

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

リファレンス配列を自動作成する解析手順

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がない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

1 データをインポートし、PCR増幅産物別に割り当てる

(任意) 解析パラメータの設定

2 プロジェクトの解析

Specimens	con1	con2
Specimen2	2	2
Specimen5	2	2
Specimen6	2	2

リファレンスを用いないプロジェクトの 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

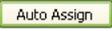
1. Dashboard画面でアプリケーションツールバーの
Newをクリックし、プロジェクトを作成します。
2. プロジェクトビュー画面でタスクアクションツール
バーの  **Import** をクリックします。
3. Import Tracesダイアログボックスで、インポートする
サンプルファイルを含むフォルダか、ファイルを選択し
ます。次に  をクリックします。
4. シーケンスサンプルファイルがImport Tracesダイア
ログボックスの中のTraces To Addボックスに表示
されたことを確認し、**OK**をクリックします。
5. サンプルファイルの分類方法を選択する画面が開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

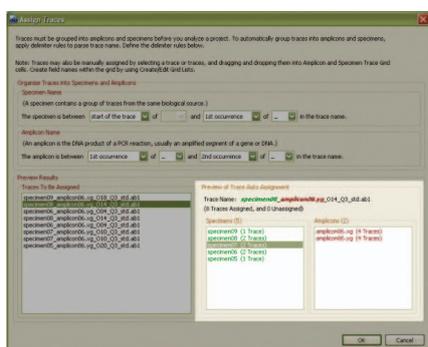
注: 直接、シーケンスサンプルファイルをドラッグして
Variant Reporter™ソフトウェアにインポートすることも
可能です。移動元のフォルダまたはファイルを開き、
Project View画面のImport and Manage Traces
ウィンドウへシーケンスサンプルファイルをドラッグします。

サンプルファイルの割り当て

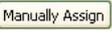
インポートされたサンプルファイルは検体とPCR増幅産物で
分類します。(Amplicon:PCR増幅産物、Specimen:検体)

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%**

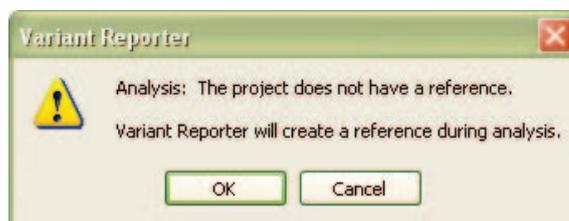
注: セクションを展開すると、それぞれの解析パラメ
ータの初期設定を変更することが可能です。また、
 をクリックし、いつでも推奨設定値に
戻すことができます。

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。

プロジェクトの解析

プロジェクトを解析する手順

1.  をクリックします。
2. 以下のメッセージの表示を確認し、**OK**をクリックします。



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

Import Remove Exclude Include Auto Assign

Import and Manage Traces

Amplicon and Specimen Trace Grid

Specimens	Amplicons	
	Amplicon1	Amplicon2
Specimen1	2	2
Specimen4	2	2

1 (任意) プロジェクトのクオリティを確認

3 変異の確認

4 レポートの印刷と出力

注：ソフトウェアはプロジェクトの中で最長のTRL(Trimmed read length)の塩基配列に基づいて各PCR増幅産物のリファレンス配列を作成します。新たに作成されたリファレンス配列はアスタリスクで印されます。

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。

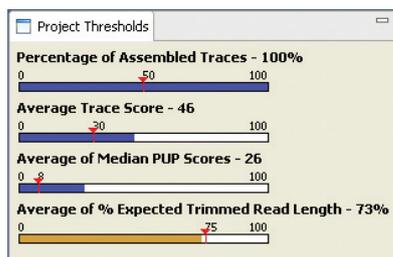
Variant Reporter™ソフトウェアのプロジェクトが全てのクオリティの閾値(Analysis Parameters上で設定します)を満たす場合、Project Results Summary画面が開かれます。

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.  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  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。

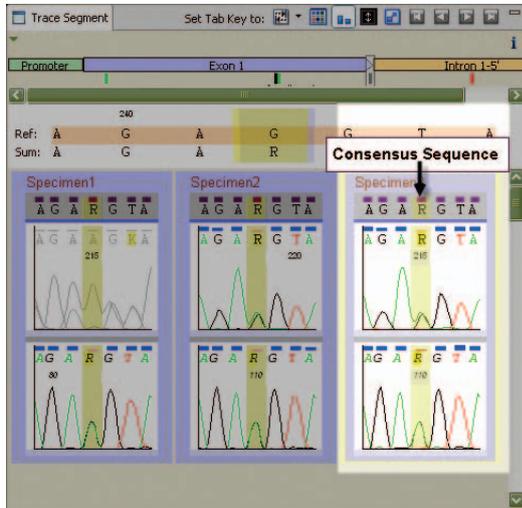
- QV
- Mixed Bases
- Discrepancy
- User Edit
- Variant
- Potential Variant

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。

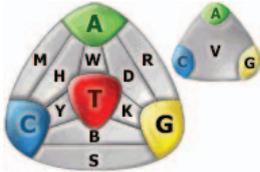
変異の編集

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。

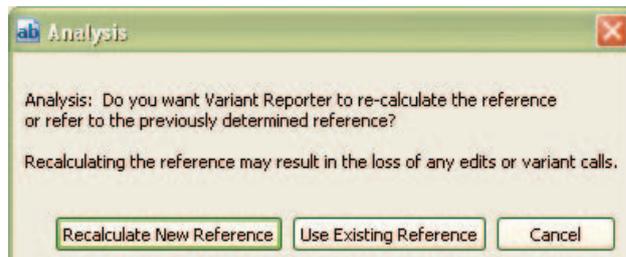
- いくつかの解析パラメータ(Basecall, trim, filter)のアップデート
- リファレンス配列の追加や削除(ROI, layer, PCR増幅産物の追加や削除を含みます)
- Amplicon Specimen Trace Grid(Import, Remove, Exclude, Include, Unassign など)のアップデート

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。

Variant Reporter™ ソフトウェアによって自動作成されたリファレンス配列を使用した場合、再解析を試みると以下のメッセージが表示されます。



重要！新しいリファレンス配列を再計算した場合、プロジェクトにおける以前の編集は消失します。

プロジェクトにはリファレンス配列を指定することを推奨します。操作方法は、Variant Reporter™ソフトウェア「リファレンス配列を指定する解析手順QRC」をご参照ください。