:** Amplicon名がインポートされたシーケンスサンプルファイル名から抽出したPCR増幅産物名と確実に一致するようにします。

4. **Align**をクリックします。

5. 読み込まれたプライマーシーケンスファイルがAlignmentカラムにYesと表示されていることを確認し、次に**OK**をクリックします。

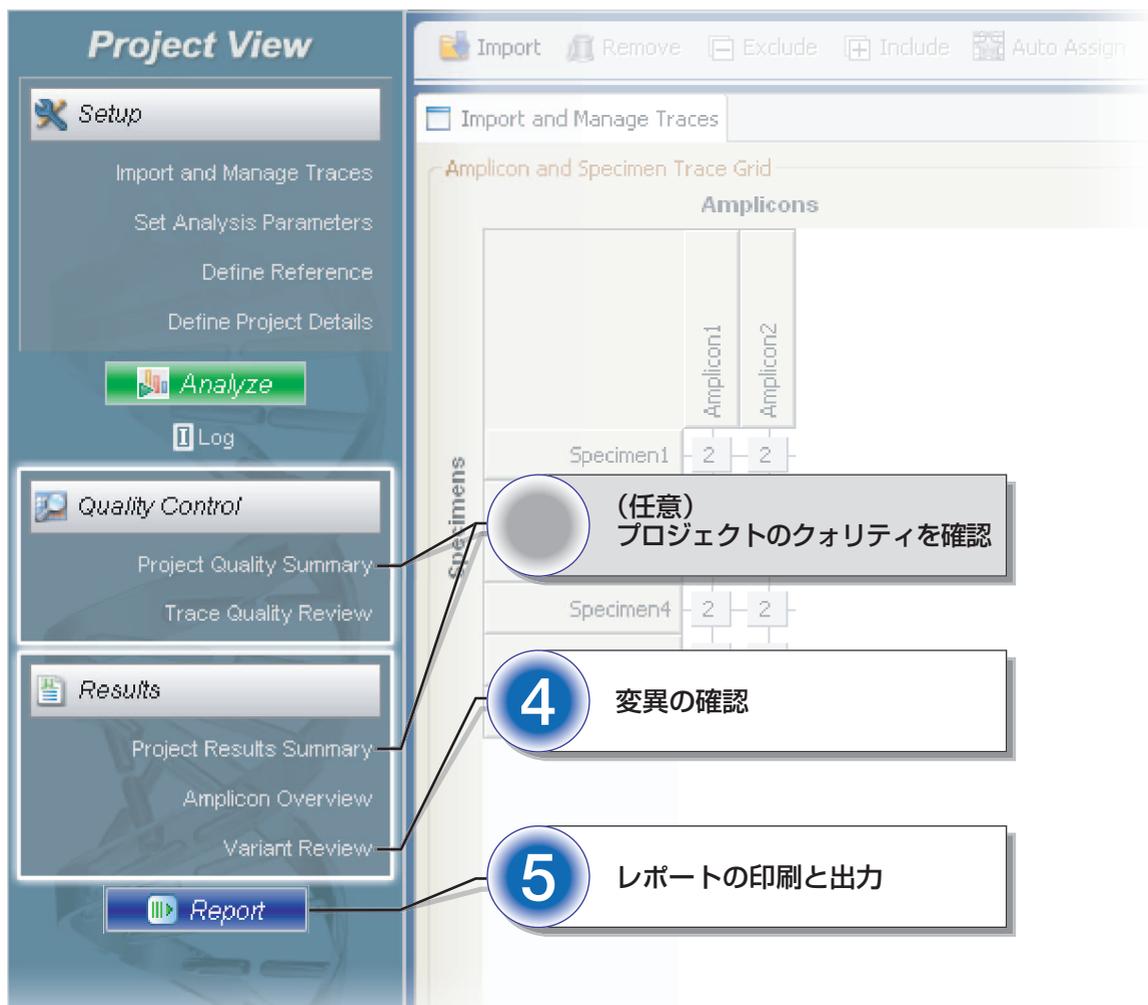
6. PCR増幅産物の図式がDefine Reference画面のReference Visualウィンドウに表示されていることを確認します。

7.  **Copy To Dashboard** をクリックし、リファレンス配列を今後も使用できるように保存します。

### プロジェクトの解析

プロジェクトのデータを解析するために、 **Analyze** をクリックします。ソフトウェアは変異を検出するためにデータ解析処理を行います。

### 解析後のワークフロー



**Project View**

- Setup
  - Import and Manage Traces
  - Set Analysis Parameters
  - Define Reference
  - Define Project Details
  - Analyze**
  - Log
- Quality Control
  - Project Quality Summary
  - Trace Quality Review
- Results
  - Project Results Summary
  - Amplicon Overview
  - Variant Review
- Report

**Amplicon and Specimen Trace Grid**

Specimens	Amplicons	
	Amplicon1	Amplicon2
Specimen1	2	2
Specimen4	2	2

Callouts:

- (任意) プロジェクトのクォリティを確認
- 4 変異の確認
- 5 レポートの印刷と出力

## プロジェクトのクオリティを確認(任意)

プロジェクトを解析した後は、シーケンスデータの結果を確認、変異の編集、レポートの印刷、もしくはプロジェクトを出力することが可能です。

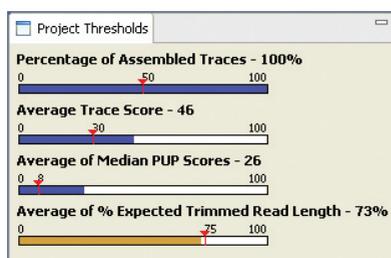
Variant Reporter™ソフトウェアのプロジェクトが全てのクオリティの閾値(Analysis Parameters上で設定します)を満たす場合、Project Results Summary画面が開かれます。

Variant Reporter™ソフトウェアのプロジェクトが設定されたいくつかのクオリティの閾値を満たさない場合はProject Quality Summary画面が開かれます。この画面では、プロジェクトのレベルで失敗した部分をトラブルシューティングすることができます。

**注:**シーケンスサンプルファイルのレベルで失敗したプロジェクトをトラブルシューティングするには、Project Quality Statisticsウィンドウで失敗したシーケンスサンプルファイルの数字をクリックするか、またはTrace Quality Review画面を開きます。

### プロジェクトの閾値の検討

プロジェクトの閾値に関する結果は、Project Quality Summary画面のProject Thresholdsウィンドウを確認します。



### Amplicon Specimen Quality Gridの検討

プロジェクト内の全ての検体とPCR増幅産物のクオリティを決定するには、Amplicon Specimen Quality Gridを表示し、以下の測定基準値について確認します。

- All
- Avg. Trace Score
- Avg. of Median PUP
- Avg. CRL
- Avg. TRL
- Avg % Exp. TRL
- Avg Signal Strength

**注:**測定基準のいくつかを検討する際、シーケンスのフォワード鎖、フォワード鎖とリバース鎖、リバース鎖の何れかでフィルタをかけて表示することができます。

## 変異の確認と編集

### 変異の確認

Variant Review画面では、ソフトウェアが解析をして検出した全ての変異をPCR増幅産物毎に一覧にします。擬陽性の変異検出についてのフィルタを調整するには、Variant Score Thresholdの設定を変更します。

1. Variant Score Threshold をクリックします。
2. スライダーを0(疑陽性)と20(疑陰性)の間でドラッグして閾値を再セットします。  
**注:** 閾値を動かすと、確認する変異の数が増減します。
3. 適切な値に設定した後、OKをクリックします。

Amplicon Variantsテーブルで変異を選択して、Specimen Variantsウィンドウに全ての検体のジェノタイプが表示されていることを確認します。検体のジェノタイプを承認するか、または否認することによって、自動的に関連する変異の承認・否認も行われます。

選択したジェノタイプを承認(accept)するか、または否認(reject)する場合

1. Specimen Variantsテーブルで承認、または否認する検体をいくつかクリックします。
2. + をクリックして選択した検体のジェノタイプを承認するか、× をクリックして選択した検体のジェノタイプを否認します。

全ての検体のジェノタイプを承認(accept)するか、または否認(reject)する場合

1. Specimen Variantsテーブルで以下をクリックします。
2. すべて をクリックすると全ての検体のジェノタイプが一度に承認され、また すべてを拒否 をクリックすると全ての検体のジェノタイプが一度に否認されます。

Amplicon Variantsテーブルは以下の状態の1つに自動的にアップデートされます。

- Yes (全てのジェノタイプが確認済み)
- Partial (いくつかのジェノタイプが確認済み)
- No (ジェノタイプは全く確認していない)

Positions Of Interest(POI)テーブルはPCR増幅産物毎にソフトウェアが解析をして検出した全てのPOIを表示します。

POIテーブルは以下の何れかの検出基準によってフィルタをかけることができます。

- QV
- Mixed Bases
- Discrepancy
- User Edit
- Variant
- Potential Variant

注: Potential VariantはVariant Score Thresholdで閾値の変更により信頼度を下回った変異です。

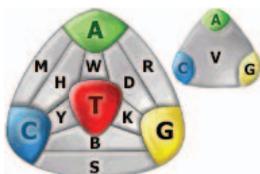
## 変異の編集

塩基を編集する場合

1. Variant Review画面でTrace Segmentウィンドウを確認します。
2. Snippet Visual(小窓)でConsensus Sequenceのハイライトされた変異塩基を選択します。



3. 混合塩基についてはIUBコードを使用して新しい塩基の文字を入力し、読まれた塩基の文字を編集します。



4. Base Edit ResultsダイアログボックスのOKをクリックし、置換を確定します。

塩基を挿入する場合

1. Consensus Sequenceで2塩基の文字間の挿入部位にポインタを合わせ、次に、マウスのボタンを一度クリックします。
2. フィールドに新しい塩基の文字を入力し、Enterをクリックします。

3. Base Edit ResultsダイアログボックスのOKをクリックし、挿入を確定します。

塩基を削除する場合

1. 削除したい塩基を一つまたは複数選択します。
2. Deleteをクリックします。
3. Base Edit ResultsダイアログボックスのOKをクリックし、削除を確定します。

## プロジェクトの保存

変異を確認し、編集した後、プロジェクトを保存します。

1. アプリケーションツールバーのSaveまたはSave Asをクリックします。
2. プロジェクトの名前を入力し、OKをクリックします。
3. DashboardのProjectsで新しく保存されたプロジェクトを確認できます。

## レポートの印刷と出力

### レポートの印刷

1. Report をクリックし、Reportsダイアログボックスを開きます。
2. レポートを印刷する手順
  - a. 印刷するレポートの種類を選択します。
  - b. Print Previewをクリックし、印刷される様式を確認し、Printをクリックします。

注: Specimen Reportについては、ドロップダウンリストから「All」または個々の検体のどちらかを選択します。

### レポートの出力

1. レポートをファイルで出力する手順
  - a. 出力するレポートの種類を選択します。
  - b. 適切なファイル形式を選択します。
    - Project: .pdf
    - Quality: .pdf, .txt, .xls, .html
2. Export Settingsで保存先を確認します。
3. Exportをクリックします。

注: 複数のレポートを一度に出力することが可能です。

## プロジェクトの出力

Variant Reporter™ ソフトウェアのプロジェクトを出力します。

1. Dashboard画面で出力するプロジェクトを選択し、アプリケーションツールバーのExportをクリックします。
2. プロジェクトを出力するディレクトリを選択します。
3. プロジェクトのファイル形式は .vrzを選択し、Saveをクリックします。

## プロジェクトの再解析

Variant Reporter™ ソフトウェアでは、以下の場合、プロジェクトを再解析します。

- いくつかの解析パラメータ(Basecall, trim, filter)のアップデート
- リファレンス配列の追加や削除(ROI, layer, PCR増幅産物の追加や削除を含みます)
- Amplicon Specimen Trace Grid(Import, Remove, Exclude, Include, Unassign など)のアップデート

**注：**再解析が必要な場合、Project Statusに「Reanalysis Required」と表示されます。

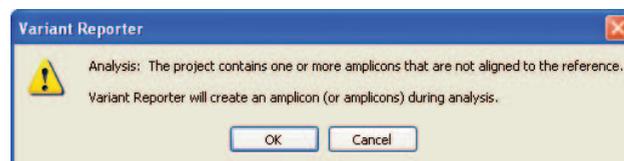
Project Status **Reanalysis Required**

**注：**プロジェクトを再解析した場合、Variant Review画面のテーブルで行った塩基の編集、変異の確認状態、自動的に検出された変異はリセットされます。

## PCR増幅産物情報を用いないプロジェクトの解析

リファレンス配列に対してPCR増幅産物の関連付けをせずにプロジェクトを作成し、解析する場合、ソフトウェアは最長のTRL(Trimmed Read Length)の塩基配列を元にPCR増幅産物を自動で設定します。

PCR増幅産物を設定する前に、以下の注意が表示されます。



**注：**ソフトウェアが自動設定したPCR増幅産物はDefine Reference画面やAmplicon Overview画面で表示され、名前にアスタリスクマークが印されます。

