

NextSeq 1000 и 2000

Ръководство за системата за секвениране

ПАТЕНТОВАНА ИНФОРМАЦИЯ НА ILLUMINA

Документ № 1000000109376 v04 BUL

Април 2021 г.

Само за изследователска употреба. Не е предназначено за употреба в диагностични процедури.

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 ѝ 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(такива) 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).

© 2021 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.

Хронология на редакциите

Документ №	Дата	Описание на промяната
1000000109376 v04	Април 2021 г.	<p>Добавени са инструкции за импортиране на основни файлове.</p> <p>Добавен е работен процес за ДНК ампликон в DRAGEN</p> <p>Добавени са функции за контролния софтуер v1.3 на NextSeq 1000/2000.</p> <p>Добавена е информация за избор на прокси сървър.</p> <p>Актуализирана е температурата за доставяне и съхранение за буфер за ресуспензия (RSB) с Tween 20.</p> <p>Актуализиран е работен процес за РНК в DRAGEN за включване на диференциална експресия на гени.</p> <p>Актуализирана е структурата на папката за изходни файлове за секвениране.</p> <p>Актуализирани са препоръките за форматиране на бланка с проба v2.</p>
1000000109376 v03	Ноември 2020 г.	<p>Коригирани каталожни номера.</p> <p>Добавена е информация относно добавяне на нови потребители.</p>

Документ №	Дата	Описание на промяната
1000000109376 v02	Октомври 2020 г.	<p>Добавен е комплект с реагенти P3 на NextSeq 1000/2000.</p> <p>Добавен е работен процес за единичноклетъчна РНК в DRAGEN.</p> <p>Добавен е работен процес за обогатяване в DRAGEN.</p> <p>Добавени са опции за компресия на FASTQ.</p> <p>Добавена за инструкции за инсталиране на актуализации за тръбопровод и лиценз на DRAGEN.</p> <p>Добавени са инструкции за импортиране на персонализирани референтни геноми.</p> <p>Актуализирани са зареждащ обем и концентрации за типове библиотеки.</p> <p>Актуализирани са инструкциите за разреждане на библиотека.</p> <p>Добавени са инструкции за автоматично почистване на касета с реагент.</p> <p>Актуализирана е информацията за поддържащ брой на циклите.</p> <p>Актуализирани са опциите за персонализиране на инструмента.</p> <p>Актуализирани са инструкциите за Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмент).</p> <p>Актуализирана е структурата на изходни файлове на секвениране в DRAGEN.</p> <p>Добавена е информацията относно отчети за КК в DRAGEN.</p> <p>Добавена е информацията относно премахването на персонализирани референтни геноми от твърдия диск.</p> <p>Добавена е информацията относно изпълняването на проверки на системата.</p> <p>Актуализирани са настройките на бланка с проба v2.</p>

Документ №	Дата	Описание на промяната
1000000109376 v01	Юни 2020 г.	<p>Актуализирани са софтуерните описания на контролния софтуер на NextSeq 1000/2000. Изясняване на разликата между Cloud (Облачен), Hybrid (Хибриден), Local (Локален) и Standalone mode (Самостоятелен режим) в цялото ръководство.</p> <p>Актуализирани са инструкциите за съхранение и размразяване на касета.</p> <p>Актуализирана е информацията за поддържащия брой цикли.</p> <p>Актуализирани за инструкциите за конфигуриране на вторичен анализ.</p> <p>Актуализирани са каталожните номера на комплектите с реагенти.</p> <p>Актуализирана е диаграмата на протокола за секвениране.</p> <p>Актуализирани са инструкциите за посочване на мрежово устройство като папка за изходни файлове по подразбиране.</p> <p>Актуализирана е таблицата за поддържани типове библиотеки.</p> <p>Добавени са инструкции за импортиране на персонализиран референтен геном.</p> <p>Добавени за инструкции за конфигуриране на изпълняване чрез персонализиран индексен комплект и комплект за приготвяне на персонализирани библиотеки.</p> <p>Актуализирани са изискванията за потребителски акаунт и парола.</p> <p>Добавени са подробности за структурата на папката за изходни файлове на DRAGEN.</p> <p>Изяснени са инструкциите за дрениране на използвани реагенти от касета.</p> <p>Добавена е обща информация за таблица за качество.</p>

Документ №	Дата	Описание на промяната
1000000109376 v01	Юни 2020 г.	<p>Добавени са инструкции за инсталиране на актуализации на контролния софтуер.</p> <p>Добавени са инструкции как се нарежда изпълняване отново на опашка.</p> <p>Добавени са инструкции за актуализиране на тръбопровод и лиценз в DRAGEN.</p> <p>Добавени са инструкции за персонализиране на инструмента.</p> <p>Добавени са илюстрации за отбелязване на ново етикетирание.</p> <p>Променена е врата на вратичка в цялото ръководство.</p> <p>Добавено е описание на два Ethernet порта.</p>
1000000109376 v00	Март 2020 г.	Първоначална версия.

Съдържание

Общ преглед на системата	1
Допълнителни ресурси	2
Хардуер на инструмента	3
Интегриран софтуер	5
Process Management (Управление на процеси)	6
Диаграма на протокола за секвениране	8
Как работи секвенирането	8
Конфигурация на системата	11
Изисквания за потребителски акаунт	11
Конфигуриране на секвенциалния концентратор BaseSpace и проактивна поддръжка	13
Посочване на местоположение на папката за изходни файлове по подразбиране	15
Импортиране на персонализирани референтни геноми	19
Импортиране на файлове за смущения на основната линия	19
Конфигуриране на режим за изпълняване	21
Персонализиране на инструмент	22
Консумативи и оборудване	25
Консумативи за секвениране	25
Допълнителни консумативи	28
Допълнително оборудване	30
Протокол	32
Съображения за секвениране	32
Планиране на изпълняване на секвениране в секвенциален концентратор BaseSpace	34
Размразяване на касетата в торбичка и поточната клетка	43
Разреждане на библиотеки	45
Зареждане на консумативите в касетата	47
Инициране на изпълняване на секвениране	50
Изходни данни от секвенирането	60
Общ преглед на анализа в реално време	60
Работен процес на анализа в реално време	63
Изходни файлове за секвениране	67
Изходни файлове за вторичен анализ в DRAGEN	68
Структура на папка за изходни файлове за вторичен анализ в DRAGEN	79
Поддръжка	82

Освобождаване на пространство на твърдия диск	82
Софтуерни актуализации	83
Актуализации на работния процес и лиценза на DRAGEN	84
Подмяна на въздушен филтър	86
Отстраняване на неизправности	88
Отстраняване на съобщение за грешка	88
Връщане на консумативи за съхранение	89
Отказ на изпълняване	89
Повторно нареждане на изпълняване на опашка	90
Изключване и рестартиране на инструмента	91
Извършване на проверка на системата	92
Връщане до фабричните настройки	92
Заснемане на инсталирано изображение	93
Възстановяване на заснетото изображение	93
Източници и справочна литература	94
Настройки на бланка с проба v2	94
Секвениране чрез цикъл на Dark	111
Индекс	113
Техническа помощ	117

Общ преглед на системата

Системата за секвениране Illumina® NextSeq™ 1000 и системата за секвениране Illumina® NextSeq™ 2000 предоставя таргетиран подход към секвенирането от следващо поколение¹ (NGS). Тази система с фокус върху приложението комбинира технологията за секвениране на Illumina в рентабилен инструмент за работния плот, който предлага следните функции:

- **Достъпност и надеждност** – NextSeq 1000/2000 притежава локален DRAGEN анализ и дентуриране и разреждане на инструмента. Модул за изобразяване е вграден в системата, а компонентите за течности са вградени в консумативите, което опростява поддръжката на инструмента.
- **Едноетапно зареждане на консумативите** – касетата за еднократна употреба е предварително напълнена с всички реагенти, необходими за изпълняване на дейност. Библиотеката и поточната клетка се зареждат директно в касетата, която след това се зарежда на инструмента. Интегрираното идентифициране позволява точно проследяване.
- Софтуер на **NextSeq 1000/2000** – пакет от интегриран софтуер контролира работата на инструмента, обработва изображенията и генерира обозначаванията на бази.
 - **Cloud mode** (Облачен режим) – планиране на вашето изпълняване с Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмент) на секвенциалния концентратор BaseSpace. Избраният работен процес на анализ е започнат автоматично в рамките на облака. Данни за изпълняването и резултатите на анализа са предоставени също в облака.
 - **Hybrid mode** (Хибриден режим) – планиране на вашето изпълняване с Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмент) на секвенциалния концентратор BaseSpace. Избраният работен процес на анализа е започнат през DRAGEN на инструмента.
 - **Local mode** (Локален режим) – планиране на вашето изпълняване с файлов формат v2 на бланка с проба локално. Избраният работен процес на анализа е започнат автоматично през DRAGEN на инструмента.
 - **Standalone mode** (Самостоятелен режим) – планиране на вашето изпълняване без бланка с проба.

Този раздел осигурява общ преглед на системата, включително информация за хардуера, софтуера и анализа на данни. Той също така събира ключови понятия и терминология, които са вградени в цялата документация. За подробни спецификации, бланки с данни, приложения и свързани продукти вижте [продуктовата страница на системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000](#) в уебсайта на Illumina.

¹next-generation sequencing

Допълнителни ресурси

Страниците за поддръжка на системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000 на уебсайта на Illumina предоставят допълнителни системни ресурси. Тези ресурси включват софтуер, обучение, съвместими продукти и следната документация. Винаги проверявайте страниците за поддръжка за най-актуалните версии.

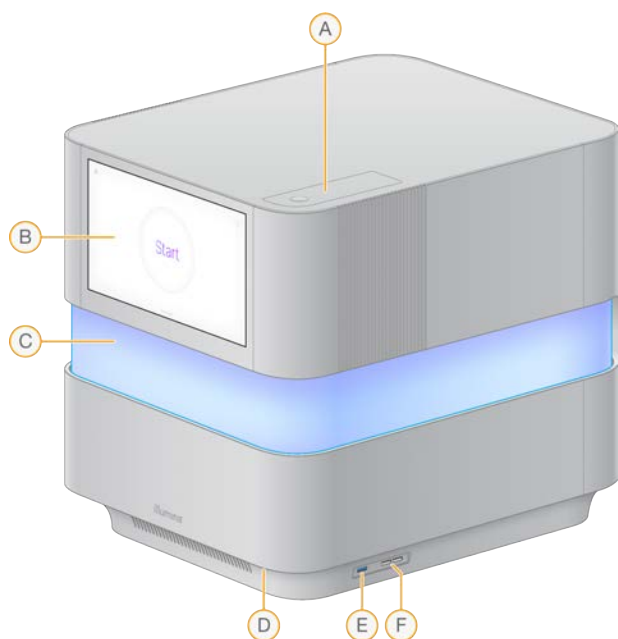
Ресурс	Описание
Персонализирано избиране на протокол	Инструмент за генериране на инструкции от началото до края на процеса, пригодени за вашия метод за подготовка на лабораторията, параметри за изпълняване на дейност и метод за анализ с опции за прецизиране на нивото на детайлите.
<i>Ръководство за безопасност и съвместимост на системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000 (документ № 1000000111928)</i>	Предоставя информация относно съображенията по отношение на работната безопасност, декларации за съответствие и обозначаване на инструмента.
<i>Ръководство за съвместимост за модул на РЧИД четец (документ № 1000000002699)</i>	Дава информация за РЧИД четеща в инструмента, сертификати за съвместимост и съображения за безопасност.
<i>Ръководство за денатуриране и разреждане на библиотеки за NextSeq 1000 и 2000 (документ № 1000000139235)</i>	Предоставя инструкции за ръчно денатуриране и разреждане на приготвени библиотеки за изпълняване на секвениране и подготовка на незадължителна контрола PhiX.
<i>Ръководство за персонализирани праймери за NextSeq 1000 и 2000 (документ № 1000000139569)</i>	Предоставя информация за подмяна на праймери за секвениране Illumina с персонализирани праймери за секвениране.
<i>Ръководство за подготовка на мястото за системата за секвениране NextSeq 2000 (документ № 1000000109378)</i>	Предоставя спецификации за лабораторното пространство, електрическите изисквания и съображения по отношение на околната среда и мрежата.
<i>Помощ за BaseSpace (help.baspace.illumina.com)</i>	Предоставя информация за използването на секвенциалния концентратор BaseSpace™ и наличните опции за анализ.

Ресурс	Описание
Ръководство за обединяване на индексни адаптери (документ № 1000000041074)	Предоставя указания за обобщение и стратегии за двойно индексване.
Адаптерни секвенции Illumina (документ № 1000000002694)	Предоставя списъци на адаптерните секвенции за комплекти за приготвяне на библиотека на Illumina.

Хардуер на инструмента

Системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000 се състоят от бутон за захранване, монитор, лента за състояние, отделение за консумативи и USB портове.

Фигура 1 Външни компоненти на системата



- A. **Отделение за въздушен филтър** – осигурява достъп до сменяем въздушен филтър.
- B. **Монитор със сензорен екран** – позволява конфигурирането и настройването на инструмента чрез интерфейса на контролния софтуер.
- C. **Лента за състоянието** – цветът на светлината се променя, тъй като системата преминава през работния си процес. Синьото и лилавото показват интерактивност (например проверки преди изпълняване), а многоцветното показва важни моменти и данни (например завършване на секвениране). Критичните грешки се показват в червена светлина.
- D. **Бутон за захранване** – управлява захранването на инструмента и посочва дали системата е включена (свети), изключена (не свети), или изключена, но захранвана с променлив ток (премигва).

- E. **3.0 USB порт** – за свързване към външно портативно устройство за прехвърляне на данни.
- F. **2.0 USB портове** – за свързване с мишка и клавиатура.

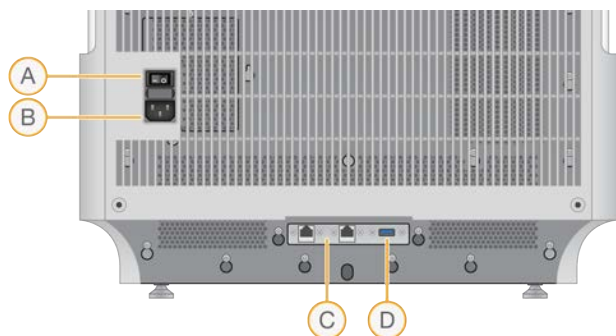
Захранване и помощни връзки

Можете внимателно да преместите инструмента, за да имате достъп до превключвателя на захранването, USB порта и други помощни връзки на гърба на инструмента.

На гърба на инструмента са разположени превключвателят и входът, който контролира захранването на инструмента, както и два Ethernet порта за незадължителна Ethernet връзка. 3.0 USB порт осигурява възможността за свързване на външно портативно устройство за прехвърляне на данни (exFAT не се поддържа на тази платформа, базирана на Linux).

Системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000 са оборудвани с два Ethernet порта за разширяване на възможностите и гъвкавостта на системата. Например един Ethernet порт може да бъде предназначен за комуникация с вътрешно мрежово устройство, а другият порт да е предназначен за външна комуникация, като секвенциалния концентратор BaseSpace или проактивната поддръжка.

Фигура 2 Компоненти на задния панел

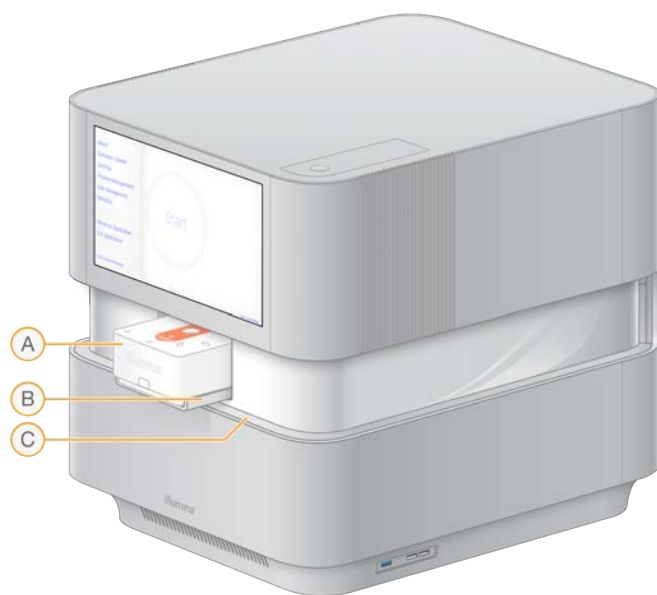


- A. **Превключвател** – включва и изключва захранването на инструмента.
- B. **Вход за захранване** – връзка на захранващия кабел.
- C. **Ethernet портове (2)** – незадължителна връзка с Ethernet кабел.
- D. **3.0 USB порт** – за свързване към външен твърд диск за прехвърляне на данни.

Отделение за консумативи

Отделението за консумативи съдържа касетата, включително поточната клетка и разредена библиотека, за изпълняване на секвениране.

Фигура 3 Заредено отделение за консумативи



- A. **Касета** – съдържа поточната клетка, библиотеката и реагентите и събира използваните реагенти по време на изпълняването.
- B. **Табла** – придържа касетата по време на секвенирането.
- C. **Вратичка** – отваря се, за да предостави достъп до отделението за консумативи.

Интегриран софтуер

Софтуерният пакет на системата включва интегрирани приложения, които извършват изпълнявания на секвениране и анализ.

- **Контролен софтуер NextSeq 1000/2000** – контролира операциите на инструмента и предоставя интерфейс за конфигуриране на системата, задаване на изпълняване на секвениране и мониторинг на статистическите данни относно изпълняването в хода на секвенирането.
- **Анализ в реално време (RTA3)** – извършва анализ на изображението и обозначаване на бази по време на изпълняването. За повече информация вижте [Изходни данни от секвенирането на страница 60](#).
- **Universal Copy Service** – копира изходните файлове от секвенирането от папката за изпълняване до секвенциалния концентратор BaseSpace (ако е наличен) и папката за изходни файлове, където можете да получите достъп до тях.

Контролният софтуер е интерактивен и изпълнява автоматизирани фонове процеси. Анализът в реално време и Universal Copy Service изпълняват само фонове процеси.

Информация за системата

Изберете менюто на контролния софтуер в горния ляв ъгъл, за да отворите раздела About (Относно). Разделът About (Относно) съдържа информация за контакт с Illumina и следната системна информация:

- Instrument Serial Number (Сериен номер на инструмента)
- Computer Name (Име на компютъра)
- System Suite Version (Версия на системния комплект)
- Image OS Version (Версия на операционната система на изображение)
- Total Run Count (Общ брой изпълнявания)

Уведомления и известия

Иконата за уведомления се намира в горния десен ъгъл. Когато възникне предупреждение или грешка, десният панел се плъзга, за да покаже уведомления. Изберете иконата по всяко време, за да прегледате списъка на Current (Сегашни уведомления) или Historic notifications (Предидни уведомления) за предупреждения и грешки.

- Предупрежденията изискват внимание, но не спират изпълняването и не изискват действие, различно от това да ги вземете предвид.
- Грешките изискват действие преди стартирането или продължаването на изпълняване.

Минимизиране на контролния софтуер

Минимизирайте контролния софтуер, за да получите достъп до други приложения. Например, за да прегледате в папката за изходни файлове във File Explorer или да намерите бланка с проба.

1. От менюто на контролния софтуер изберете **Minimize Application** (Минимизиране на приложението).
Контролният софтуер се минимизира.
2. За максимизиране на контролния софтуер изберете **NextSeq 1000/2000 Control Software** (Контролен софтуер NextSeq 1000/2000) от лентата с инструменти.

Process Management (Управление на процеси)

Екранът Process Management (Управление на процеси) показва временните изпълнявания, които се съхраняват на `/usr/local/illumina/runs`. Всяко изпълняване се идентифицира по дата, име и идентификатор на изпълняване. Информация, като състоянието на Run (Изпълняване), Secondary Analysis (Вторичен анализ), Output Folder (Папка за изходни файлове) и Cloud (Облачен режим), също се показва за всяко изпълняване. Изберете изпълняване за преглеждане на допълнителна информация, включително Workflow (Работен процес), Average % Q30 (Среден % Q30), Total Reads PF (Общо разчитания на PF) и Total Yield (Обща

производителност). За да изтриете изпълнявания и да освободите пространство, вижте [Освобождаване на пространство на твърдия диск на страница 82](#). За повторно нареждане на опашката на анализа на инструмента вижте [Повторно нареждане на изпълняване на опашка на страница 90](#).

Status of Run (Състояние на изпълняване)

Този раздел показва състоянието на изпълняването на секвениране.

- **In Progress** (Извършва се) – извършва се изпълняване на секвениране.
- **Complete** (Завършено) – изпълняването на секвениране е завършено.
- **Stopped** (Прекратено) – изпълняването на секвениране е прекратено.
- **Errored** (С грешка) – в изпълняването на секвениране има грешка.

Status of Secondary Analysis (Състояние на вторичен анализ)

Този раздел показва състоянието на вторичния анализ на DRAGEN на инструмента. Това ще покаже N/A (не е приложимо), ако анализът се изпълнява в секвенциалния концентратор BaseSpace.

- **Not Started** (Не е започнал) – анализът в DRAGEN все още не е започнал.
- **In Progress** (Извършва се) – анализът DRAGEN е в ход.
- **Stopped** (Прекратено) – анализът в DRAGEN е бил прекратен.
- **Errored** (С грешка) – анализът в DRAGEN има грешка.
- **Complete** (Завършено) – анализът в DRAGEN е завършен.

Status of Output Folder (Състояние на папка за изходни файлове)

Този раздел показва състоянието на файловете, които се копират в папката за изходни файлове:

- **In Progress** (Извършва се) – файловете се копират в папката за изходни файлове.
- **Complete** (Завършено) – файловете са успешно копирани в папката за изходни файлове.

Status of Cloud (Състояние на облака (секвенциален концентратор BaseSpace))

Този раздел показва състоянието на файловете, които се качват в секвенциалния концентратор BaseSpace чрез облака:

- **In Progress** (Извършва се) – контролният софтуер качва файлове в секвенциалния концентратор BaseSpace.
- **Complete** (Завършен) – всички файлове са качени успешно в секвенциалния концентратор BaseSpace.

Отстраняване на неизправност при проблем в състоянието

- Ако изпълняването на дейност е в ход, затворете екрана Process Management (Управление на процеси), изчакайте около пет минути, след което го отворете повторно.
- Ако изпълняването не се извършва, приложете изключване и рестартиране на инструмента, след което отворете отново екрана Process Management (Управление на процеси). Вижте [Изключване и рестартиране на инструмента на страница 91](#).

Диаграма на протокола за секвениране

Следната диаграма илюстрира протокола за секвениране чрез използване на NextSeq 1000/2000.



Как работи секвенирането

Генерирането на клъстер, секвенирането и анализът съставляват секвенирането на системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000. Всяка стъпка се извършва автоматично по време на изпълняване на секвениране. В зависимост от конфигурацията на системата се извършва допълнителен анализ извън инструмента след завършване на изпълняването.

Генериране на клъстери

Library¹ (Библиотека) е денатурирана автоматично до единични вериги и след това се разрежда допълнително на инструмента. По време на генерирането на клъстери единичните молекули ДНК се свързват с повърхността на поточната клетка и се амплифицират, за да се сформират клъстери². Генерирането на клъстери отнема около 4 часа.

Секвениране

Клъстерите се изобразяват чрез двуканална химия, един зелен канал и един син канал за кодиране на данните за четирите нуклеотида. След като една плочка на поточната клетка е изобразена, се изобразява следващата плочка. Този процес се повтаря за всеки цикъл на секвениране (около 5 минути на цикъл). След анализа на изображенията софтуерът за анализ в реално време изпълнява обозначаване на бази³, филтриране и изчисляване на резултат за качество.⁴

Основен анализ

В хода на изпълняването контролният софтуер автоматично прехвърля файловете за обозначаване на бази⁵ (*.cbcl) към посочената папка за изходни файлове за анализ на данните. По време на изпълняването на секвениране софтуерът за анализ в реално време (RTA3) изпълнява анализ на изображение, обозначаване на бази и демултиплексиране⁶. Когато секвенирането е завършено, започва вторичен анализ. Методът за вторичен анализ на данните зависи от вашето приложение и конфигурацията на системата.

Вторичен анализ

Секвенциалният концентратор BaseSpace е средата за изчислителни операции в облака на Illumina за мониторинг на изпълняване, анализ на данни, съхранение и сътрудничество. Хоства приложенията DRAGEN и секвенциалния концентратор BaseSpace, които поддържат общите методи за анализ на секвениране.

¹ДНК или РНК проба, която има прикрепени адаптери за секвениране. Методите за приготвяне варират.

²Клонална група от ДНК вериги на поточна клетка, която произвежда едно разчитане за секвениране. Всяка ДНК верига на поточна клетка произвежда шаблон, който се амплифицира до момента, в който клъстерът се състои от стотици или хиляди копия. Например поточна клетка с 10 000 клъстера произвежда 10 000 единични разчитания или 20 000 разчитания със сдвоени краища.

³Определяне на база (А, Ц, Г или Т) за всеки клъстер в плочка при специфичен цикъл.

⁴Изчислява набор от показатели за качество за всяко обозначаване на база и след това използва стойността на показателя за проверяване на резултата за качество.

⁵Съдържа обозначаване на база и свързан резултат за качество за всеки клъстер за всеки цикъл на секвениране.

⁶Процес на анализ, който разграничава разчитания за всяка библиотека в обединяване.

След като първоначалният анализ на секвениране е завършен, DRAGEN изпълнява вторичен анализ чрез един от наличните тръбопроводи за анализ.

При използване на Cloud (Облачен режим) или Hybrid mode (Хибриден режим) DRAGEN извлича бланка с проба, референтен геном и входни файлове на изпълняване от Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмента) на секвенциалния концентратор BaseSpace. За Cloud mode (Облачен режим) cBCL данните се качват автоматично в секвенциалния концентратор BaseSpace и той започва вторичен анализ в DRAGEN. За Hybrid mode (Хибриден режим) вторичният анализ DRAGEN се изпълнява на инструмента и изходните файлове може да бъдат съхранени в избрана папка или в облака.

Ако използвате Local mode (Локален режим) DRAGEN възстановява предоставената бланка с проба, референтен геном и входните файлове на изпълняване от системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000. Вторичният анализ в DRAGEN се изпълнява на инструмента и изходните файлове може да бъдат съхранени в избрана папка за изходни файлове. Ако е избран Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг на изпълняване и съхранение), анализът може също да започне през приложенията на секвенциалния концентратор BaseSpace след завършване на секвенирането.

Ако използвате Standalone mode (Самостоятелен режим), задайте изпълняване без бланка с проба. Този работен процес се препоръчва за работни процеси на персонализиран анализ, които започват от cBCL данни.

- За повече информация относно секвенциалния концентратор BaseSpace вижте [Онлайн помощ за секвенциалния концентратор BaseSpace](#).
- За повече информация относно DRAGEN вижте страницата за поддръжка на платформата [DRAGEN Bio-IT](#).
- За общ преглед на всички приложения вижте [Приложения BaseSpace](#).

Конфигурация на системата

Този раздел осигурява инструкции за конфигуриране на вашата система, включително описания на настройките на софтуера.

Тези инструкции първично описват контролния софтуер с информация за конфигуриране на мрежата и операционната система.

i | Използването на Google Chrome на инструмента ще ви подкани да отключите вашия ключ за вход. Можете спокойно да игнорирате и откажете подканата.

Изисквания за потребителски акаунт

Операционната система Linux има три акаунта:

- root (главен администратор)
- ilmnadmin (администратор)
- ilmnuser (потребител)

Администраторският акаунт е предназначен само за прилагане на системни актуализации, като актуализиране на контролния софтуер на NextSeq 1000/2000 или за използване от IT персонала за монтиране на постоянно мрежово устройство.

Извършвайте всички други функции, включително секвенирането, от потребителския акаунт.

Изисквания за парола

Полевият сервизен инженер инициира промяна на парола за трите акаунта след завършване на инсталацията на инструмента. Актуализирайте всяка от паролите на всеки 180 дни, когато това се изисква от вас.

Таблица 1 Правила за пароли по подразбиране

Правило	Настройка
Хронология на налаганите пароли	Запомнени са пет пароли
Праг за заключване	Десет невалидни опита за влизане
Минимална дължина на паролата	Десет знака
Минимално разнообразие от знаци	Три от всеки от: цифра, главна буква, малка буква и символ

Правило	Настройка
Максимално повтарящи се знаци	Три знака
Паролата трябва да отговаря на изискванията за сложност	Деактивирана
Паролите да се съхраняват с обратимо шифроване	Деактивирана

Добавяне на нов потребител

1. Влезте в `ilmnadmin`.
2. Изберете бутона за захранване и след това отворете падащия списък на `ilmnadmin`.
3. Изберете **Account Settings** (Настройки на акаунта).
4. Изберете **Unlock** (Отключване) и след това въведете паролата на `ilmnadmin`.
5. Изберете **Add user** (Добавяне на потребител).
6. Изберете вид на акаунта `Standard` (Стандартен) и след това въведете ново потребителско име.
7. Изберете **Set password now** (Задаване на парола сега) и след това въведете парола.
8. Изберете **Add** (Добавяне).
Новият потребител е добавен към списъка `Users` (Потребители).
9. Предоставете достъп на потребителя до контролния софтуер на NextSeq 1000/2000, както следва.
 - a. Отворете терминала.
 - b. Въведете следното:

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <new user name>
```
 - c. Ако бъдете подканени, въведете паролата на `ilmnadmin`.
10. За да потвърдите, че потребителските разрешения са зададени успешно, направете следното.
 - a. Влезте в новия потребителски акаунт.
 - b. Навигирайте до NextSeq 1000/2000 Control Software (Контролен софтуер на NextSeq 1000/2000).
 - c. От менюто на контролния софтуер изберете **Settings** (Настройки).
 - d. Под `Default Output Folder` (Папка за изходни файлове по подразбиране) се уверете, че можете да изберете и запишете пътя към папката за изходни файлове.
Ако можете да изберете и запишете пътя към папката за изходни файлове без никакви грешки, разрешенията са зададени успешно.

Нулиране на парола

Този раздел дава подробности как се нулира паролата на `ilmnuser`, `ilmnadmin` или `root`. Не е налично възстановяване на парола. Нулирането на вашата парола не заобикаля блокирането на акаунта след твърде много неправилни опити за парола. Трябва да изчакате 10 минути, преди да можете да нулирате паролата си или да опитате да влезете.

Нулиране на парола на `ilmnuser`

Можете да нулирате паролата на `ilmnuser`, ако знаете паролата на `ilmnadmin` или `root`.

1. Влезте в `ilmnadmin`.
2. Отворете терминала.
3. Въведете `sudo passwd ilmuser`.
4. Когато бъдете подканени, въведете паролата на `ilmnadmin`.
5. Когато бъдете подканени, въведете паролата на `ilmnuser`.
6. Напишете отново новата парола на `ilmnuser`, когато бъдете подканени, за да я потвърдите.

Нулиране на парола на `ilmnadmin`

Можете да нулирате паролата на `ilmnadmin`, ако знаете паролата на `root`.

1. Влезте в `root`.
2. Отворете терминала.
3. Въведете `passwd ilmadmin`, за да промените паролата на `ilmnadmin` или въведете `passwd ilmuser`, за да промените паролата на `ilmnuser`.
4. Когато бъдете подканени, въведете новата парола.
5. Напишете отново новата парола, когато бъдете подканени, за да потвърдите новата парола.

Нулиране на парола на `root`

За да нулирате паролата на `root`, използвайте следните възможности:

- Ако знаете паролата от момента на заснемане на последното изображение на операционната система, върнете се до това запазено изображение.
- Ако не помните паролата, свържете се с техническата поддръжка на Illumina.

Конфигуриране на секвенциалния концентратор BaseSpace и проактивна поддръжка

Използвайте следните инструкции, за да конфигурирате секвенциалния концентратор BaseSpace и проактивната поддръжка на вашата система. За да конфигурирате акаунт в секвенциалния концентратор BaseSpace, вижте [Онлайн помощ за секвенциалния концентратор BaseSpace](#).

1. От менюто на контролния софтуер изберете **Settings** (Настройки).

2. Изберете една от следните опции за настройките на секвенциалния концентратор BaseSpace и проактивната поддръжка:

Опция	Описание и изисквания
Proactive Support Only (Само проактивна поддръжка)*	Изпращане на данни за производителността на инструмента към Illumina за по-бързо отстраняване на неизправности. Изисква връзка с интернет.
Proactive and Run Monitoring (Проактивен мониторинг и мониторинг на изпълняване)	Изпращане на InterOp файлове и регистрационни файлове към секвенциалния концентратор BaseSpace за отдалечен мониторинг на изпълняването. Това е опцията по подразбиране. Изисква акаунт в секвенциален концентратор BaseSpace и връзка с интернет.
Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг на изпълняване и съхранение)	Изпращане на InterOp файлове, регистрационни файлове и данни за изпълняването към секвенциалния концентратор BaseSpace за отдалечен мониторинг и анализ. Изисква акаунт в секвенциален концентратор BaseSpace, връзка с интернет и бланка с проба.
None (Никаква)	Прекъсване на връзката между изпълняванията и акаунта в секвенциален концентратор BaseSpace и без изпращане на данни за производителността на инструмента за проактивната поддръжка на Illumina.

* В зависимост от версията на контролния софтуер името на тази настройка на софтуерния интерфейс може да се различава от името в това ръководство.

Когато е избрана която и да е опция с изключение на None (Никаква), се активира проактивна поддръжка. Това е безплатна услуга, която ви позволява да виждате данните за производителност в MyIllumina Customer Dashboard (Табло за управление на потребителя MyIllumina) и позволява на екипите за поддръжка на Illumina да отстраняват неизправности по-бързо.



Proactive and Run Monitoring (Проактивен мониторинг и мониторинг на изпълняване) са включени по подразбиране. За да се откажете от тази услуга, изберете **None** (Никаква).

- Ако сте избрали None (Никаква) в стъпка 2, изберете **Save** (Записване), за да приключите. В противен случай продължете до стъпка 6.
- От списъка Hosting Location (Местоположение на хостинг) изберете местоположението на сървъра на секвенциалния концентратор BaseSpace, където данните ще се качват. Уверете се, че използвате Hosting Location (Местоположение на хостинг) във вашия или най-близкия регион.

5. Ако имате корпоративен абонамент, въведете името на домейна (URL), който се използва за вашия акаунт в секвенциален концентратор BaseSpace.
Например: <https://yourlab.basespace.illumina.com>.
6. Изберете **Save** (Записване).

Посочване на местоположение на папката за изходни файлове по подразбиране

Използвайте инструкциите в настоящия раздел, за да изберете местоположение за папката за изходни файлове по подразбиране. Може да промените папката за изходни файлове за всяко изпълняване по време на конфигуриране на изпълняване. Софтуерът записва sBCL файловете¹ и другите данни от изпълняването в папката за изходни файлове.

Необходима е папка за изходни файлове, освен ако секвенциалният концентратор BaseSpace не е конфигуриран за Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняването). Използвайте само външно или мрежово устройство като папка за изходни файлове по подразбиране. Използването на папка за изходни файлове на инструмента влияе отрицателно на вашето изпълняване на секвениране.

Посочване на папка за изходни файлове на външно устройство

Използвайте следните инструкции за избиране на външно портативно устройство като папка за изходни файлове по подразбиране. Препоръчва се устройство със самостоятелно захранване, форматирано в NTFS или GPT/EXTA.

1. Включете външно портативно устройство, като използвате 3.0 USB порта от страни или на гърба на инструмента.
Уверете се, че външното преносимо устройство позволява разрешения за запис. Ако е конфигурирано на Read Only (Само за четене), контролният софтуер няма да може да запише данни на него.
2. Създайте нова папка на външното портативно устройство. Тази папка ще стане местоположението на папката за изходни файлове по подразбиране.
Контролният софтуер на NextSeq 1000/2000 изисква поне две нива на гнездовидни папки за разпознаване на местоположението като външно портативно устройство.
3. От менюто на контролния софтуер изберете **Settings** (Настройки).
4. Под Default Output Folder (Папка за изходни файлове по подразбиране) изберете съществуващия път за папка и навигирайте до новата папка на външното портативно устройство

¹Съдържа обозначаване на база и свързан резултат за качество за всеки клъстер за всеки цикъл на секвениране.

5. **[Незадължително]** Ако сте избрали **Online Run Setup** (Конфигуриране на изпълняване онлайн) под Run Mode (Режим на изпълняване), изберете опция от падащото меню Hosting Location (Местоположение на хостинг).
6. Изберете **Save** (Записване).

Посочване на папка за изходни файлове по подразбиране на мрежово устройство

Използвайте следните инструменти за монтиране на постоянно мрежово устройство и определете местоположението на папката за изходни файлове по подразбиране. Server Message Block (SMB), Common Internet File System (CIFS) и Network File System (NFS) са единствените поддържани методи за постоянно монтиране на мрежово устройство на NextSeq 1000/2000.

Инструкции за монтиране на SMB/CIFS

1. Ако контролният софтуер на NextSeq 1000/2000 е отворен, изберете **Minimize Application** (Минимизиране на приложението).
2. Влезте в ilmnadmin.
3. Изберете **Applications** (Приложения).
4. Във Favorites (Предпочитани) изберете **Terminal** (Терминал).
5. Въведете `sudo touch /root/.smbcreds` и след това изберете **Enter** (Въвеждане).
6. Въведете паролата за ilmnadmin при подкана.
Паролата за ilmnadmin се изисква всеки път, когато използвате командата `sudo`.
7. Въведете `sudo gedit /root/.smbcreds` и след това изберете **Enter** (Въвеждане) за отваряне на текстовия файл, неименуван `smbcreds`.
8. Когато текстовият файл `.smbcreds` се отвори, въведете вашите идентификационни данни за влизане в мрежата в следния формат.

```
username=<user name>  
password=<password>  
domain=<domain_name>
```

Скоби не се изискват за потребителско име, парола и идентификационни данни за домейна. Идентификационни данни за домейна се изискват само ако отдалеченият акаунт е част от домейна.
9. Изберете **Save** (Записване) и напуснете файла.
10. Идентифицирайте името на сървъра и споделете името на вашия сървър за SMB/CIF.
Името на сървъра и името за споделяне не може да съдържат интервали, например:
Име на сървър: 192.168.500.100 или Myserver-myinstitute-03
Име за споделяне: /share1

11. В терминала въведете `sudo chmod 400 /root/.smbcreds` и след това изберете **Enter** (Въвеждане) за получаване на достъп до текстовия файл `.smbcreds`.
12. Въведете `sudo mkdir /mnt/<local name>`.
<local name> е името на новата директория във вашето мрежово устройство и може да съдържа интервали. Това е директорията, която ще се покаже на инструмента.
13. Изберете **Enter** (Въвеждане).
14. Въведете `sudo gedit /etc/fstab` и след това изберете **Enter** (Въвеждане).
15. Когато `fstab` файлът се отвори, въведете следното в края на файла и след това изберете **Enter** (Въвеждане).

```
//<Server name>/<Share name> /mnt/<local name> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```
16. Изберете **Save** (Записване) и напуснете файла.
17. В терминала въведете `sudo mount -a -vvv` и след това изберете **Enter** (Въвеждане).
Мрежовото устройство сега е монтирано като `/mnt/<local name>`.
18. За потвърждение, че монтирането е успешно, въведете `<df | grep <local name>>` и след това изберете **Enter** (Въвеждане).
Името на споделения файл трябва да се покаже.
19. Въведете `sudo mkdir /mnt/<local name>/<output directory>` за създаване на подпапка в рамките на локалната директория. <output directory> представлява местоположението на папката за изходните файлове по подразбиране.
Контролният софтуер на NextSeq 1000/2000 изисква поне две нива на гнездовидни папки за разпознаване на местоположението като монтирано мрежово устройство.
20. Приложете изключване и рестартиране на инструмента. Вижте [Изключване и рестартиране на инструмента на страница 91](#).
21. Конфигурирайте постоянно монтирано мрежово устройство като папка за изходни файлове по подразбиране. Вижте [Посочване на постоянно мрежово устройство като папка за изходни файлове по подразбиране на страница 18](#).

Инструкции за монтиране на NFS

1. Ако контролният софтуер на NextSeq 1000/2000 е отворен, изберете **Minimize Application** (Минимизиране на приложението).
2. Влезте в `ilmnadmin`.
3. Идентифицирайте името на вашия сървър за NFS.
Името на сървъра не може да съдържа интервали, например:
Име на сървър: `192.168.500.100` или `Myserver-myinstitute-03`
4. Изберете **Applications** (Приложения).

5. Във Favorites (Предпочитани) изберете **Terminal** (Терминал).
6. Въведете `sudo mkdir /mnt/<local name>` и след това изберете **Enter** (Въвеждане).
<local name> е името на новата директория във вашето мрежово устройство.
7. Въведете `sudo gedit /etc/fstab` и след това изберете **Enter** (Въвеждане).
8. Когато `fstab` файлът се отвори, въведете следното в края на файла и след това изберете **Enter** (Въвеждане).
Име на сървър: `/share //mnt/<local name> nfs x-systemd.automount,defaults`
`0 0`
9. Изберете **Save** (Записване) и напуснете файла.
10. В терминала въведете `sudo mount -a -vvv` и след това изберете **Enter** (Въвеждане).
Мрежовото устройство сега е монтирано в `/mnt/directory` в рамките на папката `<local name>`.
11. Създайте нова `<sub folder>` в рамките на папката `<local name>`. Подпапката представлява местоположението на папката за изходните файлове по подразбиране.
Контролният софтуер на NextSeq 1000/2000 изисква поне две нива на гнездовидни папки за разпознаване на местоположението като монтирано мрежово устройство.
12. Приложете изключване и рестартиране на инструмента. Вижте [Изключване и рестартиране на инструмента на страница 91](#).
13. Конфигурирайте постоянно монтирано мрежово устройство като папка за изходни файлове по подразбиране. Вижте [Посочване на постоянно мрежово устройство като папка за изходни файлове по подразбиране на страница 18](#).

Посочване на постоянно мрежово устройство като папка за изходни файлове по подразбиране

1. Влезте в `ilmnuser`.
2. От менюто на контролния софтуер на NextSeq 1000/2000 изберете **Settings** (Настройки).
3. Под Default Output Folder (Папка за изходни файлове по подразбиране) изберете монтирането на постоянно мрежово устройство на `/mnt/<local name>/<output directory>`.
4. **[Незадължително]** Ако сте избрали **Online Run Setup** (Конфигуриране на изпълняване онлайн) под Run Mode (Режим на изпълняване), изберете опция от падащото меню `Hosting Location` (Местоположение на хостинг).
5. Изберете **Save** (Записване).

Импортиране на персонализирани референтни геноми

Нови персонализирани референтни геноми могат да бъдат импортирани чрез администраторски акаунт. За списък с всички съвместими референтни геноми посетете страницата за съвместимост с продукти на NextSeq 1000/2000.

1. Създайте референтен геном чрез конструктора за справки за приложението на секвенциалния концентратор BaseSpace от инструментите на Illumina. За повече информация вижте *конструктора на справки за онлайн помощта за приложението Illumina Instruments v1.0.0*.
2. Изберете менюто на контролния софтуер и след това изберете **Process Management** (Управление на процесите).
3. Уверете се, че няма изпълнявания на секвениране или извършване на вторични анализи на инструмента.
4. От менюто на контролния софтуер изберете **Minimize Application** (Минимизиране на приложението).
5. Влезте в ilmnadmin.
6. Изберете менюто на контролния софтуер, след което изберете **DRAGEN**.
7. В раздел Genome (Геном) изберете **View Installed Genomes** (Преглед на инсталирани геноми) за преглед за списък с всички текущо инсталирани геноми на Illumina и персонализирани геноми.
8. Затворете модала.
9. Изберете **Choose** (Избиране) под Import New Reference Genomes (Импортиране на нови референтни геноми), навигирайте до файла с референтния геном (*.tar.gz) на преносимото или монтираното мрежово устройство и след това изберете **Open** (Отваряне).
10. Изберете **Import** (Импортиране).

Импортиране на файлове за смущения на основната линия

Ако използвате работния процес за обогатяване в DRAGEN в соматичен режим, можете да използвате файла за смущения на основната линия, за да филтрирате секвенирането или систематичните смущения. Можете да изтеглите стандартни персонализирани файлове за смущения от [сайта за поддръжка на Illumina](#) или създадете персонализиран файл за смущения на основната линия.

Генериране на персонализиран файл за смущения на основната линия

Ако използвате соматичен режим, можете да генерирате персонализиран файл за смущения на основната линия. Файлът за смущения на основната линия е изграден от нормални проби, които не съвпадат с обекта, от който са пробите. Препоръчаният брой с нормални проби е 50.

За генериране на персонализиран файл за смущения на основната линия използвайте един от следните методи:

- Използвайте сървъра на платформата DRAGEN Bio-IT. Вижте [онлайн помощта](#) на платформата DRAGEN Bio-IT за инструкции.
- Използвайте приложението DRAGEN Baseline Builder на секвенциалния концентратор BaseSpace. Използвайте линията за конвертиране в BCL в Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмент) на секвенциалния концентратор BaseSpace за генериране на FASTQ файлове. След като изпълняването на секвениране е завършено и са налични 50 проби, въведете FASTQ файловете в приложението DRAGEN Baseline Builder.

Импортиране на основните файлове чрез потребителския интерфейс

След импортиране на основните файлове може да конфигурирате изпълняването на секвениране чрез работния процес за обогатяване в DRAGEN в соматичен режим.

1. Изтеглете стандартния основен файл от [сайта за поддръжка на Illumina](#) или изтеглете персонализирания основен файл от сървъра на DRAGEN или приложението DRAGEN Baseline Builder.
2. От менюто на контролния софтуер изберете **Minimize Application** (Минимизиране на приложението).
3. Влезте в `ilmnadmin`.
4. Изберете **Applications** (Приложения) и след това изберете **Favorites** (Любими).
5. Изберете **+Other Locations** (Други местоположения) и след това изберете **Computer** (Компютър).
6. Щракнете два пъти `usr` (потребител) и след това `local` (локален).
7. Щракнете два пъти `illumina` и след това `aux_files` (допълнителни файлове).
8. Дръпнете файла за смущения на основната линия към `aux_files`.

Импортиране на основни файлове чрез терминал

След импортиране на основните файлове може да конфигурирате изпълняването на секвениране чрез работния процес за обогатяване в DRAGEN в соматичен режим.

1. Изтеглете стандартния основен файл от [сайта за поддръжка на Illumina](#) или изтеглете персонализирания основен файл от сървъра на DRAGEN или приложението DRAGEN Baseline Builder.

- От менюто на контролния софтуер изберете **Minimize Application** (Минимизиране на приложението).
- Влезте в `ilmnadmin`.
- Изберете **Applications** (Приложения).
- Във **Favorites** (Предпочитани) изберете **Terminal** (Терминал).
- Въведете следната команда.

```
cp [/path/to/baselinefile] /usr/local/illumina/aux_files
```

Конфигуриране на режим за изпълняване

Режимът на изпълняване се прилага към всички изпълнявания и определя къде да въведете параметрите за изпълняване и как да анализирате данните.

Cloud or Hybrid Mode (Облачен или хибриден режим)

- От менюто на контролния софтуер изберете **Settings** (Настройки).
- Изберете **Online Run Setup** (Конфигуриране на онлайн изпълняване) в услугите и проактивна поддръжка на секвенциалния концентратор BaseSpace.
- Конфигурирайте допълнително настройките по подходящ начин, като изберете следното:
 - Proactive and Run Monitoring** (Проактивен мониторинг и мониторинг на изпълняване) или **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване).
 - От падащото меню за **Hosting Location** (Местоположение на хостинг).
 - [Незадължително]** Въведете **Private Domain Name** (Име на частен домейн).
- Изберете **Save** (Записване).

Local or Standalone Mode (Локален или самостоятелен режим)

- От менюто на контролния софтуер изберете **Settings** (Настройки).
- Изберете **Local Run Setup** (Конфигуриране на локално изпълняване) в услугите и проактивна поддръжка на секвенциалния концентратор BaseSpace.
- Конфигурирайте допълнително настройките по подходящ начин, като изберете следното:
 - Proactive Support Only** (Само проактивна поддръжка), **Proactive and Run Monitoring** (Проактивен мониторинг и мониторинг на изпълняване) или **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване) или **None** (Никаква).



Секвенциалният концентратор BaseSpace ще позволи функционалността за нареждане отново на опашка, ако е избрано **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване). В случай на невалидна бланка с проба това ще ви позволи да направите корекции на бланката с проба и да наредите отново на опашка анализа на демултиплексиране. За функционалността за нареждане на опашка отново на инструмента вижте [Повторно нареждане на изпълняване на опашка на страница 90](#).

- b. От падащото меню за **Hosting Location** (Местоположение на хостинг).
 - c. **[Незадължително]** Въведете **Private Domain Name** (Име на частен домейн).
4. Изберете **Save** (Записване).

Съображения за бланка с проба за Local or Standalone Mode

(Локален или самостоятелен режим)

Трябва да използвате файлов формат v2 за бланка с проба за анализиране с DRAGEN. Файловият формат v2 за бланка с проба е съвместим също с приложенията на секвенциалния концентратор BaseSpace, които не са активирани от DRAGEN. За информация относно създаването на бланка с проба във файлов формат v2 вижте [Настройки на бланка с проба v2 на страница 94](#) (Настройки на бланка с проба v2).

Персонализиране на инструмент

Този раздел включва информация относно конфигуриране на налични настройки за персонализиране. За конфигуриране на папка за изходни файлове по подразбиране вижте [Посочване на местоположение на папката за изходни файлове по подразбиране на страница 15](#).

Задаване на име на инструмента

1. От менюто на контролния софтуер изберете **Settings** (Настройки).
2. Изберете Instrument Nickname (Псевдоним на инструмента) и въведете предпочитаното от вас име за инструмента.
Името се показва в горната част на всеки екран.
3. Изберете **Save** (Записване).

Конфигуриране на предпочитания за денатуриране и разреждане

1. От менюто на контролния софтуер изберете **Settings** (Настройки).
2. Изберете дали библиотеките на инструмента да се денатурират и разреждат автоматично. Настройката по подразбиране е опцията, избрана за предишното изпълняване.

- За автоматично денатуриране и разреждане на библиотеки на инструмента изберете квадратчето за отметка за **Denature and Dilute On Board** (Денатуриране и разреждане на място).
- За ръчно денатуриране и разреждане на библиотеки премахнете избора от квадратчето за отметка за **Denature and Dilute On Board** (Денатуриране и разреждане на място).
Вижте *ръководството за денатуриране и разреждане на библиотеки за NextSeq 1000 и 2000 (документ № 1000000139235)* за инструкции относно ръчно денатуриране и разреждане на библиотеки.

Конфигуриране на предпочитание за автоматично почистване на реагент

1. От менюто на контролния софтуер изберете **Settings** (Настройки).
2. Изберете дали системата да почиства автоматично неизползван реагент към отдела за използвани реагенти след всяко изпълняване към опростено изхвърляне на реагенти след завършване на изпълняване:
 - За автоматично почистване поставете отметка в квадратчето на **Purge Reagent Cartridge** (Изчистване на касета с реагенти).
 - За пропускане на автоматично почистване премахнете отметката от квадратчето на **Purge Reagent Cartridge** (Изчистване на касета с реагенти) (това е настройката по подразбиране).Почистването на неизползвани реагенти добавя до 2 часа към работния процес.
3. Изберете **Save** (Записване).

Конфигуриране на софтуерни актуализации

1. От менюто на контролния софтуер изберете **Settings** (Настройки).
2. Изберете дали системата автоматично да проверява за софтуерни актуализации:
 - За да проверява автоматично, поставете отметка в квадратчето за **Autocheck for software updates** (Автоматична проверка за софтуерни актуализации).
 - За ръчна проверка премахнете отметката от квадратчето за **Autocheck for software updates** (Автоматична проверка за софтуерни актуализации).Проверката за софтуерни актуализации автоматично изисква връзка с интернет. За повече информация относно инсталирането на софтуерни актуализации вижте [Софтуерни актуализации на страница 83](#).
3. Изберете **Save** (Записване).

Промяна на яркостта на LCD

1. От менюто на контролния софтуер изберете **Settings** (Настройки).
2. Преместете плъзгача на LCD Brightness (Яркост на LCD) към желания процент.

3. Изберете **Save** (Записване).

Конфигуриране на прокси сървър

Поддръжка на прокси сървър е налична само в контролния софтуер v1.3 на NextSeq 1000/2000.

1. От менюто на контролния софтуер изберете **Settings** (Настройки).
2. Изберете настройките на сегашния прокси сървър за отваряне на екрана Proxy Settings (Прокси настройки).
3. Изберете квадратчето за отметка **Enable Proxy** (Активиране на прокси) и след това въведете адреса на IP порта на сървъра.
4. **[Незадължително]** Ако прокси сървърът изисква удостоверяване, изберете квадратчето за отметка за **Requires Username and Password** (Изисква потребителско име и парола) и след това въведете потребителско име и парола.
5. Изберете **Save** (Записване), за да запишете и валидирате прокси информацията.
6. Изберете една от следните опции:
 - Изберете **Yes, I'm Finished** (Да, аз приключих) за рестартиране на системата и прилагането на нови прокси настройки.
 - Изберете **No, Take Me Back** (Не, искам да се върна) за връщане към екрана Settings (Настройки). Новите прокси настройки са записани, но не се прилагат, докато не рестартирате системата.

Консумативи и оборудване

Този раздел описва всичко, което е включено в комплекта с реагент с условия за съхранение. Можете също да прегледате кои допълнителни консумативи и оборудване трябва да закупите, за да завършите протокола и да извършите процедурите за поддръжка и отстраняване на неизправности.

Консумативи за секвениране

Секвенирането на NextSeq 1000/2000 изисква един еднократен комплект с реагенти P2 на NextSeq 1000/2000 на Illumina или един еднократен комплект с реагенти P3 на NextSeq 1000/2000 на Illumina. Комплектът с реагенти P2 на NextSeq 1000/2000 на Illumina е наличен в три размера (за 100, 200, 300 цикъла), а комплектът с реагенти P3 на NextSeq 1000/2000 на Illumina е наличен в четири размера (за 50, 100, 200, 300 цикъла).

Системата за секвениране NextSeq 1000 е съвместима само с комплект с реагенти P2 на NextSeq 1000/2000 на Illumina.

Комплектът с реагенти осигурява касетата и поточната клетка за секвениране. Когато получавате комплект с реагенти P2 на NextSeq 1000/2000 или P3 на NextSeq 1000/2000 на Illumina:

- Съхранявайте своевременно компонентите при означените температури, за да гарантирате правилното им функциониране.
- Не отваряйте торбичката от метално фолио, докато не е инструктирано да го направите.
- Съхранявайте касетите в тяхната кутия, за да избегнете разкъсване или пробиване на фолиевата торбичка.
- Съхранявайте касетите, като стрелките сочат нагоре.


 Ако етикетът на касетата не сочи нагоре, данни за секвениране ще бъдат повлияни негативно.

Таблица 2 Компоненти на комплектите

Консуматив	Количество	Температура на съхранение	Размери
Касета	1	-25°C до -15°C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm (11,5 in × 7 in × 5 in)

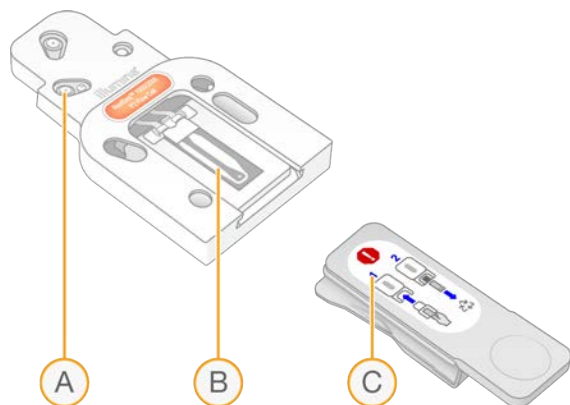
Консуматив	Количество	Температура на съхранение	Размери
Поточна клетка	1	от 2°C до 8°C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm (8,5 in × 5 in × 0,75 in)
RSB с Tween 20	1	-25°C до -15°C	4 cm x 6,6 cm x 5 cm (1,6 in x 2,6 in x 2 in)

*Доставя се при стайна температура.

И двата консуматива имат идентификатори за проследяване и гарантиране на съвместимостта. Касетата и поточната клетки използват RFID¹.

Поточна клетка

Поточната клетка е разграфена поточна клетка с единична линия. Поточната клетка на базата на стъкло е обвита в пластмасова касета. Сивият предпазител покрива и се подава от поточната клетка за осигуряване на безопасно боравене.



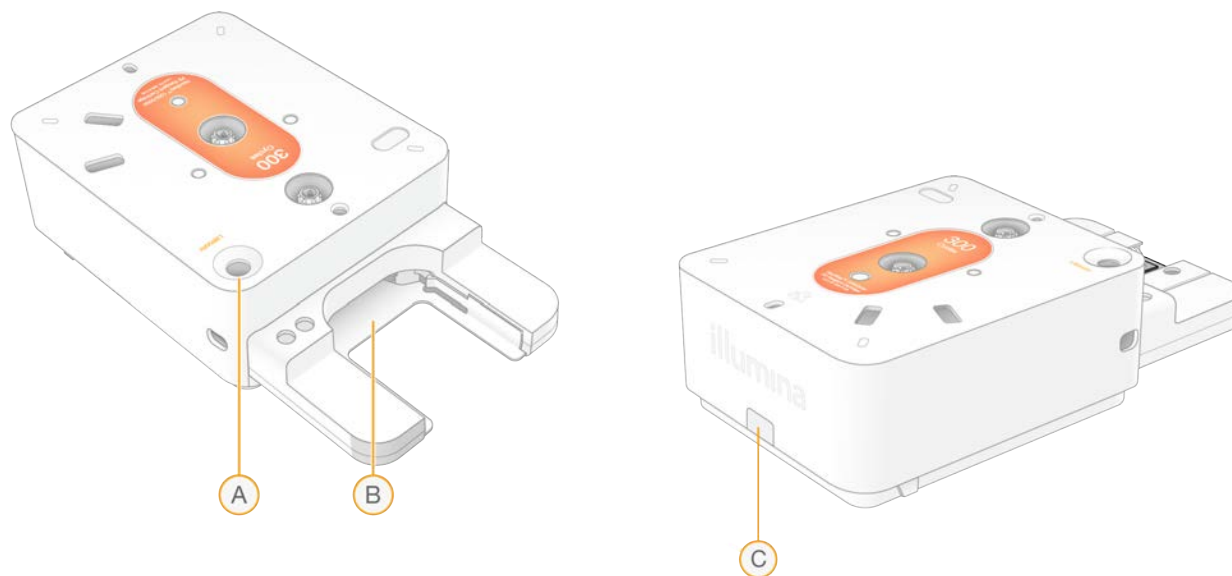
- A. Пластмасова касета
- B. Поточна клетка
- C. Сив предпазител

Милиони нанокладенчета покриват вътрешната повърхност на поточната клетка. Клъстерите се генерират в нанокладенчетата, от които след това се извършва реакцията за секвениране. Определената подредба на нанокладенчетата повишава изходните разчитания и данни.

¹радиочестотна идентификация

Касета

Касетата с реагенти за секвениране е предварително напълнена с реагенти за клъстериране, секвениране, удвояване на краища и индексване. За библиотеките е наличен запечатан с фолио резервоар, а в предната част има слот за поточната клетка.



- A. Резервоар за библиотека
- B. Слот на поточната клетка
- C. Тапа за дрениране

Касетата съдържа всички консумативи за изпълняване: реагенти, библиотека и поточна клетка. Библиотеката и поточната клетка се зареждат в размразената касета, която след това се зарежда на инструмента. След започване на изпълняването реагентите и библиотеката се прехвърлят автоматично от касетата в поточната клетка.

Касетата съдържа помпите, клапите и всички флуиди за системата, включително резервоар в долната част за събиране на използваните реагенти. Касетата се изхвърля след изпълняване, така че измивания на инструмента не са необходими.

Поддържан брой цикли

Етикетът на касетата посочва колко цикъла са анализирани, а не колко цикъла са извършени. Поточната клетка е съвместима с всякакъв брой цикли и всякакъв тип разчитане.

Всички касета за 100 и 200 цикъла включват допълнителни 38 цикъла. Касетата за 300 цикъла включва допълнителни 27 цикъла. Например касетата за 300 цикъла предоставя достатъчно реагенти за до 327 цикъла на секвениране. За информация относно това колко цикъла да се секвенират вижте [Брой цикли в едно разчитане на страница 33](#).

Описания на символите

В следната таблица са описани символите на консумативите или опаковките на консумативите.

Символ	Описание
	Срокът на годност на консумативите изтича. За най-добри резултати използвайте консуматива преди тази дата.
	Посочва производителя (Illumina).
	Предназначената употреба е само за изследователски цели (RUO).
	Посочва номера на частта, така че консумативът да може да се идентифицира. ¹
	Посочва партидни код, за да идентифицира партидата или серията, в която е произведен консумативът. ¹
	Посочва риск за здравето.
	Диапазон на температурата за съхранение в градуси по Целзий. Съхранявайте консуматива в посочения диапазон. ²

Допълнителни консумативи

Закупете следните консумативи за секвениране и поддръжка.

Консумативи за секвениране

Таблица 3 Консумативи за секвениране

Консуматив	Доставчик	Цел
Ръкавици за еднократна употреба, без талк	Общ доставчик на лабораторията	За общи цели.
Комплект с реагенти P2 (v3) на NextSeq 1000/2000	Illumina: каталожен № 20046811 (100 цикъла) каталожен № 20046812 (200 цикъла) каталожен № 20046813 (300 цикъла)	Предоставя касетата с реагенти, поточна клетка и RSB с Tween 20 за NextSeq 1000/2000 за единично изпълняване. Съвместимо с NextSeq 1000 и NextSeq 2000.
Комплект с реагенти NextSeq 2000 P3	Illumina: каталожен № 20046810 (50 цикъла) каталожен № 20040559 (100 цикъла) каталожен № 20040560 (200 цикъла) каталожен № 20040561 (300 цикъла)	Предоставя касетата с реагенти, поточна клетка и RSB с Tween 20 за NextSeq 1000/2000 за единично изпълняване. Съвместим само с NextSeq 2000.
Микроепруветки, 1,5 ml	Fisher Scientific, каталожен № 14-222-158 или еквивалентни епруветки с ниско свързване	Разреждане на библиотеките до зареждащата концентрация.
Накрайници за пипета, 10 µl	Общ доставчик на лабораторията	Библиотеки за разреждане.
Накрайници за пипета, 20 µl	Общ доставчик на лабораторията	Разреждане и зареждане на библиотеки.
Накрайници за пипета, 200 µl	Общ доставчик на лабораторията	Библиотеки за разреждане.
Накрайници за пипета, 1000 µl	Общ доставчик на лабораторията	Пробиване на фолиото на резервоара с библиотеки.
[Незадължително] PhiX Control v3	Illumina, каталожен № FC-110-3001	Извършване на изпълняване на дейност само с PhiX или пикове във PhiX Control.

Консуматив	Доставчик	Цел
[Незадължително] Хартиени кърпи	Общ доставчик на лабораторията	Изсушаване на касетата след водна баня.

Консумативи за поддръжка

Таблица 4 Консумативи за поддръжка

Консуматив	Доставчик	Цел
Ръкавици за еднократна употреба, без талк	Общ доставчик на лабораторията	За общи цели.
Резервен въздушен филтър NextSeq 1000/2000*	Illumina, каталожен № 20029759	Подмяна на въздушния филтър на всеки шест месеца.

* Инструментът се доставя с един инсталиран и един резервен. След изтичане на гаранцията консумативите се набавят от потребителя. Дръжте в опаковката до момента на употреба.

Допълнително оборудване

Закупете следното оборудване за целите на секвениране.

Артикул	Източник	Цел
Фризер, от -25°C до -15°C	Общ доставчик на лабораторията	Съхранение на касетата.
Кофа с лед	Общ доставчик на лабораторията	Оставяне настрана на библиотеки до секвениране.
Пипета, 10 µl	Общ доставчик на лабораторията	Разреждане на библиотеките до зареждащата концентрация.
Пипета, 20 µl	Общ доставчик на лабораторията	Разреждане на библиотеки до концентрацията на зареждане и зареждане на библиотеки в касетата.
Пипета, 200 µl	Общ доставчик на лабораторията	Разреждане на библиотеките до зареждащата концентрация.

Артикул	Източник	Цел
Хладилник, от 2°C до 8°C	Общ доставчик на лабораторията	Съхраняване на поточната клетка или размразяване на касетата.
<p>[Незадължително] Една от следните водни бани с контролирана температура или еквивалент, който може да поддържа 25°C:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Циркулираща водна баня Thermo Scientific Precision 35L (може да държи 5 касети едновременно) • Електронна циркулираща водна баня SHEL LAB 22L (може да държи 3 касети едновременно) 	<ul style="list-style-type: none"> • Thermo Fisher Scientific, каталожен № TSCIR 35 • Shel Lab, каталожен № SWBC22 	Размразяване на касетата.

Протокол

Този раздел осигурява инструкции стъпка по стъпка как се подготвят консумативи, разреждат библиотеки и се конфигурира изпълняване на секвениране в един от четирите режима на изпълняване (Cloud (Облачен), Hybrid (Хибриден) и Local (Локален) режими използват DRAGEN или секвенциалния концентратор BaseSpace, докато Standalone mode (Самостоятелен режим) е самостоятелно изпълняване, предназначено за генериране само на cBCL данни за работни процеси за персонализирани анализи).

Когато работите с реагенти и други химикали, носете предпазни очила, лабораторна престилка и ръкавици без талк.

Уверете се, че разполагате с необходимите консумативи и оборудване, преди да стартирате протокол. Вижте [Консумативи и оборудване на страница 25](#).

Следвайте протоколите в показания ред, като използвате посочените обеми, температури и продължителности.

Съображения за секвениране

Преди да стартирате протокола, прегледайте следната информация за приготвяне за разреждане на библиотеки и задаване на изпълняването. Постигането на оптималната зареждащата концентрация е критично за успешното секвениране и анализ. Въвеждането на правилен брой цикли в разчитане подпомага да се осигури оптимално извеждане на данни.

Зареждащи обем и концентрации

Зареждащият обем е 20 µl. Зареждащата концентрация варира в зависимост от типа библиотека:

Тип библиотека	Зареждаща концентрация (pM)
AmpliSeq™ за Illumina Library PLUS	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep with Enrichment	1000
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA PCR-Free	1000

Тип библиотека	Зареждаща концентрация (pM)
100% PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1200
TruSeq DNA Nano 550	1500
TruSeq Stranded mRNA	1000

За други типове библиотеки 650 pM е препоръчителната начална зареждаща концентрация. Оптимизирайте концентрацията в последващите изпълнявания, за да идентифицирате зареждащата концентрация, която непрекъснато управлява данни, които отговарят на спецификациите.

i | За оптимизиране на зареждащата концентрация използвайте измерванията за % зареждаща концентрация в изходния файл `PrimaryAnalysisMetrics.csv`, наличен след завършване на изпълняването. Ако % на зареждащата концентрация е < 95%, увеличете зареждащата концентрация с увеличение от 100 pM при следващите изпълнявания.

Брой цикли в едно разчитане

За всяко разчитане въвеждането на минимум 26 цикъла и максимум 151 цикъла помага за гарантиране на качеството на данните. Общият брой цикли зависи от вашия експеримент. Контролният софтуер NextSeq 1000/2000 изисква най-малко 1 цикъл за Read 1 (Разчитане 1), но показва предупреждение, когато броят на циклите в Read 1 (Разчитане 1) е по-малък от 26.

Общият брой цикли за Read 1 (Разчитане 1), Index 1 (Индекс 1), Index 2 (Индекс 2) и Read 2 (Разчитане 2) може да бъде по-голям от броя на циклите, които се поддържат от комплекта заедно с 38 цикъла за комплектите с 100 цикъла и 200 цикъла и 27 цикъла за комплектите с 300 цикъла P3. Контролният софтуер NextSeq 1000/2000 ще покаже предупреждение, когато Index 1 (Индекс 1) и Index 2 (Индекс 2) са с по-малко от 6 цикъла. Предупреждението няма да се покаже, ако Index 1 (Индекс 1) или Index 2 (Индекс 2) е с 0 цикъла.

Минималният и максималният брой на циклите включват един допълнителен цикъл. Винаги добавяйте по един цикъл към желаната дължина на разчитането, за да коригирате ефектите от фазирането и префазирането. Дължината на разчитане представлява броят цикли на *секвениране* в Read 1 (Разчитане 1) и Read 2 (Разчитане 2), които включват допълнителни цикли и индексни цикли. За повече информация вижте [Коригиране на фазиране в Работен процес на анализа в реално време на страница 63](#).

Примерно конфигуриране на изпълняване:

- За дължина на разчитането 35 (единично разчитане) въведете **36** в полето Read 1 (Разчитане 1).
- За дължина на разчитането 150 за дадено разчитане (сдвояване на краища) въведете **151** в полето Read 1 (Разчитане 1) и **151** в полето Read 2 (Разчитане 2).

Планиране на изпълняване на секвениране в секвенциален концентратор BaseSpace

Използвайте Run Setup (Конфигуриране на изпълняване) в секвенциален концентратор BaseSpace за създаване и конфигуриране на настройки за изпълняване. Ако конфигурирате изпълняване в Cloud mode (Облачен режим) или Hybrid mode (Хибриден режим), подайте конфигурацията за изпълняване към вашия акаунт в секвенциален концентратор BaseSpace по отношение на планирания списък с изпълнявания в раздела Planned Runs (Планирани изпълнявания). Изпълняванията, налични за секвениране на системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000, се показват в раздела Planned Runs (Планирани изпълнявания). Ако конфигурирате изпълняване в Local mode (Локален режим), използвайте Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмента) за създаване и експортиране на вашата бланка с проба във файлов формат v2. Вместо това вижте [Настройки на бланка с проба v2 на страница 94](#) за създаване на бланка с проба без секвенциален концентратор BaseSpace чрез предоставения шаблон.

Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмента) на секвенциален концентратор BaseSpace не поддържа повече от 1536 проби.

Конфигуриране на изпълняване

1. Навигирайте до секвенциалния концентратор BaseSpace.
2. Въведете своите имейл адрес и парола за секвенциалния концентратор BaseSpace, след което изберете **Sign In** (Влизане).
3. Изберете раздела **Runs** (Изпълняване) и след това изберете падащия списък **New Run** (Ново изпълняване).
4. Изберете **NextSeq 1000/2000**.
5. В полето Run Name (Име на изпълняването) въведете уникално име по ваше предпочитание, чрез което да идентифицирате текущото изпълняване.
Името на изпълняването може да съдържа най-много 225 цифрено-буквени знака, интервали, тирета и долни черти.
6. Изберете едно от следните местоположения за анализ.
 - **BaseSpace** – анализира данните за секвениране в облака.
 - **Local** (Локално) – анализира данните за секвениране на инструмента или генерира Sample Sheet v2 (Бланка с проба v2) за Local (Локален режим) или Hybrid mode (Хибриден режим).
7. Изберете типа и версията на анализа.
За повече информация относно вторичните анализи вижте документацията за [Исходни файлове за вторичен анализ в DRAGEN на страница 68](#) или приложението на секвенциалния концентратор BaseSpace. Ако сте избрали единичноклетъчен PPK анализ в DRAGEN, вижте

страницата за продуктови файлове на NextSeq 1000/2000 за информация относно съвместимост на комплект за приготвяне на библиотеки на единичноклетъчна РНК на трети страни.

i | За анализ на инструмента избраната версия трябва да съвпада с версията на DRAGEN, която е инсталирана на инструмента. За потвърждаване на версията на DRAGEN, която е инсталирана на инструмента, вижте [Актуализации на работния процес и лиценза на DRAGEN на страница 84](#).

8. **[Незадължително]** Конфигурирайте персонализирани индексни комплекти, както следва. Ако използвате повече от една библиотека, библиотеките трябва да имат еднакви дължини на индексното разчитане.
 - a. Изберете **Add Custom Index Adapter Kit** (Добавяне на персонализиран комплект на индексен адаптер) от падащия списък Index Adapter Kit (Комплект за индексен адаптер).
 - b. Изберете тип на шаблона и въведете име на комплекта, адаптерни секвенции, индексни стратегии и индексни секвенции.
Уверете се, че вторите индексни (i5) адаптерни секвенции са с предна ориентация.
 - c. Изберете **Create New Kit** (Създаване на нов комплект).
9. **[Незадължително]** Конфигурирайте комплекта за приготвяне на персонализирани библиотеки, както следва.
 - a. Изберете **Add Custom Library Prep Kit** (Добавяне на комплект за приготвяне на персонализирани библиотеки) от падащия списък Library Prep Kit (Комплект за приготвяне на библиотеки).
 - b. Въведете името, типовете разчитания, циклите за разчитания по подразбиране и съвместимите комплекти за индексни адаптери за вашия комплект за приготвяне на персонализирани библиотеки.
 - c. Изберете **Create New Kit** (Създаване на нов комплект).
10. Изберете следните настройки за инструмент. Препоръчаните опции за автоматично избрани в зависимост от комплекта за приготвяне на библиотеки. Някои комплекти за приготвяне на библиотеки имат фиксиран брой индексни разчитания и типове разчитания, които не могат да бъдат променени.
 - Комплект за приготвяне на библиотеки
 - Комплект за индексен адаптер
 - Брой индексни разчитания
 - Тип разчитане
 - Брой секвенционални цикли на разчитане

i | Ако Not Specified (Не е посочено) е избрано за комплекта за приготвяне на библиотеки, броят на индексните разчитания не се актуализира, докато индексните секвенции се въведат в раздела Sample Data (Данни за проба).

11. Въведете информацията на пробата в електронната таблица Sample Data (Данни за проба) чрез една от следните опции. За групиране на проби за събиране на данни по време на анализа след гена назначете име за групата в колоната Project (Проект).
 - Изберете **Import Data** (Импортиране на данни) и изберете вашата бланка с проба. Уверете се, че настройките на бланката с проба отговарят на изисквания за форматиране. Вижте [Настройки на бланка с проба v2 на страница 94](#). Промяната на вашата бланка с проба след първоначалното изтегляне може да доведе до неуспех в анализа.
 - Поставете идентификатори на пробите и позициите на кладенчето на индексната плоча или индекси i7 и i5 директно от външен файл. Преди поставяне въведете броя на редовете на проби в полето Rows (Редове) и след това изберете +. Идентификаторите на пробите може да съдържат до 20 буквено-цифрени знака, дефиси и долни черти.
 -  | Индексните плаки с фиксирана подредба изискват въвеждания за позиции на кладенче. Индексите, които нямат фиксирана подредба, изискват въвеждания за индекси i7 и i5. Индексите i5 трябва да бъдат въведени в предна ориентация.
 - Въведете идентификатори на пробите и съответните позиции или индекси на кладенчета ръчно. Ако Not Specified (Не е посочено) е избрано за комплекта за приготвяне на библиотеки, въведете секвенциите за Index 2 (Индекс 2) (i5) в предна ориентация.
12. Изберете **Next** (Следващ).

Конфигуриране на вторичен анализ

Конфигурирайте настройките за типа на анализа за изпълняването ви. За повече информация относно работните процеси на анализ в DRAGEN вижте [Исходни файлове за вторичен анализ в DRAGEN на страница 68](#).

Конвертиране в BCL на DRAGEN на Illumina

Използвайте следните стъпки за конфигуриране на анализа на конвертиране в BCL на DRAGEN на Illumina.

1. Въведете следните незадължителни настройки.

Настройка	Описание
AdapterRead1 (Адаптерно разчитане 1)	Адаптерна секвенция за разчитане 1. Ако използвате комплект за приготвяне на библиотека на Illumina, оставете полето за AdapterRead1 (Адаптерно разчитане 1) празно.
AdapterRead2 (Адаптерно разчитане 2)	Адаптерна секвенция за разчитане 2. Ако използвате комплект за приготвяне на библиотека на Illumina, оставете полето за AdapterRead2 (Адаптерно разчитане 2) празно.

Настройка	Описание
BarcodeMismatchesIndex1 (Индекс за несъвпадения на баркод 1)	Броят на позволени несъвпадения между първото индексно разчитане и индексната секвенция. Стойността по подразбиране е 1. Ако баркодът е 6 бита, препоръчаната стойност е 0.
BarcodeMismatchesIndex2 (Индекс за несъвпадения на баркод 2)	Броят на позволени несъвпадения между второто индексно разчитане и индексната секвенция. Стойността по подразбиране е 1. Ако баркодът е 6 бита, препоръчаната стойност е 0.
OverrideCycles (Презаписване на цикли)	Низ, използван за задаване на UMI цикли и маскиране на цикли на разчитане. Позволени са следните стойности: <ul style="list-style-type: none"> • N – задава цикли за игнориране. • Y – задава цикли за секвениране. • I – задава индексни цикли. • U – задава UMI цикли за изрязване. Всеки елемент е разделен с точка и запетая. Следните са примери за входни данни за OverrideCycles (Презаписване на цикли). U8Y143; I8; I8; U8Y143 N10Y66; I6; N10Y66

- Изберете дали да запишете копие на вашите FASTQ файлове. FASTQ файловете се генерират само ако изберете да запазите тези FASTQ файлове.
- Изберете една от следните опции за формат на изходните FASTQ файлове:
 - **gzip** – записва FASTQ файловете във формат gzip.
 - **DRAGEN** – записва FASTQ файловете във формат oga.
- Завършете конфигурацията за изпълняване.
 - За да изпратите конфигурацията за изпълняване към вашия акаунт в секвенциален концентратор BaseSpace, изберете **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Изпълняванията, подадени към секвенциалния концентратор BaseSpace, се появяват в списъка с планирани изпълнявания и са налични за системи, които използват Cloud (Облачен режим) или Hybrid mode (Хибриден режим).
 - За да запазите конфигурацията за изпълняване като бланка с проба във файлов формат v2, изберете **Export Sample Sheet** (Експортиране на бланка с проба) от падащия списък **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Бланката с проба се изисква за започване на изпълнявания на системи, използващи Local mode (Локален режим). Тази опция е налична само ако Local (Локален) е избран за местоположението на анализа.

Illumina DRAGEN Enrichment (Обогатяване в DRAGEN на Illumina)

Използвайте следните стъпки за конфигуриране на анализа за обогатяване в DRAGEN на Illumina.

1. Изберете референтен геном.
Ако е възможно, използвайте референтен геном с алтернативен локус.
2. Изберете *.bed файл, съдържащ регионите, които искате да са таргетни, или качете нов персонализиран файл.
Уверете се, че референтният геном на BED файла съвпада с референтния геном, избран в стъпка 1. За нов персонализиран BED файл използвайте следния формат за наименоване:
`name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed.`
 - **Local mode** (Локален режим) – изберете **Select Custom File (Local)** (Избиране на персонализиран файл (Локален), за да качите единично изпълняване или **Upload Custom File (BaseSpace)** (Качване на персонализиран файл (BaseSpace) за многократна употреба.
 - **Cloud or Hybrid mode** (Облачен или Хибриден режим) – изберете **Upload Custom File (BaseSpace)** (Качване на персонализиран файл (BaseSpace)). Персонализираният BED файл е наличен само в Workgroup (Работна група), в която е бил качен.
3. Изберете инструмент за обозначаване или за герминативна линия, или за соматичен вариант.
4. [Незадължително] Ако използвате инструмент за обозначаване на соматичен вариант, изберете файла за смущения на основната линия. Вижте [Импортиране на файлове за смущения на основната линия на страница 19](#) за повече информация.
5. Изберете изходен формат за карта/подравняване.
6. Изберете дали да запишете копие на вашите FASTQ файлове. FASTQ файловете се генерират само ако изберете да запазите тези FASTQ файлове.
7. Изберете една от следните опции за формат на изходните FASTQ файлове:
 - **gzip** – записва FASTQ файловете във формат gzip.
 - **DRAGEN** – записва FASTQ файловете във формат oga.
8. Завършете конфигурация на изпълняването.
 - За да изпратите конфигурацията за изпълняване към вашия акаунт в секвенциален концентратор BaseSpace, изберете **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Изпълняванията, подадени към секвенциалния концентратор BaseSpace, се появяват в списъка с планирани изпълнявания и са налични за системи, които използват Cloud (Облачен режим) или Hybrid mode (Хибриден режим).
 - За да запазите конфигурацията за изпълняване като бланка с проба във файлов формат v2, изберете **Export Sample Sheet** (Експортиране на бланка с проба) от падащия списък **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Поддържащите файлове за

бланка с проба и вторичен анализ са свалени в *.zip папка и се изискват за започване на изпълнявания на системи, които използват Local mode (Локален режим). Тази опция е налична само ако Local (Локален) е избран за местоположението на анализа.

Герминативна линия в DRAGEN на Illumina

Използвайте следните стъпки за конфигуриране на анализа за герминативна линия в DRAGEN на Illumina.

1. Изберете референтен геном.
Ако е възможно, използвайте референтен геном с алтернативен локус.
2. Изберете изходен формат за карта/подравняване.
3. Изберете дали да запишете копие на вашите FASTQ файлове. FASTQ файловете се генерират само ако изберете да запазите тези FASTQ файлове.
4. Изберете една от следните опции за формат на изходните FASTQ файлове:
 - **gzip** – записва FASTQ файловете във формат gzip.
 - **DRAGEN** – записва FASTQ файловете във формат oga.
5. Завършете конфигурация на изпълняването.
 - За да изпратите конфигурацията за изпълняване към вашия акаунт в секвенциален концентратор BaseSpace, изберете **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Изпълняванията, подадени към секвенциалния концентратор BaseSpace, се появяват в списъка с планирани изпълнявания и са налични за системи, които използват Cloud (Облачен режим) или Hybrid mode (Хибриден режим).
 - За да запазите конфигурацията за изпълняване като бланка с проба във файлов формат v2, изберете **Export Sample Sheet** (Експортиране на бланка с проба) от падащия списък **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Поддържащите файлове за бланка с проба и вторичен анализ са свалени в *.zip папка и се изискват за започване на изпълнявания на системи, които използват Local mode (Локален режим). Тази опция е налична само ако Local (Локален) е избран за местоположението на анализа.

Illumina DRAGEN RNA

Използвайте следните стъпки за конфигуриране на анализа за Illumina DRAGEN RNA.

1. Изберете референтен геном.
Ако е възможно, използвайте референтен геном без алтернативен локус.
2. Изберете изходен формат за карта/подравняване.
3. Изберете дали да запишете копие на вашите FASTQ файлове. FASTQ файловете се генерират само ако изберете да запазите тези FASTQ файлове.
4. Изберете една от следните опции за формат на изходните FASTQ файлове:
 - **gzip** – записва FASTQ файловете във формат gzip.

- **DRAGEN** – записва FASTQ файловете във формат oga.
5. **[Незадължително]** Качете файл за анотация на РНК във формат за прехвърляне на гени (GTF).
- **Local mode** (Локален режим) – изберете **Select Custom File (Local)** (Избиране на персонализиран файл (Локален), за да качите единично изпълняване или **Upload Custom File (BaseSpace)** (Качване на персонализиран файл (BaseSpace) за многократна употреба.
 - **Cloud or Hybrid mode** (Облачен или Хибриден режим) – изберете **Upload Custom File (BaseSpace)** (Качване на персонализиран файл (BaseSpace)). GTF файлът е наличен само в Workgroup (Работна група), в която е бил качен.

След като GTF файлът е бил качен в работна група в секвенциален концентратор BaseSpace, изберете файла RNA Annotation (Анотация на РНК) от падащото меню.

6. Изберете дали да активирате диференциална експресия.
7. Ако активирате диференциална експресия, изберете контролна или сравнителна стойност за всяка проба.

Във всяка сравнителна група всякаква проба, маркирана като контрола, е сравнена с всички проби, маркирани като сравнителни. Ако пробата не съдържа контролна или сравнителна стойност, изберете **na** (не е приложимо) като стойността.

8. Завършете конфигурация на изпълняването.
- За да изпратите конфигурацията за изпълняване към вашия акаунт в секвенциален концентратор BaseSpace, изберете **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Изпълняванията, подадени към секвенциалния концентратор BaseSpace, се появяват в списъка с планирани изпълнявания и са налични за системи, които използват Cloud (Облачен режим) или Hybrid mode (Хибриден режим).
 - За да запазите конфигурацията за изпълняване като бланка с проба във файлов формат v2, изберете **Export Sample Sheet** (Експортиране на бланка с проба) от падащия списък **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Поддържащите файлове за бланка с проба и вторичен анализ са свалени в *.zip папка, ако е осигурен незадължителен GTF файл, и се изискват за започване на изпълнявания на системи, които използват Local mode (Локален режим). Тази опция е налична само ако Local (Локален) е избран за местоположението на анализа.

Единичноклетъчна РНК в DRAGEN на Illumina

Използвайте следните стъпки за конфигуриране на единичноклетъчен РНК анализ в DRAGEN на Illumina.

1. Изберете референтен геном.
- Ако е възможно, използвайте референтен геном без алтернативен локус.

2. **[Незадължително]** Качете файл за анотация на РНК във формат за прехвърляне на гени (GTF).
 - **Local mode** (Локален режим) – изберете **Select Custom File (Local)** (Избиране на персонализиран файл (Локален), за да качите единично изпълняване или **Upload Custom File (BaseSpace)** (Качване на персонализиран файл (BaseSpace) за многократна употреба.
 - **Cloud or Hybrid mode** (Облачен или Хибриден режим) – изберете **Upload Custom File (BaseSpace)** (Качване на персонализиран файл (BaseSpace)). GTF файлът е наличен само в Workgroup (Работна група), в която е бил качен.

След като GTF файлът е бил качен в работна група в секвенциален концентратор BaseSpace, изберете файла RNA Annotation (Анотация на РНК) от падащото меню.
3. Изберете изходен формат за карта/подравняване.
4. Изберете дали да запишете копие на вашите FASTQ файлове. FASTQ файловете се генерират само ако изберете да запазите тези FASTQ файлове.
5. Изберете една от следните опции за формат на изходните FASTQ файлове:
 - **gzip** – записва FASTQ файловете във формат gzip.
 - **DRAGEN** – записва FASTQ файловете във формат oga.
6. Изберете конфигурация, подобна на типа на комплекта за приготвяне на библиотеки. Например, ако се избрали Single Cell RNA Library Kit 1 (Комплект 1 за библиотека на единичноклетъчна РНК) за комплект за приготвяне на библиотека, изберете Type 1 (Тип 1) за Configuration Type (Тип конфигурация).
7. Изберете разчитането на баркод.
8. **[Незадължително]** Редактирайте броя на базите в баркодовете и UMI. Стойностите се попълват автоматично в комплекта за приготвяне на библиотека и типа на конфигурацията, които са избрани.
9. Изберете ориентация на веригата.
10. **[Незадължително]** Изберете файл, който съдържа вашите баркод секвенции, или качете нов персонализиран файл.
11. Ако използвате тип на конфигурация Advanced (Напреднал)/Custom (Персонализиран), въведете стойностите на броя на презаписаните цикли, позицията на баркода и позицията на UMI.
12. Завършете конфигурация на изпълняването.
 - За да изпратите конфигурацията за изпълняване към вашия акаунт в секвенциален концентратор BaseSpace, изберете **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Изпълняванията, подадени към секвенциалния концентратор BaseSpace, се появяват в списъка с планирани изпълнявания и са налични за системи, които използват Cloud (Облачен режим) или Hybrid mode (Хибриден режим).

- За да запазите конфигурацията за изпълняване като бланка с проба във файлов формат v2, изберете **Export Sample Sheet** (Експортиране на бланка с проба) от падащия списък **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Поддържащите файлове за бланка с проба и вторичен анализ са свалени в *.zip папка, ако е осигурен незадължителен GTF файл, и се изискват за започване на изпълнявания на системи, които използват Local mode (Локален режим). Тази опция е налична само ако Local (Локален) е избран за местоположението на анализа.

Illumina DRAGEN Amplicon

Използвайте следните стъпки за конфигуриране на анализа Illumina DRAGEN Amplicon.

1. Изберете референтен геном.
2. Изберете *.bed файл, съдържащ регионите, които искате да са таргетни, или качете нов персонализиран файл.
Уверете се, че референтният геном на BED файла съвпада с референтния геном, избран в стъпка 1. За нов персонализиран BED файл използвайте следния формат за наименоване: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.
 - **Cloud or Hybrid mode** (Облачен или Хибриден режим) – изберете **Upload Custom File (BaseSpace)** (Качване на персонализиран файл (BaseSpace)). Персонализираният BED файл е наличен само в Workgroup (Работна група), в която е бил качен.
 - **Local mode** (Локален режим) – изберете **Select Custom File (Local)** (Избиране на персонализиран файл (Локален), за да качите единично изпълняване или **Upload Custom File (BaseSpace)** (Качване на персонализиран файл (BaseSpace) за многократна употреба).
3. Изберете инструмент за обозначаване или за герминативна линия, или за соматичен вариант.
4. Изберете изходен формат за карта/подравняване.
5. [Локален] Изберете дали да запишете копие на вашите FASTQ файлове. FASTQ файловете се генерират само ако изберете да запазите тези FASTQ файлове.
6. Изберете дали да запишете копие на вашите FASTQ файлове. FASTQ файловете се генерират само ако изберете да запазите тези FASTQ файлове.
7. Изберете една от следните опции за формат на изходните FASTQ файлове:
 - **gzip** – записва FASTQ файловете във формат gzip.
 - **DRAGEN** – записва FASTQ файловете във формат oga.
8. Завършете конфигурация на изпълняването.

- За да изпратите конфигурацията за изпълняване към вашия акаунт в секвенциален концентратор BaseSpace, изберете **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Изпълняванията, подадени към секвенциалния концентратор BaseSpace, се появяват в списъка с планирани изпълнявания и са налични за системи, които използват Cloud (Облачен режим) или Hybrid mode (Хибриден режим).
- [Локален] За да запазите конфигурацията за изпълняване като бланка с проба във файлов формат v2, изберете **Export Sample Sheet** (Експортиране на бланка с проба) от падащия списък **Submit Run** (Подаване на изпълняване). Поддържащите файлове за бланка с проба и вторичен анализ са свалени в *.zip папка и се изискват за започване на изпълнявания на системи, които използват Local mode (Локален режим). Тази опция е налична само ако Local (Локален) е избран за местоположението на анализа.

Размразяване на касетата в торбичка и поточната клетка

Тази стъпка размразява касетата *в неотворената торбичка* и подготвя поточната клетка. Размразете касетата в торбичка чрез използване на един от трите метода: контролирана водна баня, хладилник или на въздух при стайна температура. Използвайте касетата веднага след размразяване без повторно замразяване. Ако нямате възможност да използвате касетата веднага след размразяване, вижте [Връщане на консумативи за съхранение на страница 89](#).

Фигура 4 Касета в торбичка



Размразяване на касета в контролирана водна баня

1. Сложете нов чифт ръкавици без талк и премахнете касетата от мястото за съхранение.

2. Извадете касетата от кутията, но *не отваряйте торбичката от метално фолио*.

! | Размразяването на разкъсана или продупчена торбичка на водна баня може да доведе до провалено секвениране. Размразете вместо това на стайна температура или в хладилник.

3. Размразете касетата в торбичка в контролирана водна баня на 25°C за 6 часа:

- Поддържайте дълбочината на водата най-малко 9,5 – 10 cm, независимо от това колко касети размразявате.
- Задайте водна баня с контролирана температура на 25°C.
- Поставете етикета на торбичката нагоре и я поставете във водна баня без потапяне.

! | Не се опитвайте да натискате касетата, за да се потопи. Ако етикетът на торбичката не сочи нагоре или ако касетата се обърне по време на размразяване, данните от секвенирането ще бъдат повлияни отрицателно.

- Не превишавайте 8 часа на водна баня.
- Не размразявайте едновременно повече касети, отколкото се поддържат във водната баня. За съвместими водни бани вижте [Допълнително оборудване на страница 30](#).
- Не струпвайте касетите.

4. Премахнете касетата от водната баня и подсушете с хартиени кърпи.

Размразяване на касета в хладилник

1. Сложете нов чифт ръкавици без талк.

2. Един ден преди очакваното изпълняване променете съхранението на касетата от -25°C на -15°C.

3. Извадете касетата от кутията, но *не отваряйте торбичката от метално фолио*.

4. Позиционирайте касетата на стайна температура така, че етикетът да сочи нагоре и от всички страни да може да циркулира въздух, включително откъм дъното.

! | Ако етикетът на торбичката не сочи нагоре, данните от секвенирането ще бъдат повлияни отрицателно.

5. Размразете на стайна температура за 6 часа.


6. Позиционирайте касетата в хладилник при температура 2°C до 8°C така, че етикетът да сочи нагоре и да може да циркулира въздух от страни.

! | Ако етикетът на торбичката не сочи нагоре, данните от секвенирането ще бъдат повлияни отрицателно.

7. Размразете в хладилника за 12 часа. Не превишавайте 72 часа.

Размразяване на касета на стайна температура

1. Сложете нов чифт ръкавици без талк.
2. Извадете касетата от мястото на съхранение при температура от -25°C до -15°C .
3. Извадете касетата от кутията, но *не отваряйте торбичката от метално фолио*.
4. Позиционирайте касетата така, че етикетът да сочи нагоре и да може да циркулира въздух отстрани и отгоре.

 Ако етикетът на торбичката не сочи нагоре, данните от секвенирането ще бъдат повлияни отрицателно.

5. Размразете на стайна температура за 9 часа. Не превишавайте 16 часа.

Подготвяне на поточната клетка и касета

1. Пригответе поточната клетка, както следва:
 - a. Извадете нова поточна клетка от мястото на съхранение при температура от 2°C до 8°C .
 - b. Оставете неотворената опаковка да престои при стайна температура за 10 – 15 минути, за да предотвратите кондензация, когато премахвате поточната клетка от опаковката. Приготвянето на поточната клетка в този момент гарантира, че ще достигне стайна температура навреме.
2. Ако използвате метода за размразяване в хладилник:
 - a. Извадете размразената касета от мястото за съхранение на температура от 2°C до 8°C .
 - b. Оставете неотворената касета да престои на стайна температура за най-малко 15 минути преди секвениране. Не превишавайте 1 час.

Разреждане на библиотеки

Ако използвате денатуриране и разреждане на инструмента, тази стъпка разрежда библиотеките до приложимите зареждащи концентрации. Незадължителен пик от 2% PhiX¹ предоставя допълнителни измервания, базово разнообразие или положителна контрола. Процентният пик на PhiX трябва да бъде увеличен за библиотеки с по-ниско разнообразие на бази.

Ако денатурирате или разреждате библиотеки ръчно, използвайте *ръководството за денатуриране и разреждане на библиотеки за NextSeq 1000 и 2000 (документ № 1000000139235)*. Тази стъпка се прилага само при денатуриране и разреждане на инструмента.

¹PhiX е малка, готова за употреба библиотека на Illumina с балансирано нуклеотидно представяне.

Разреждане на библиотека до 2 nM

1. [Незадължително] Извадете фабричен 10 nM PhiX от мястото за съхранение при -25°C до -15°C.
PhiX е необходим само за незадължителен пик или изпълняване само за PhiX.
2. Незадължително Размразете PhiX на стайна температура за 5 минути и след това количествено определете чрез метод, основан на флуоресценция, като Qubit, за да потвърдите концентрацията на PhiX.
Ако количественото определяне не е възможно, преминете към концентрация 10 nM.
3. Вортиксийрайте библиотеката или PhiX за кратко, след което центрофугирайте при 280 × g за 1 минута.
4. Чрез RSB с Tween 20 като разреждател подгответе библиотека с най-малко 24 µl 2 nM в микроепруветки с ниско свързване.
За инструкциите на пик PhiX вижте [Добавяне на контрола PhiX \(незадължително\) на страница 47](#).
5. Вортиксийрайте за кратко, след което центрофугирайте при 280 × g за 1 минута.

Разреждане на библиотека от 2 nM до зареждащата концентрация

1. Комбинирайте следните обеми в микроепруветка с ниско свързване, за да пригответе 24 µl библиотека, разреждана до подходящата зареждаща концентрация:

Тип библиотека*	Зареждаща концентрация (pM)	Обем на библиотеката от 2 nM (µl)	RSB с обем на Tween 20 (µl)
AmpliSeq за Illumina Library PLUS	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15
Illumina DNA Prep with Enrichment	1000	12	12
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750	9	15
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA PCR-Free	1000	12	12
TruSeq DNA Nano 350	1200	14,4	9,6
TruSeq DNA Nano 550	1500	18	6
TruSeq Stranded mRNA	1000	12	12
100% PhiX	650	7,8	16,2

* За неизброени типове библиотеки започнете със зареждаща концентрация от 650 pM и оптимизирайте в последващите изпълнявания.

В тази таблица са предоставени примерни зареждащи концентрации. NextSeq 1000/2000 е съвместима с всички комплекти за приготвяне на библиотека на Illumina, но оптималната зареждаща концентрация може да варира.

2. Вортексирайте за кратко, след което центрофугирайте при 280 × g за 1 минута.
3. Оставете настрана разредената библиотека върху лед, докато е готова за секвениране. Секвенирайте библиотеките, разредени до зареждащата концентрация, в същия ден, в който са били разредени.
4. Процедирайте по следния начин.
 - Ако добавяте PhiX, вижте [Добавяне на контрола PhiX \(незадължително\) на страница 47](#).
 - Ако не добавяте PhiX или извършвате изпълняване само за PhiX, вижте [Зареждане на консумативите в касетата на страница 47](#).

Добавяне на контрола PhiX (незадължително)

1. Комбинирайте следните обеми в микроепруветка с ниско свързване, за да пригответе 20 µl 1 nM PhiX:
 - 10 nM PhiX (2 µl)
 - RSB с Tween 20 (18 µl)
2. Вортексирайте за кратко, след което центрофугирайте при 280 × g за 1 минута.
3. Добавете 1 µl 1 nM PhiX към библиотека от 24 µl, разредена до окончателната зареждаща концентрация.

Тези обеми водят до пик на PhiX от около 2%. Реалните проценти варират в зависимост от качеството и количеството на библиотеката.
4. Оставете настрана разредената библиотека с пик на PhiX върху лед, докато е готова за секвениране.

Секвенирайте библиотеките с пик на PhiX в същия ден, в който са били разредени.

Зареждане на консумативите в касетата

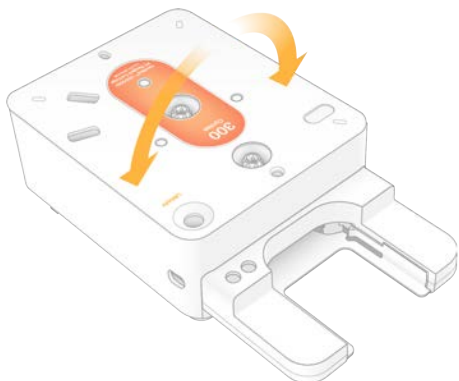
Тази стъпка подготвя касетата за секвениране чрез смесване на предварително напълнените реагенти и зареждането на разредени библиотеки и поточната клетка.

Приготвяне на касетата

1. Отворете чантата на касетата чрез разкъсване или разрязване с ножици отгоре на означените за това места от двете страни.
2. Извадете касетата от чантата. Изхвърлете чантата и десиканта.

- Обърнете касетата 10 пъти, за да смесите реагентите.

Възможно е вътрешните компоненти да издават шум по време на обръщането, което е нормално.



Зареждане на поточната клетка

- Отворете опаковката от метално фолио чрез разкъсване или разрязване с ножици отгоре на означени за това места от двете страни.

Ако нямате възможност да използвате поточната клетка веднага, вижте [Връщане на консумативи за съхранение на страница 89](#).

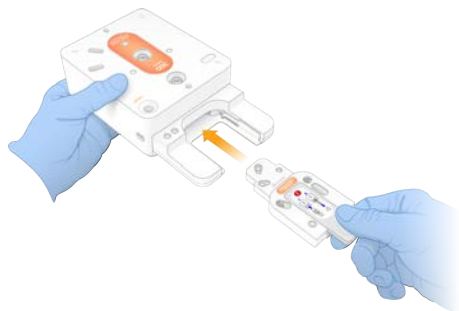
- Извадете поточната клетка от опаковката.

Оставете настрана фолиевата опаковка и десиканта, в случай че имате нужда да върнете поточната клетка за съхранение. Десикантът се съдържа в торбичка на дъното на фолиевата опаковка. Изхвърлете ги, когато секвенирането започне.

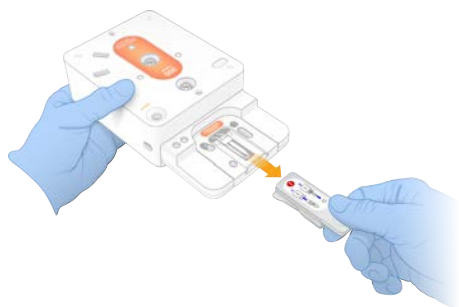


- Хванете поточната клетка за сивия предпазител, като етикетът на предпазителя сочи нагоре.

4. Натиснете за поставяне на поточната клетка в слота в предната част на касетата.
Чува се щракване, което посочва, че поточната клетка е на мястото си. Когато е правилно заредена, сивият предпазител се подава от касетата.



5. Дръпнете назад и премахнете сивия предпазител за показване на поточната клетка.
Рециклирайте предпазителя.



Зареждане на библиотеки

1. Като използвате нов накрайник за пипета P1000, пробийте резервоара за библиотеката и избутайте фолиото към краищата, за да уголемите отвора.
2. Изхвърлете накрайника за пипета, за да предотвратите заразяване.



3. Добавете 20 µl разредена библиотека на *дъното* на резервоара, като бавно снижавате върха на пипетата до *дъното* на резервоара преди разпределяне. Избягвайте да докосвате фолиото.




Инициране на изпълняване на секвениране

Тази стъпка започва изпълняване на секвениране в един от четири режима:

- **Cloud mode** (Облачен режим) – изпълняването е избрано от списъка с планирани изпълнявания в контролния софтуер на NextSeq 1000/2000. По време на секвениране sBCL данните се качват в секвенциалния концентратор BaseSpace. След секвениране DRAGEN в секвенциалния концентратор BaseSpace се стартира автоматично.
- **Hybrid mode** (Хибриден режим) – изпълняването е избрано от списъка с планирани изпълнявания в контролния софтуер на NextSeq 1000/2000. След секвениране анализът на инструмента се стартира автоматично. Изходните файлове на sBCL данните и вторичният анализ на DRAGEN се съхраняват в избраната папка за изходни файлове.
- **Local mode** (Локален режим) – бланка с проба във файлов формат v2 е ръчно импортирана в контролния софтуер на NextSeq 1000/2000. След секвениране анализът на инструмента се стартира автоматично. Изходните файлове на sBCL данните и вторичният анализ на DRAGEN се съхраняват в избраната папка за изходни файлове. Ако е избран Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг на изпълняване и съхранение), анализът може също да започне през приложенията на секвенциалния концентратор BaseSpace след завършване на секвенирането.
- **Standalone mode** (Самостоятелен режим) – конфигурира изпълняване, следвайки инструкции в контролния софтуер на NextSeq 1000/2000 за генериране на sBCL данни.


-  Отварянето на вратичката по време на проверка преди изпълняване или на самото изпълняване може да доведе до неуспех на изпълняването.
-  Дръжте ръцете далеч от инструмента по време на отваряне и затваряне на вратичката, за да избегнете нараняване.

Започване на Cloud (Облачно) или Hybrid Run (Хибридно изпълняване)

1. Конфигурирайте режим на изпълняване, както е показано в [Конфигуриране на режим за изпълняване на страница 21](#).
 2. Изберете **Start** (Начало).
 3. Въведете вашите идентификационни данни за влизане в секвенциалния концентратор BaseSpace и след това изберете **Sign In** (Влизане).
 4. Ако сте избрали Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване), изберете Workgroup (Работна група), съдържаща вашето изпълняване, създадено в Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмент) в секвенциалния концентратор BaseSpace.
-  Избор на работна група се изисква за избягване на грешки. Уверете се, че сте избрали работна група, преди да продължите.
5. Изберете **Next** (Следващ).
 6. Изберете вашето изпълняване.
 7. Потвърдете дали версията на Analysis, Run Length, and Secondary Analysis (Анализ, дължина на изпълняване и вторичен анализ) съвпада с правилното изпълняване. Анализът показва Cloud_ (Облачен_), за да покаже, че анализът се случва в секвенциалния концентратор BaseSpace.
 8. Изберете **Review** (Преглед).
 9. **[Незадължително]** Въведете местоположения за персонализиран праймер за разчитане и персонализиран индексен праймер.
За информация относно приготвянето и добавянето на персонализирани праймери вижте [ръководството за персонализирани праймери за NextSeq 1000 и 2000 \(документ № 1000000139569\)](#). Не забравяйте да посетите страницата за съвместими продукти за вашия комплект за приготвяне на библиотека, за да проверите дали са необходими персонализирани праймери на Illumina.
 10. **[Незадължително]** Изберете персонализирана рецепта. За повече информация вижте [Секвениране чрез цикъл на Dark на страница 111](#)
Ако използвате контролния софтуер v1.3 на NextSeq 1000/2000 и комплект Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus или комплект Illumina Stranded mRNA Prep, персонализираната рецепта се избира автоматично.

11. **[Незадължително]** За ръчно денатуриране и разреждане на библиотеки премахнете избора от квадратчето за отметка за **Denature and Dilute On Board** (Денатуриране и разреждане на място). Вижте *ръководството за денатуриране и разреждане за NextSeq 1000 и 2000 (документ № 1000000139235)*.
Изборът по подразбиране е конфигуриран в настройките на контролния софтуер на NextSeq 1000/2000.
12. **[Незадължително]** За промяна в папката за изходни файлове изберете полето Output Folder (Папка за изходни файлове) и въведете ново местоположение.
Полето Output Folder (Папка за изходни файлове) се попълва автоматично от настройките по подразбиране и се изисква само ако **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване) е избрано.
Ако е избран Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване), Save to BaseSpace Sequence Hub (Записване в секвенциалния концентратор BaseSpace) е Enabled (Активирано).
Ако е избран Proactive and Run Monitoring (Проактивен мониторинг и мониторинг за изпълняване), Save to BaseSpace Sequence Hub (Записване в секвенциалния концентратор BaseSpace) е Disabled (Деактивирано).
13. Прегледайте информацията за изпълняване и след това изберете **Prep** (Приготвяне).

Инициране на Local Run (Локално изпълняване)

1. Конфигурирайте режим на изпълняване, както е показано в [Конфигуриране на режим за изпълняване на страница 21](#).
 2. Изберете **Start** (Начало).
 3. Ако сте избрали Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване) или Proactive and Run Monitoring (Проактивен мониторинг и мониторинг на изпълняване), въведете вашите идентификационни данни за влизане в секвенциалния концентратор BaseSpace и след това изберете **Sign In** (Влизане).
 4. Ако сте избрали Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване), изберете BaseSpace Sequence Hub Workgroup (Работна група в секвенциален концентратор BaseSpace) за записване на изпълняването и след това изберете **Next** (Напред).
-  Избор на работна група се изисква за избягване на грешки. Уверете се, че сте избрали работна група, преди да продължите.
5. Изберете **Choose...** (Избиране) под Start With Sample Sheet (Стартиране с бланка с проба) и навигирайте до бланката с проба във форматирания v2 на инструмента NextSeq 1000/2000, преносимото устройство или монтираното мрежово устройство. Имената на файловете на бланката с проба не може да съдържат специални знаци.

Контролният софтуер v1.3 на NextSeq 1000/2000 автоматично открива версията на DRAGEN от бланката с проба и ви подканва да превключите версиите, ако е необходимо. Версията на DRAGEN трябва да бъде инсталирана на системата. За информация за инсталиране вижте [Софтуерни актуализации на страница 83](#).

- **Instrument Run Setup Used** (Използвана конфигурация за изпълняване на инструмент) – изберете .zip папка, съдържаща бланка с проба v2 и поддържащите файлове, ако е приложимо. В противен случай изберете бланка с проба v2.
- **Instrument Run Setup Not Used** (Неизползвана конфигурация за изпълняване на инструмента) – уверете се, че поддържащият файл на вторичния анализ се намира в същата директория като бланка с проба v2.

i | Избраната бланка с проба трябва да съдържа форматиране v2. За създаване на бланка с проба v2 изтеглете генерираната бланка с проба от Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмент) в секвенциалния концентратор BaseSpace или редактирайте шаблона на бланка с проба v2, предоставен на страницата за поддръжка на NextSeq 1000/2000. Вижте [Настройки на бланка с проба v2 на страница 94](#) за повече информация относно форматирането и изискванията за бланка с проба v2. Уверете се, че файловете, позовани в бланката с проба, се намират в същата папка като бланката с проба.

- Изберете **Review** (Преглед).
- [Незадължително]** Въведете местоположения за персонализиран праймер за разчитане и персонализиран индексен праймер.
За информация относно приготвянето и добавянето на персонализирани праймери вижте *ръководството за персонализирани праймери за NextSeq 1000 и 2000 (документ № 1000000139569)*. Не забравяйте да посетите страницата за съвместими продукти за вашия комплект за приготвяне на библиотека, за да проверите дали са необходими персонализирани праймери на Illumina.
- [Незадължително]** Изберете персонализирана рецепта. За повече информация вижте [Секвениране чрез цикъл на Dark на страница 111](#)
Ако използвате контролния софтуер v1.3 на NextSeq 1000/2000 и комплект Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus или комплект Illumina Stranded mRNA Prep, персонализираната рецепта се избира автоматично.
- [Незадължително]** За ръчно денатуриране и разреждане на библиотеки премахнете избора от квадратчето за отметка за **Denature and Dilute On Board** (Денатуриране и разреждане на място). Вижте *ръководството за денатуриране и разреждане за NextSeq 1000 и 2000 (документ № 1000000139235)*.
Изборът по подразбиране е конфигуриран в настройките на контролния софтуер на NextSeq 1000/2000.
- [Незадължително]** За промяна в папката за изходни файлове изберете полето Output Folder (Папка за изходни файлове) и въведете ново местоположение.

Полето Output Folder (Папка за изходни файлове) се попълва автоматично от настройките по подразбиране и се изисква само ако Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване) е избрано.

Ако е избран Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване), Save to BaseSpace Sequence Hub (Записване в секвенциалния концентратор BaseSpace) е Enabled (Активирано).

Ако е избран Proactive and Run Monitoring (Проактивен мониторинг и мониторинг за изпълняване), Save to BaseSpace Sequence Hub (Записване в секвенциалния концентратор BaseSpace) е Disabled (Деактивирано).

11. Прегледайте информацията за изпълняване и след това изберете **Prep** (Приготвяне).

Инициране на Standalone Run (Самостоятелно изпълняване)

1. Конфигурирайте режим на изпълняване, както е показано в [Конфигуриране на режим за изпълняване на страница 21](#).
2. Изберете **Start** (Начало).
3. Ако сте избрали Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване) или Proactive and Run Monitoring (Проактивен мониторинг и мониторинг на изпълняване), въведете вашите идентификационни данни за влизане в секвенциалния концентратор BaseSpace и след това изберете **Sign In** (Влизане).
4. Ако сте избрали Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване), изберете BaseSpace Sequence Hub Workgroup (Работна група в секвенциален концентратор BaseSpace) за записване на изпълняването и след това изберете **Next** (Напред).
5. Изберете **Set Up New Run** (Конфигуриране на ново изпълняване).
6. В полето Run Name (Име на изпълняването) въведете уникално име по ваше предпочитание, чрез което да идентифицирате текущото изпълняване.
Името на изпълняването може да съдържа цифрено-буквени знаци, тирета, дефиси и долни черти.
7. За Read Type (Тип разчитане) изберете колко разчитания на секвенции да се извършат:
 - **Single Read** (Единично разчитане) – извършване на едно разчитане, което е по-опростената и по-бърза опция.
 - **Paired End** (Разчитане със сдвояване на краища) – извършване на две разчитания, което генерира данни с по-високо качество и предоставя по-точно подравняване.
8. Въведете броя цикли, които да се извършват при всяко разчитане:
Няма максимален брой на индексни цикли, но сборът на циклите за разчитане и индексните цикли трябва да бъде по-малък от броя на циклите, посочени на етикета на касетата плюс 27.

Read 1 (Разчитане 1) – въведете стойност в рамките на **1 – 151** цикъла.

Index 1 (Индекс 1) – въведете броя на циклите за праймера Index 1 (i7) (Индекс 1 (i7)). За изпълняване само за PhiX въведете **0** в двете индексни полета.

Index 2 (Индекс 2) – въведете броя на циклите за праймера Index 2 (i5) (Индекс 2 (i5)).

Read 2 (Разчитане 2) – въведете до **151** цикъла. Стойността е обикновено същата като стойността на Read 1 (Разчитане 1).

9. Ако сте избрали Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване), изберете **Choose...** (Избиране) за импортиране на бланка с проба.

Контролният софтуер v1.3 на NextSeq 1000/2000 автоматично открива версията на DRAGEN от бланката с проба и ви подканва да превключите версиите, ако е необходимо. Версията на DRAGEN трябва да бъде инсталирана на системата. За информация за инсталиране вижте [Софтуерни актуализации на страница 83](#).

- i** | Избраната бланка с проба трябва да съдържа форматиране v2. За създаване на бланка с проба v2 изтеглете генерираната бланка с проба от Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмент) в секвенциалния концентратор BaseSpace или редактирайте шаблона на бланка с проба v2, предоставен на страницата за поддръжка на NextSeq 1000/2000. Вижте [Настройки на бланка с проба v2 на страница 94](#) за повече информация относно форматирането и изискванията за бланка с проба v2. Уверете се, че файловете, позовани в бланката с проба, се намират в същата папка като бланката с проба.

10. **[Незадължително]** Въведете местоположения за персонализиран праймер за разчитане и персонализиран индексен праймер.

За информация относно приготвянето и добавянето на персонализирани праймери вижте *ръководството за персонализирани праймери за NextSeq 1000 и 2000 (документ № 1000000139569)*. Не забравяйте да посетите страницата за съвместими продукти за вашия комплект за приготвяне на библиотека, за да проверите дали са необходими персонализирани праймери на Illumina.

11. **[Незадължително]** Изберете персонализирана рецепта. За повече информация вижте [Секвениране чрез цикъл на Dark на страница 111](#)

12. **[Незадължително]** За ръчно денатуриране и разреждане на библиотеки премахнете избора от квадратчето за отметка за **Denature and Dilute On Board** (Денатуриране и разреждане на място). Вижте *ръководството за денатуриране и разреждане за NextSeq 1000 и 2000 (документ № 1000000139235)*.

Изборът по подразбиране е конфигуриран в настройките на контролния софтуер на NextSeq 1000/2000.

13. **[Незадължително]** За промяна в папката за изходни файлове изберете полето Output Folder (Папка за изходни файлове) и въведете ново местоположение.

Полето Output Folder (Папка за изходни файлове) се попълва автоматично от настройките по подразбиране и се изисква само ако Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване) е избрано.

14. Изберете **Prep** (Подготвяне).

Зареждане на консумативи на инструмента

1. Уверете се, че касетата е била предварително размразена и обърната 10 пъти за смесване преди зареждане на поточната клетка (премахнат сив раздел) и разредената библиотека.
2. Изберете **Load** (Зареждане).
Контролният софтуер на NextSeq 1000/2000 отваря вратичката и изважда таблата.
3. Поставете касетата на таблата с етиката нагоре и поточната клетка вътре в инструмента.
Натиснете касетата, докато се застопори на мястото.



4. Изберете **Close** (Затваряне), за да приберете касетата и затворите вратичката.
Контролният софтуер на NextSeq 1000/2000 показва информация от сканираните консумативи след около 3 минути.
5. [Незадължително] Изберете **Eject Cartridge** (Изваждане на касета) за премахване на касетата.
Вратичката се отваря след 1 минута и изважда касетата.
6. Изберете **Sequence** (Секвениране).

Проверки преди изпълняване

Проверките преди изпълняване включват проверка на инструмента и проверка на флуидиката. Проверката на флуидиката пробива запечатването на касетата, което ще причини 3 – 4 пукащи звука от инструмента. Това се очаква. Реагентът сега преминава през поточната клетка.

! | Консумативите не могат да бъдат използвани повторно, след като проверката на флуидиката започне.

1. Изчакайте около 15 минути, за да завършат проверките, преди изпълняване.
Изпълняването се стартира автоматично след успешно завършване.

2. Ако настъпи грешка по време на проверката на инструмента, изберете **Retry** (Повторен опит), за да извършите отново проверката.
Когато се изпълнява дадена проверка, кръгът за тази проверка е анимиран.
3. За отстраняване на неизправности с повтарящи се грешки вижте [Отстраняване на съобщение за грешка на страница 88](#).


Мониториране на напредъка на изпълняването

1. Можете да следите напредъка и измерванията в изпълняването, както се показват на екрана Sequencing (Секвениране).
 - **Estimated run completion** (Приблизително завършване на изпълняване) – приблизителните дата и час на завършване на изпълняването. Изчисленото измерване за завършване на изпълняване изисква 10 предишни изпълнявания за изчисляване на точно време за завършване на изпълняване.
 - **Average %Q30** (Средно %Q30) – средният процент на обозначавания на бази с резултат за качество $Q \geq 30$.
 - **Projected Yield** (Предвидена производителност) – очакваният брой обозначени бази за изпълняването.
 - **Total Reads PF** (Общият брой разчитания, преминали филтрите) – броят клъстери, преминали филтрите (в милиони), със сдвоени краища (ако е приложимо).
 - **Real Time Demux** (Демултиплексиране в реално време) – състоянието на демултиплексиране, когато е започнато в началото на Read 2 (Разчитане 2) след завършване на циклите на Read 1 (Разчитане 1), Index 1 (Индекс 1) и Index 2 (Индекс 2). Състоянието ще се покаже Complete (Завършено) дори ако индексните цикли не са изпълнени. Не е налично за изпълнявания в Cloud mode (Облачен режим).
 - **Real Time Alignment** (Подравняване в реално време) – състоянието на подравняване в Read 1 (Разчитане 1), когато е започнато в началото на Read 2 (Разчитане 2) след завършване на циклите на Read 1 (Разчитане 1), Index 1 (Индекс 1) и Index 2 (Индекс 2). Не е налично за изпълнявания в Cloud mode (Облачен режим).

Q30 и измерванията на производителността се показват след цикъл 26 (около 6 часа след започване на изпълняването).
2. За да следите процесите за изпълняването, изберете менюто на контролния софтуер, след което изберете **Process Management** (Управление на процеси).
3. За отказ от изпълняване изберете **End Run** (Прекратяване на изпълняване). Вижте [Отказ на изпълняване на страница 89](#) за повече информация относно отказване на изпълнявания.
4. Извадете консумативите от инструмента. Премахнете касетата от инструмента в рамките на 3 дни.

Изваждане на консумативите

1. Когато секвенирането е завършено, изберете **Eject Cartridge** (Изваждане на касета). Софтуерът изважда използваната касета от инструмента.
2. Отстранете касетата от таблата.
3. Извадете поточната клетка от касетата.
4. Изхвърлете поточната клетка, която съдържа електронни компоненти, съгласно приложимите стандарти за вашето местоположение.
5. [Незадължително] Премахнете тапата за дрениране под логото на Illumina от страни на касетата над подходяща област (например мивка или контейнер за опасни течни отпадъци), като тапата е обърната хоризонтално или надолу от лицето ви. Дренирайте използваните реагенти в съответствие с приложимите стандарти за вашия регион. Времето за дрениране зависи от размера на касетата, ако автоматичното пречистване на реагент не е активирано.

 **Този набор от реагенти съдържа потенциално опасни химикали. Може да възникнат наранявания в резултат на вдишване, поглъщане, контакт с кожата и контакт с очите. Носете предпазно оборудване, включително защита за очи, ръкавици и лабораторна престилка, подходящи за риска от експозиция. Третирайте използваните реагенти като химичен отпадък и ги изхвърляйте съгласно приложимите регионални, национални и местни закони и нормативни разпоредби. За допълнителна информация относно околната среда, здравето и безопасността вижте информационните листове за безопасност (ИЛБ) на адрес support.illumina.com/sds.html.**
6. Изхвърлете касетата с реагенти.
Измиване след изпълняването на дейност не се изисква, защото елементите от флуидиката се изхвърлят с касетата.
7. Изберете **Close Door** (Затваряне на вратичката), за да заредите повторно таблата и да се върнете към екрана Home (Начало).
Софтуерът автоматично презарежда таблата и сензорите потвърждават отстраняването на касетата.

Почистване на табла на касета

Почистването на таблата на касетата е необходимо само ако реагентът е изтекъл в таблата на касетата.

1. Премахнете касетата от инструмента.
2. Поставете нов чифт ръкавици без талк и допълнително защитно облекло.
3. Пръснете 10% разтвор на белина върху кърпа.
4. Избършете таблата на касетата чрез кърпа и след това веднага премахнете разтвора на белина чрез кърпичка за сериозни замърсявания.
Белината оставя петна в таблата на касетата, ако не бъдат премахнати веднага.

5. Напръскайте 70% разтвор на етанол върху таблата на касетата и веднага премахнете чрез кърпичка за сериозни замърсявания.
6. Поставете таблата на касетата обратно в положение за зареждане.

Изходни данни от секвенирането

Този раздел описва софтуера на анализа в реално време, който изпълнява обозначаване на бази, назначава резултати за качество и изходни данни. Научете за различните типове изходни данни и къде да ги откриете след изпълняване.

Общ преглед на анализа в реално време

Системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000 изпълняват RTA3, прилагане на софтуера за анализ в реално време, на инструмента Compute Engine (CE). RTA3 извлича интензитети от изображения, получени от камерата, изпълнява обозначаване на бази, назначава резултат за качество от обозначаванията на бази, подравнява PhiX и докладва данни в InterOp файлове за преглеждане в контролния софтуер на инструмента.

За оптимизиране на времето за обработка RTA3 съхранява информацията в паметта. Ако RTA3 е прекратен, обработването не се подновява и всякакви данни за изпълняване, които се обработват в паметта, се изгубват.

Входове за RTA3

RTA3 изисква изображения на плочки, които се съдържат в локалната памет на системата за обработване. RTA3 получава информация за изпълняване и команди от контролния софтуер.

Изходи за RTA3

Изображенията за всеки цветен канал се предават в паметта към RTA3 като плочки. От тези изображения RTA3 извежда група от файлове за обозначаване на бази с резултат за качество и файлове за филтри. Всички други изходни данни са поддържащи изходни файлове.

Тип файл	Описание
Файлове за обозначаване с бази	Всяка плочка, която е анализирана, е включена в съчетан файл за обозначаване на бази (*.cbcl). Плочките от същата линия и повърхност се събират в 1 *.cbcl файл за всяка линия и повърхност.
Файлове с филтри	Всяка плочка произвежда файл с филтър (*.filter), който определя клъстер, който преминава филтрите.
Файлове с местоположения на клъстерите	Файловете с местоположение на клъстерите (*.locs) съдържат координатите X, Y за всеки клъстер в плочка. Файл за местоположение на клъстерите се генерира за всяко изпълняване.

Изходните файлове се използват за анализ след гена в DRAGEN и секвенциалния концентратор BaseSpace.

Обработка на грешки

RTA3 създава файлове с хронология и ги записва в папката Logs (Хронологии). Грешките се записват в текстов файл в *.log файлов формат.

Следните файлове с хронология прехвърлят към крайното изходно местоположение в края на обработката:

info_00000.log обобщава важни събития за изпълняване.

error_00000.log изброява грешките, настъпили по време на изпълняване.

warning_00000.log изброява предупрежденията, настъпили по време на изпълняване

Плочки за поточна клетка

Плочките са малки зони на изображения на поточната клетка. Камерата прави по едно изображение на плочка.

Поточната клетка P2 на NextSeq 1000/2000 има общо 132 плочки. Поточната клетка P3 на NextSeq 1000/2000 има общо 264 плочки.

Таблица 5 Плочки за поточна клетка

Компонент на поточна клетка	Поточна клетка P2 на NextSeq 1000/2000	Поточна клетка P3 на NextSeq 1000/2000	Описание
Линии	1	2	Линиите са оптически различни, но не флуидно отделени канали.
Повърхности	2	2	Поточните клетки P2 и P3 се изобразяват на две повърхности: отгоре и отдолу. Горната повърхност на плочка се изобразява първа.
Откоси на линия	6	6	Откос е колона в линия на поточна клетка.

Компонент на поточна клетка	Поточна клетка P2 на NextSeq 1000/2000	Поточна клетка P3 на NextSeq 1000/2000	Описание
Плочки на откос	11	11	Плочката е част от откоса и изобразява изобразената област на поточната клетка.
Общо генерирани плочки	132	264	Линии x повърхности x откоси x плочки на откоси се равнява на общия брой плочки.

Наименуване на плочка

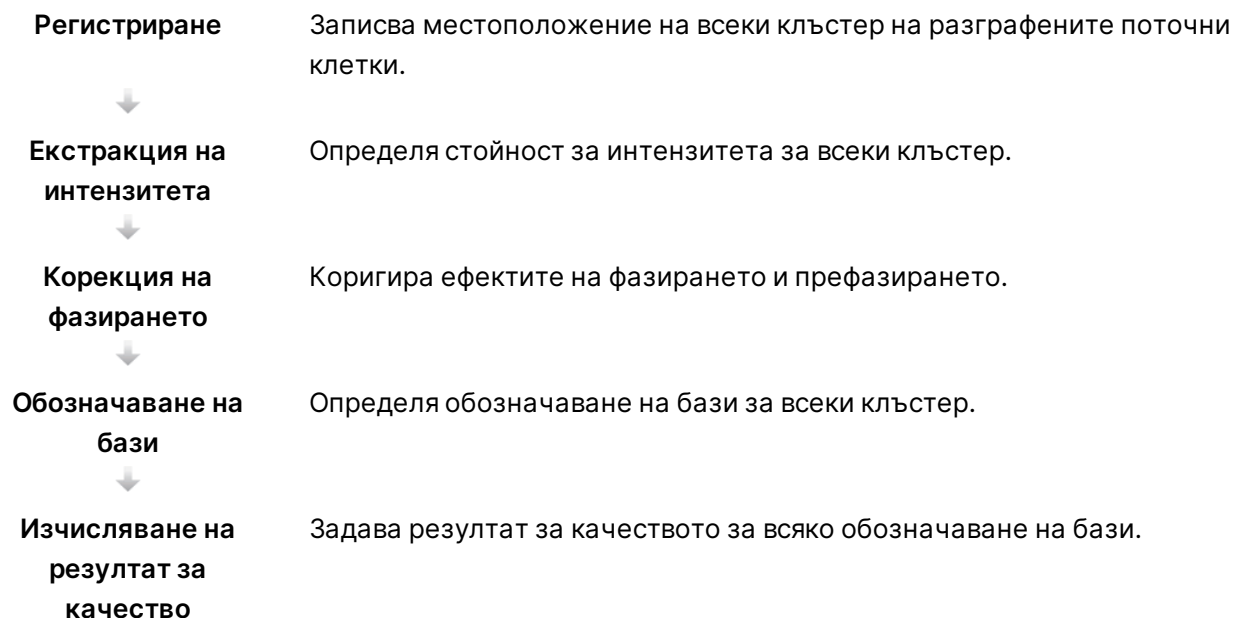
Името на плочката е четирицифрено число, което представлява положението на плочката на поточната клетка. Например името на плочка 1205 показва горната повърхности, откос 2, плочка 05.

Първата цифра представлява повърхността: 1 отгоре или 2 отдолу.

Втората цифра представлява номерът на откоса: 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последните две цифри представляват номера на плочката. За номера на откоси 1 – 4 номерирането започва с 01 на изходния край на поточната клетка до 11 на входния край. За номера на откоси 5 – 6 номерирането започва с 01 на входния край и 11 на изходния край.

Работен процес на анализа в реално време



Регистриране

Регистрирането подравнява изображение към завъртяно квадратно изложение на нанокладенчета на разграфената поточна клетка. Поради определената подредба на нанокладенчетата X и Y координатите за всеки клъстер в плочка са предварително определени. Позициите на клъстера са записани към файл (s.locs) за местоположението на клъстер за всяко изпълняване.

Ако регистрацията е неуспешна за което и да е изображение в цикъла, не се генерират обозначавания на бази за тази плочка в този цикъл. Използвайте Sequencing Analysis Viewer за идентифициране кои изображения имат неуспешна регистрацията.

Екстракция на интензитета

След регистриране екстракцията на интензитета изчислява стойността на интензитета за всяко нанокладенче в дадено изображение. Ако регистрацията е неуспешна; интензитетът на тази плочка не може да бъде екстрахиран.

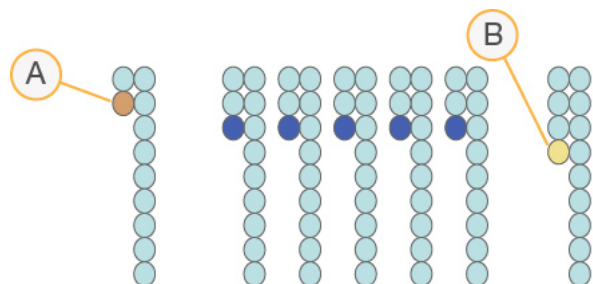
Корекция на фазирането

По време на реакцията на секвениране всяка верига ДНК в даден клъстер се увеличава с по една база на цикъл. Фазирането и префазирането настъпват, когато дадена верига излезе извън фазата с текущия цикъл на внедряване.

Фазирането настъпва, когато дадена база изостане.

Префазирането настъпва, когато дадена база прескочи напред.

Фигура 5 Фазиране и префазиране



- A. Разчитане с база, която се фазира
- B. Разчитане с база, която се префазира.

RTA3 коригира ефектите от фазирането и префазирането, което увеличава максимално качеството на данните във всеки цикъл в хода на изпълняването.

Обозначаване на бази

Обозначаването на бази определя база (A, C, G или T) за всеки клъстер на дадена плочка в определен цикъл. Системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000 използват двуканално секвениране, което изисква само две изображения за кодиране на данни за четири ДНК бази, една от зеления канал и една от синия канал.

Липсата на обозначаване се идентифицира като N. Липсата на обозначавания се появява, когато клъстер не преминава филтъра, регистрирането е неуспешно или клъстерът се прехвърли от изображението.

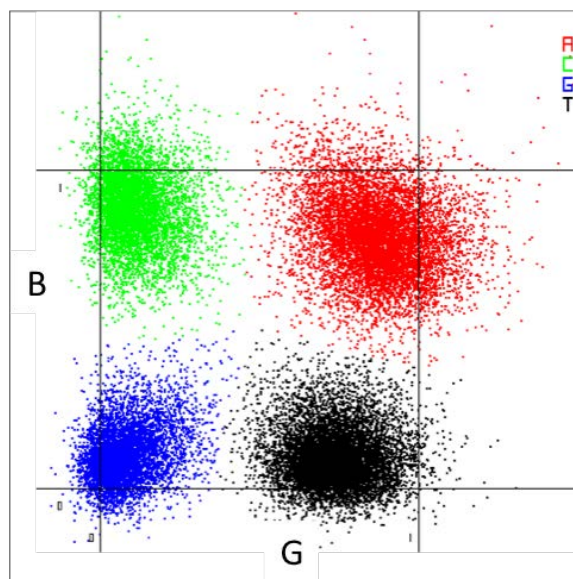
Интензитетите за всеки клъстер се екстрахира от зелените и сините изображения и се сравнява с всички останали, което води до четири различни популации. Всяка популация отговаря на база. Процесът по обозначаване на бази определя към коя популация принадлежи всеки клъстер.

Таблица 6 Обозначаване на бази в 2-канално секвениране

База	Зелен канал	Син канал	Резултат
A	1 (налично)	1 (налично)	Клъстери, които показват интензитет както в зелените, така и в сините канали.
C	0 (не е налично)	1 (налично)	Клъстери, които показват интензитет само в синия канал.

База	Зелен канал	Син канал	Резултат
G	0 (не е налично)	0 (не е налично)	Клъстери, които не показват интензитет на известно местоположение на клъстер.
T	1 (налично)	0 (не е налично)	Клъстери, които показват интензитет само в зеления канал.

Фигура 6 Визуализиране на интензитетите на клъстерите



i | Цветът на всеки клъстер съответства на графиките на %Бази в Sequence Analysis Viewer (SAV) и BaseSpace Sequence Hub Run Data by Cycle (Изпълняване на данни по кръг на секвенциалния концентратор BaseSpace) и не са предназначени да корелират със зеления и синия канал.

Клъстери, преминали филтрите

По време на изпълняването RTA3 филтрира необработените данни, за да премахне разчитания, които не отговарят на прага за качество на данните. Припокриващите се клъстери и тези с ниско качество се отстраняват.

За двуканален анализ RTA3 използва популационно-базирана система за определяне на задържането (измерване на чистотата на интензитета) на обозначаване на бази. Клъстерите преминават филтъра (PF), когато не повече от едно обозначаване на бази в първите 25 цикъла е имало задържане под фиксирания праг. Когато е включено, подравняването с PhiX се извършва в цикъл 26 на поднабор от плочки за клъстери, преминали филтъра. Клъстерите, които не преминават през филтъра, не се извършва обозначаване на бази и не се подравняват.

Резултати за качеството

Резултатът за качество (резултат за Q), представлява предвиждане на вероятността за неправилно обозначаване на бази. По-висок резултат за качество предполага, че обозначаването на бази е с по-високо качество и по-голяма вероятност за коректност. След определяне на резултата за качество резултатите се записват във (*.cbcl) файлове за обозначаване на бази.

Резултатът за качество е съкратен начин за съобщаване на вероятности за малки грешки. Резултатите за качество се представят като Q(X), където X е резултатът. В таблицата по-долу е показана връзката между резултата за качество и вероятността за грешка.

Резултат за качество Q(X)	Вероятност за грешка
Q40	0,0001 (1 на 10 000)
Q30	0,001 (1 на 1000)
Q20	0,01 (1 на 100)
Q10	0,1 (1 на 10)

Изчисляване на резултат за качество и отчитане

Изчисляването на резултата за качество става чрез набор от предиктори за всяко обозначаване на бази, след което стойностите от предиктора се използват за проверка на резултата за качество в таблица за качество. Таблиците за качество са създадени, за да предоставят оптимално точни предвиждания за качеството за изпълнявания на дейности, генерирани от специфична конфигурация на платформата за секвениране и версията на химичните компоненти.



Изчисляването на резултата за качество се базира на модифицирана версия на алгоритъма на Phred.

За генериране на таблица на качество за системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000 се определят три групи от обозначавания на бази, въз основа на групирането на тези специфични предвиждащи функции. След групиране на тези обозначавания на бази средната честота за грешки е емпирично изчислена за всяка от трите групи и съответните резултати за качество се записват в таблица за качеството заедно с предвиждащите функции, корелиращи с тази група. Като такива само три резултата за качество са възможни с RTA3 и тези резултати за качество представят средната честота за грешки в групата ([Опростено изчисляване на резултат за качество с RTA3 на страница 67](#)). Като цяло това води до опростено, но много точно изчисляване на резултат за качество. Трите групи в таблицата за качество съответстват на пределни (< Q15), средни (~Q20) и висококачествени (> Q30) обозначавания на бази и им се присвояват конкретните резултати, съответно 12, 23 и 37. Освен това нулевата оценка от 2 се

назначава при липса на обозначавания. Този модел за отчитане на резултат за качество намалява изискванията за място за съхранение и скорост на връзката, без да се засяга точността или производителността.

Фигура 7 Опростено изчисляване на резултат за качество с RTA3



Изходни файлове за секвениране

Тип файл	Описание, местоположение и име на файла
Съчетани файлове за обозначаване на бази	<p>Всека анализиран клъстер се включва в съчетан файл за обозначаване на бази, като те се събират сумарно в един файл на цикъл, линия и повърхност. Сборният файл съдържа съчетаното обозначаване на бази и кодирания резултат за качеството за всеки клъстер. Съчетаните файлове за обозначаване на бази се използват от секвенциален концентратор BaseSpace или bcl2fastq2.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1</p> <p>L[lane]_[surface].cbcl например L001_1.cbcl</p>
Файлове с местоположения на клъстерите	<p>Двоичен файл за местоположение на клъстер, който съдържа XY координати за клъстерите в една плочка за всяка поточна клетка. Шестоъгълна подредба, която съвпада с подредбата на нанокладенчетата на поточната клетка, определя предварително координатите.</p> <p>Data\Intensities</p> <p>s_[lane].locs</p>

Тип файл	Описание, местоположение и име на файла
Файлове с филтри	Файлът с филтър посочва дали клъстер е преминал филтрите. Файловете с филтри се генерират в цикъл 26 чрез 25 цикъла с данни. За всяка плочка се генерира един файл с филтър. Data/Intensities/BaseCalls/L001 s_[lane]_[tile].filter
InterOp файлове	Двоичните отчетни файлове може да бъдат прегледани на инструмента с контролния софтуер на инструмента или извън инструмента в SAV или секвенциалния концентратор BaseSpace. InterOp файловете могат да бъдат актуализирани по време на изпълняването. папка InterOp
Файл с информация за изпълняването	Посочва името на изпълняването, броя цикли за дадено разчитане, дали разчитането е Index Read (Индексно разчитане), както и броя откоси и плочки на поточната клетка. В началото на изпълняването се създава файл с информация за изпълняването. [Root folder], RunInfo.xml

Изходни файлове за вторичен анализ в DRAGEN

Платформата DRAGEN Bio-IT анализира вашите изходни данни от секвенирането на инструмента допълнително чрез използването на една от следните линии за анализ.

- Конвертиране в BCL
- Герминативна линия
- РНК
- Обогаляване
- Единичноклетъчна РНК
- ДНК ампликон

Този раздел предоставя информация на всеки тръбопровод на DRAGEN, включително информация за изходен файл. В допълнение към генерирането на файлове, специфични за всяка линия, DRAGEN осигурява измервания от анализа в <sample_name>.metrics.json файл и докладите, описани в [Тръбопровод за конвертиране в BCL в DRAGEN на страница 74](#). За повече информация относно DRAGEN вижте [страницата за поддръжка на платформата DRAGEN Bio-IT](#). Всички тръбопроводи в DRAGEN поддържат декомпресия на входен BCL файл и компресия на изходен BAM/CRAM файл.

Съображения за изходен файл:

- За тръбопроводите за герминативна линия, РНК, обогатяване и ДНК ампликон, които се изпълняват на анализа на инструмента, BAM файловете няма да бъдат качени в секвенциалния концентратор BaseSpace, ако е избрано Proactive, Run Monitoring and Storage (Проактивен мониторинг, мониторинг и съхранение за изпълняване).

Тръбопровод за обогатяване в DRAGEN

Тръбопроводът за обогатяване в DRAGEN поддържа следните функции. Ако използвате DRAGEN 3.7 или по-нова версия, се поддържат както герминативен, така и соматичен (само тумор) режим.

- Демултиплексиране на проба
- Картографиране и подравняване, включително маркиране на сортиране и дубликация
- Обозначаване на малък вариант
- Обозначаване на структурен вариант

За изпълняване на обозначаване на вариант *.bed файлът трябва да бъде включен в бланката с проба или определен в Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмента) на секвенциалния концентратор BaseSpace. Обозначаването на структурен вариант се генерира само за разчитания на сдвоени краища и режим на герминативна линия.

Ако използвате обогатяване в DRAGEN версия 3.8 или по-нова, можете да въведете файл за смущения на основната линия за подобряване на производителността в соматичен режим. Вижте [Импортиране на файлове за смущения на основната линия на страница 19](#).

Тръбопроводът генерира следните изходните файлове.

Компонент	Тип	Име на изходен файл
Картографиране/подравняване	BAM или CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam или • <sample_name>.cram
Обозначаване на малък вариант	VCF и gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz
Обозначаване на структурен вариант	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.sv.vcf.gz

*Изходните файлове gVCF са налични само за режим на герминативна линия.

Тръбопровод за герминативна линия в DRAGEN

Тръбопровод за герминативна линия в DRAGEN поддържа следните функции:

- Демултиплексиране на проба

- Картографиране и подравняване, включително маркиране на сортиране и дубликация
- Обозначаване на малък вариант
- Обозначаване на структурен вариант за разчитания на сдвоени краища.
- Копия на обозначаване на вариант за човешки геноми
- Повторете разширенията за човешки геноми
- Региони на хомозиготност за човешки геноми
- **[DRAGEN v3.8 или по-нова]** CYP2D6 откриване

Обозначаването на структурен вариант се генерира само за разчитания на сдвоени краища.

Тръбопроводът генерира следните изходните файлове.

Компонент	Тип	Име на изходен файл
Картографиране/подравняване	BAM или CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam или • <sample_name>.cram
Обозначаване на малък вариант	VCF и gVCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz
Инструмент за обозначаване на структурен вариант	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.sv.vcf.gz
Варианти на броя на копията	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.cnv.vcf.gz
Повторено разширение	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.repeats.vcf.gz
Региони на хомозиготност	CSV и BED	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.roh_metrics.csv • <sample_name>.roh.bed
CYP2D6 откриване	TSV	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.cyp2d6.tsv

Тръбопровод на ДНК ампликон в DRAGEN

Тръбопроводът в DRAGEN поддържа следните функции:

- Демултиплексиране на проба
- Картографиране и подравняване, включително маркиране на сортиране и дубликация
- Обозначаване на малък вариант в режим на герминативна линия или соматичен режим.

За изпълняване на обозначаване на вариант *.bed файлът трябва да бъде включен в бланката с проба или определен в Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмента) на секвенциалния концентратор BaseSpace.

Тръбопроводът генерира следните изходните файлове.

Компонент	Тип	Име на изходен файл
Картографиране/подравняване	BAM или CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam или • <sample_name>.cram
Обозначаване на малък вариант	VCF и gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz

*Изходните файлове gVCF са налични само в режим на герминативна линия.

Тръбопровод за РНК в DRAGEN

Тръбопроводът за РНК в DRAGEN поддържа следните функции

- Демултиплексиране на проба
- Картографиране и подравняване, включително маркиране на сортиране и дубликация
- Откриване на сливане на гени
- Количествено определяне на транскрипти
- **[DRAGEN v3.8 или по-нова]** Експресия на диференциални гени

За генериране на изходни файлове определете GTF файл в бланката с проба или се уверете, че `genes.gtf.gz` по поразбиране съществуват с референтния геном.

Тръбопроводът генерира следните изходните файлове.

Компонент	Тип	Име на изходен файл	Описание
Картографиране/подравняване	BAM или CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam или • <sample_name>.cram 	Изходните файлове за подравняване отговарят на SAM спецификациите.

Компонент	Тип	Име на изходен файл	Описание
Откриване на сливане на гени	Обикновен текст	<ul style="list-style-type: none"> <sample_name>.fusion_candidates.preliminary <sample_name>.fusion_candidates.final 	<ul style="list-style-type: none"> Кандидатите за сливане, преди филтрите да бъдат приложени. Кандидатите за сливане, след като филтрите бъдат приложени.
Количествено определяне на транскрипти	Обикновен текст	<ul style="list-style-type: none"> sample_name.quant.genes.sf sample_name.quant.sf 	<ul style="list-style-type: none"> Резултатите от количественото определяне на транскрипти на генно ниво. Всички резултати от количествено определяне на транскрипти.
Диференциална експресия	PNG	Вижте следната таблица с изходни файлове за диференциална експресия.	За генериране на изходни файлове трябва да бъде конфигурирано сравнение в бланката с проба.

Следните файлове са изходни файлове, когато диференциална експресия е активирана.

Име на файла	Описание
Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv	Съдържа измерванията на анализа за диференциална експресия.
Control_vs_Comparison.genes.counts.csv	Описва броя на разчитанията, картографирани за всеки ген за всяка проба в контролните и сравнителните групи.

Име на файла	Описание
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Топлинна карта на експресията на диференциално експресирани гени за пробите в контролните и сравнителните групи. Топлинната карта показва само диференциално експресирани гени с регулирана Р-стойност <math>< .05</math>. Ако има повече от 30 диференциално експресирани гени, само най-големите 30 диференциално експресирани гени се използват. Ако DESeq1 не успее да се сближи или ако няма диференциално изразени гени, файлът не се генерира.
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Съдържа вариацията на съотношението на генната експресия като функция на средния интензитет на сигнала. За показване на различията между измерванията, направени в две проби, графиката трансформира данните в скали М (логаритмично съотношение) и А (средна стойност) и след това графиките в стойности. Графиката МА показва \log_2 -кратните промени, отдавани на дадена променлива, над средната стойност на нормализирания брой за всички проби. Ако регулираната Р-стойност е по-малка от 0,1, точките са червени. Точките, които излизат от прозореца, се поставят в графиката като отворени триъгълници. Триъгълниците, сочещи нагоре, представят положително логаритмична промяна. Насочените надолу триъгълници представляват отрицателна логаритмична промяна.
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	Графиката показва първите два основни компонента, които обясняват най-голямото отклонение.
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Съдържа резултати от DESeq2, които описват средния израз, \log_2 (кратна промяна), стандартна грешка на \log_2 , Р-стойност, коригирана Р-стойност и състоянието на експресия на всеки ген.
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Съдържа регулирани преброявания на логаритмично преобразуване, изчислени от DESeq2.

Тръбопровод за единичноклетъчна РНК в DRAGEN

DRAGEN поддържа следните функции:

- Демултиплексиране на проба
- Картографиране и подравняване, включително маркиране на сортиране и дупликация
- Класификация на клетка и ген

За генериране на изходни файлове определете GTF файл в бланката с проба или се уверете, че `genes.gtf.gz` по поразбиране съществуват с референтния геном.

Тръбопроводът генерира следните изходните файлове.

Компонент	Тип	Име на изходен файл
Картографиране/подравняване	BAM или CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <code><sample_name>.bam</code> или • <code><sample_name>.cram</code>
Класификация на клетка/ген	TSV, CSV и MTX	<ul style="list-style-type: none"> • <code><sample_name>.scRNA.barcodeSummary.tsv</code> • <code><sample_name>.scRNA.genes.tsv</code> • <code><sample_name>.scRNA.matrix.mtx</code>
Отчети от анализ	HTML	<code><sample_name>.dragen.scrna-report.*.html</code>

Тръбопровод за конвертиране в BCL в DRAGEN

Линия за конвертиране в BCL в DRAGEN използва BCL данни, генерирани от изпълняване на секвениране и информация от бланка с проба, за формиране на изходни файлове във FASTQ файлове за всяка проба. Името на FASTQ файла е `<sample_name>.fastq.gz`.

Тръбопроводът генерира следните отчети.

Компонент	Тип	Име на изходен файл
Демултиплексиране	CSV	• <code>Demultiplex_Stats.csv</code>
Измервания на адаптер	CSV	• <code>Adapter_Metrics.csv</code>
Прескачане на индекс	CSV	• <code>Index_Hopping_Counts.csv</code>
Най-неизвестни баркодове	CSV	• <code>Top_Unknown_Barcodes.csv</code>

Отчет за статистика на демултиплексиране

Отчетът за статистика на демултиплексиране съдържа информация за броя на разчитанията, преминали филтъра, които са назначени за всяка проба в бланка с проба. Всякакви разчитания, които не са свързани ясно с проба, се класифицират като неопределени. Този отчет също

включва информация относно резултатите за качество на бази в разчитания, преминали филтъра, назначени към всяка проба.

Включена е следната информация.

Измерване	Описание
Линия	Линията на поточната клетка, на която пробата е секвенирана.
SampleID (Идентификатор на проба)	Идентификаторът на пробата от бланката с проба. Ако разчитането не съответства на проба, полето показва <i>undetermined</i> (неопределено).
Индекс	Съчетанието от Index Read 1 (Индексно разчитане 1) и Index Read 2 (Индексно разчитане 2) от бланката с проба, разделени с дефис. Ако разчитане не съответства на проба, полето показва <i>undetermined</i> (неопределено).
# Reads (Брой разчитания)	Броят на разчитания, преминали филтъра, които са демултиплексирани за пробата в определената линия.
# Perfect Index Reads (Брой перфектни индексни разчитания)	Броят на разчитанията с перфектно съвпадение с комбинираните индексни секвенции, посочени в бланката с проба.
# One Mismatch Index Reads (Брой индексни разчитания с едно несъвпадение)	Броят на разчитанията с една грешка в комбинираните индексни секвенции, посочени в бланката с проба.
# of \geq Q30 Bases (PF) (Брой на бази (PF) с \geq Q30)	Броят на базите, включително адаптери, съответстващи на разчитания, които преминават прага за количество Q30.
Mean Quality Score (PF) (Среден резултат за качество (PF))	Средният резултат за качество за разчитания, съответстващи на пробата в определена линия. Стойността включва адаптерни бази.

Отчети за адаптерни измервания

Файлт за адаптерни измервания включва броя на адаптери и бази на проби, свързани с всяко разчитане.

Включена е следната информация.

Измерване	Описание
Линия	Линията на поточната клетка, на която пробата е секвенирана.
Sample_ID (Идентификатор на проба)	Идентификаторът на пробата от бланката с проба. Ако разчитането не съответства на проба, полето показва <code>undetermined</code> (неопределено).
index (индекс)	Секвенцията на index1 (индекс 1) от бланката с проба. Полето е празно, ако индексът не е бил уточнен в бланката с проба или стойността на идентификатора на проба е <code>undetermined</code> (неопределен).
index2 (Индекс 2)	Секвенцията на index2 (индекс 2) от бланката с проба. Полето е празно, ако index2 (индекс 2) не е бил уточнен в бланката с проба или стойността на идентификатора на проба е <code>undetermined</code> (неопределен).
R1_AdapterBases (Адаптерни бази R1)	Броят на базите, съответстващи на AdapterRead1 (Адаптерно разчитане 1) в бланката с проба.
R1_SampleBases (Бази на проби R1)	Броят на изрязани или маскирани бази от Read 1 (Разчитане 1) за съответстващата линия и проба.
R2_AdapterBases (Адаптерни бази R2)	Броят на базите, съответстващи на AdapterRead2 (Адаптерно разчитане 2) в бланката с проба.
R2_SampleBases (Бази на проби R2)	Броят на изрязани или маскирани бази от Read 2 (Разчитане 2) за съответстващата линия и проба.
# Reads (Брой разчитания)	Броят на разчитанията за пробата в определената линия.

Index Hopping Counts Report (Отчет за броя на прескачанията на индекс)

Отчетът за броя на прескачанията на индекс съдържа броя на разчитанията за всеки очакван и прескочен индекс за двойните индексни изпълнявания. Отчетът включва само уникални двойни индекси за линия, където не е открито сливане на баркод в който и да е индекс. За генериране на измервания за прескачане на индекс за всяка линия, всяка двойка въвеждания в рамките на всеки индекс трябва да има разстояние на Хеминг най-малко $2N + 1$, където N представлява допустимостта за несъвпадение на баркод, определено за индекса.

Включена е следната информация.

За неиндексирани изпълнявания, единични индексни изпълнявания или линии, които не съдържат уникални двойни индекси, файлът съдържа само горните колонтитули.

Измерване	Описание
Линия	Линията на поточната клетка, на която пробата е секвенирана.
# Reads (Брой разчитания)	Броят на разчитанията за пробата в определената линия.
SampleID (Идентификатор на проба)	Идентификаторът на пробата от бланката с проба. Ако разчитането не съответства на проба, полето показва <code>undetermined</code> (неопределено).
index (индекс)	Секвенцията на index1 (индекс 1) от бланката с проба. Полето е празно, ако разчитането е с единичен край или ако стойността на идентификатора на пробата е <code>undetermined</code> (неопределен).
index2 (индекс 2)	Секвенцията на index2 (индекс 2) от бланката с проба. Полето е празно, ако разчитането е с единичен край или ако стойността на идентификатора на пробата е <code>undetermined</code> (неопределен).

Отчет за най-неизвестни баркодове

Отчетът за най-неизвестни баркодове съдържа първите 100 индекса или индексни двойки на линия, които не са идентифицирани в бланката с проба според броя на позволените несъвпадения. Ако има множество индексни стойности, поставени като 100-тен най-висок запис на броя на индекси, всички стойности на индекси със същия брой са изходни стойности като 100-ия запис.

Включена е следната информация:

Измерване	Описание
Линия	Линията на поточната клетка, на която пробата е секвенирана.
index (индекс)	Секвенцията за всеки неизвестен индекс в index Read1 (Индексно разчитане 1). Полето е празно, ако не са открити неизвестни индекси.
index2 (индекс 2)	Секвенцията за всеки неизвестен индекс в index Read 2 (Индексно разчитане 2). Ако изпълняването е единично разчитане или не са открити неизвестни индекси, полето е празно.
# Reads (Брой разчитания)	Броят на разчитанията за пробата в определената линия.

Отчети за КК в DRAGEN на Illumina

За всички тръбопроводи FastQC на DRAGEN генерира графики за КК по подразбиране. Обобщените резултати за КК се съхраняват в папката `AggregatedFastqcMetrics` и резултатите за проба се съхраняват в папката `<sample_name>`.

Отчетите за КК не се генерират, ако броят на пробите е по-голям 512.

Следните графики за КК са предоставени.

Графика за КК	Описание
adapter_content (съдържание на адаптер)	Процентът от секвенции за всяка двойна бази.
positional_mean_quality (позиционално средно качество)	Среден резултат за качество на основата на скалата на Phred за всяка позиция за разчитане.
gc_content (съдържание на гуанин-цитозин)	Процентът на съдържание на гуанин-цитозин за всяко разчитане на секвениране.
positional_quality.read_1 (позиционално качество на разчитане 1)	Средната стойност на качеството според скалата на Phred на бази със специфични нуклеотиди и в дадено местоположение в Read 1 (Разчитане 1).
gc_quality (качество на гуанин-цитозин)	
positional_quality.read_2 (позиционално качество на разчитане 2)	Средната стойност на качеството според скалата на Phred на бази със специфични нуклеотиди и в дадено местоположение в Read 2 (Разчитане 2).
n_content	
read_length (дължина на разчитане)	Дължината на секвенцията за всяко разчитане.
positional_base_content.read_1 (позиционално съдържание на база на разчитане 1)	Броят на базите за всеки специфичен нуклеотид в дадени местоположения в Read 1 (Разчитане 1).
read_quality (качество на разчитане)	Среден резултат за качество по скалата на Phred за всяко разчитане със секвениране.
positional_base_content.read_2 (позиционално съдържание на база на разчитане 2)	Броят на базите за всеки специфичен нуклеотид в дадени местоположения в Read 2 (Разчитане 2).

Структура на папка за изходни файлове за вторичен анализ в DRAGEN

DRAGEN генерира изходни файлове в папката за изходни файлове, избрани в раздела Settings (Настройки), по подразбиране. За всеки работен процес DRAGEN създава обобщителен отчет във файла `report.html`.

📁 Data

📄 `report.html`

📄 `report_files`

📁 AggregateFastQCPlots

📄 `*.png`

📄 `*stderr_.txt`

📄 `*stdout_.txt`

📄 `dragen_prev_48_hrs.log`

📄 `dln_prev_48_hrs.log`

📄 `SampleSheet.csv`

📄 Run input files (eg, BED, GTF files)

📁 sample_name

📁 enrich_caller , germline_seq, dna_amplicon_seq, rna_seq или scrna_seq

📁 sample_name

📄 `*.png`

📄 `dragen_*.log`

📄 `sample_name.*.metrics.csv`

📄 `[DNA] sample_name.*.vcf.gz`

📄 `[DNA] sample_name.*.gvcf.gz` – неналично за (соматичен) тръбопровод за амлирони за платформата DRAGEN Bio-IT.

📄 `sample_name.*.bam` или `sample_name.*.cram`

📄 `Logs`

📄 `[RNA] sample_name.fusion_candidates.filter_info`

📄 `[RNA] sample_name.fusion_candidates.final`

📄 `[RNA] sample_name.quant.genes.sf`

📄 `[RNA] sample_name.quant.sf`

- sample_name.metrics.json
- [scRNA] sample_dragen-scrna-report.*.html
- [scRNA] sample_name.scRNA.barcodeSummary.tsv
- [Germline] sample_name.roh_metrics.csv
- [Germline] sample_name.roh.bed
- [Germline] sample_name.cyp2d6.tsv
- sample_name.fastqc_metrics.csv
- sample_name.trimmer_metrics.csv

📁 [RNA] DifferentialExpression

📁 Comparison1

- Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv
- Control_vs_Comparison.genes.counts.csv
- Control_vs_Comparison.genes.disp.pdf
- Control_vs_Comparison.genes.heatmap.pdf
- Control_vs_Comparison.genes.ma.pdf
- Control_vs_Comparison.genes.pca.pdf
- Control_vs_Comparison.genes.res.csv
- Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv

📁 ComparisonN

📁 logs

- *.txt
- *.csv

📁 **fastq** – налично само ако KeepFastq е конфигуриран на true (вярно).

- *.fastq.gz

📁 **ora_fastq** – налично само ако FastqCompressionFormat е конфигуриран на dragen.

- *.fastq.ora

📁 RunInstrumentAnalyticsMetrics

📁 0001

- dataset.json
- fastqc_metrics.csv

📁 0002

dataset.json

fastqc_metrics.csv

Adapter_Metrics.csv

Demultiplex_Stats.csv

Index_Hopping_Counts.csv

Reports

Demultiplex_Stats.csv

RunInfo.xml

Trim_Metrics.csv

fastq_list.csv

SampleSheet.csv

Index_Hopping_Counts.csv

Top_Unknown_Barcodes.csv

Read1InstrumentAnalyticsMetrics – само за разчитания на сдвоени краища.

0001

dataset.json

0002

dataset.json

Adapter_Metrics.csv

Demultiplex_Stats.csv

Index_Hopping_Counts.csv

Read1Metrics – само за разчитания на сдвоени краища.

Adapter_Metrics.csv


Index_Hopping_Counts.csv

Поддръжка

Този раздел описва процедурите, необходими за поддръжка на невредима система. Научете се как се инсталират софтуерни актуализации, как се сменя въздушен филтър и как се изпълняват други процедури за периодична поддръжка. Поддържането на контролния софтуер актуализиран подsigурява, че вашата система има инсталирани последните корекции за грешки и функции за оптимална производителност.

Освобождение на пространство на твърдия диск

Едно изпълняване на секвениране изисква около 200 GB пространство на твърдия диск. Показва се уведомление за предупреждение, когато пространството е ниско. Използвайте следните стъпки за освобождение на пространство, като изтриете завършени изпълнявания и инсталирани референтни геноми от папка за временно изпълняване.

 Изтрийте само изпълнявания, използващи контролния софтуер на NextSeq 1000/2000, вместо ръчно чрез операционната система. Ръчното изтриване на изпълнявания може да повлияе отрицателно на контролния софтуер.

1. От менюто на контролния софтуер изберете **Disk Management** (Управление на диска). Показва се екранът Disk Management (Управление на диска) със списък с изпълнявания и референтни геноми, записани на локалния твърд диск.
2. Изберете **Delete Run** (Изтриване на изпълняване) за изпълняването, което желаете да изтриете.
Изтриването на изпълняване изтрива и локалната папка за изпълняване. Папката за изходни файлове, която представлява копие на папката за изпълняване, се запазва.
3. В диалоговия прозорец изберете **Yes, Delete Run** (Да, искам да изтрия изпълняване), за да потвърдите изтриването на изпълняването.
4. Повторете стъпки **2** и **3** за всяко изпълняване, което желаете да изтриете.
5. Изберете **Delete Genome** (Изтриване на геном) за генома, който желаете да изтриете.
6. Изберете **Yes, Delete Genome** (Да, искам да изтрия геном) в диалоговия прозорец.
7. Повторете стъпки **5** и **6** за всеки геном, който желаете да изтриете.
8. Когато приключите, затворете Disk Management (Управление на диска), за да се върнете към екрана Home (Начало).

Софтуерни актуализации

Актуализирането на софтуера гарантира, че вашата система разполага с последните функции и поправки. Софтуерните актуализации са включени в системен комплект, който включва следния софтуер:

- Контролен софтуер на NextSeq 1000/2000
- Рецепти на NextSeq 1000/2000
- Universal Copy Service
- Анализ в реално време

i | Модулите на DRAGEN не са включени в системния комплект. Инсталирайте ги отделно при необходимост. Получете достъп до модулния софтуер на DRAGEN от страниците за поддръжка.

Системата е конфигурирана да изтегля софтуерни актуализации автоматично или ръчно:

- **Automatic updates** (Автоматични актуализации) – актуализациите се изтеглят автоматично от секвенциалния концентратор BaseSpace, за да ги инсталирате. Тази опция изисква връзка с интернет, но не и акаунт в секвенциален концентратор BaseSpace.
- **Manual updates** (Ръчни актуализации) – актуализациите се изтеглят от мрежата ръчно, запазват се локално или на портативно устройство и се инсталират от запазеното местоположение. Тази опция не изисква връзка с интернет за инструмента.

Инсталиране на автоматична софтуерна актуализация

1. Уверете се, че няма изпълнявания на секвениране или извършване на вторичен анализ на инструмента.
2. Влезте в `ilmnadmin`.
3. Изберете **Software Update** (Софтуерна актуализация) от менюто на контролния софтуер. Системите, конфигурирани за автоматични актуализации, показват известие, когато е налична софтуерна актуализация.
4. За проверка за актуализация изберете **Check Online for Software Update** (Проверяване онлайн за софтуерна актуализация).
5. Изберете **Update Now** (Актуализиране сега), за да изтеглите новата версия на софтуера. Когато изтеглянето завърши, контролният софтуер се затваря и се отваря съветникът за инсталация.

Контролният софтуер автоматично се рестартира. Всяка актуализация на фърмуера настъпва автоматично след рестартирането.

i | Отказването на актуализация не е възможно след започване на инсталиране. Може да откажете актуализация по време на изтеглянето.

Инсталиране на ръчна софтуерна актуализация

1. Влезте в `ilmnadmin`.
2. Уверете се, че няма изпълнявания на секвениране или извършване на вторичен анализ на инструмента.
3. Когато е налична софтуерна актуализация, изтеглете инсталиращата програма на комплекта (*.tar.gz) от [страницата за поддръжка на системата за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000](#) . Запишете инсталиращата програма на локално или портативно устройство.
4. Ако сте запазили инсталиращата програма на портативно устройство, включете устройството в USB 3.0 порт, разположен отстрани и на гърба на инструмента.
5. В контролния софтуер изберете **Software Update** (Софтуерна актуализация) от менюто на контролния софтуер.
6. Изберете **Choose...** (Избиране), за да навигирате до инсталиращата програма.
7. Изберете **Update Now** (Актуализиране сега) за започване на инсталацията. Контролният софтуер показва индикатор за заетост по време на инсталирането. Контролният софтуер автоматично се рестартира. Всяка актуализация на фърмуера настъпва автоматично след рестартирането.



Отказването на актуализация не е възможно след започване на инсталиране. Може да откажете актуализация по време на изтеглянето.

Актуализации на работния процес и лиценза на DRAGEN

Само системните администратори могат да инсталират работните процеси на DRAGEN и да подновяват лиценза на DRAGEN.

Подновяване на лиценза на DRAGEN онлайн

Ако NextSeq 1000/2000 е свързан към интернет, актуализирайте вашия лиценз за платформата DRAGEN Bio-IT, както следва.

1. Свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да получите нов лицензионен ключ.
2. Изчакайте 24 часа за автоматично актуализиране на лиценза или актуализирайте лиценза веднага, както следва.
 - a. Изберете менюто на контролния софтуер, след което изберете **DRAGEN**.
 - b. Изберете **Check Online** (Проверяване онлайн), за да проверите дали новият лицензионен ключ на DRAGEN е наличен.
 - c. Ако е наличен, изберете **Update** (Актуализиране).

Подновяване на лиценза на DRAGEN офлайн

Ако NextSeq 1000/2000 не е свързан към интернет, актуализирайте вашия лиценз за платформата DRAGEN Bio-IT, както следва.

1. Свържете се с техническата поддръжка на Illumina, за да получите нов лицензионен ключ. Запишете файла `license.zip` на локално или преносимо устройство.
2. Ако сте запазили *.zip файла на преносимото устройство, включете устройството в USB 3.0 порт, разположен отстрани и на гърба на инструмента. Преместете инструмента, както е необходимо, за да получите достъп до гърба му.
3. Изберете менюто на контролния софтуер, след което изберете **DRAGEN**.
4. Изберете **Choose** (Избиране), за да навигирате до *.zip файла, и след това изберете **Open** (Отваряне).

Инсталиране на работните процеси на DRAGEN онлайн

Ако NextSeq 1000/2000 е свързан към интернет, можете да инсталирате работните процеси на DRAGEN директно в контролния софтуер на NextSeq 1000/2000. Инсталирането на работните процеси на DRAGEN онлайн е налично само в контролния софтуер v1.3 на NextSeq 1000/2000.

1. Изберете менюто на контролния софтуер и след това изберете **Process Management** (Управление на процесите).
2. Уверете се, че няма изпълнявания на секвениране или извършване на вторичен анализ на инструмента.
3. Изберете менюто на контролния софтуер, след което изберете **DRAGEN**.
Под Version (Версия) разделът Available Workflows (Налични работни процеси) посочва работните процеси, инсталирани в момента на системата.
4. За инсталиране на работни процеси на DRAGEN в контролния софтуер на NextSeq 1000/2000 изберете **Check Online** (Проверяване онлайн).
Не всички версии и работни процеси на DRAGEN са съвместими с онлайн инсталацията. Използвайте офлайн инсталацията за допълнителни работни процеси.
5. Изберете квадратчето за отметка за работните процеси, които искате да инсталирате. Ако не е инсталирана, първо инсталирайте последната версия на конвертиране в BCL.
Можете да прегледате информацията относно последната версия на работния процес в бележките по версията.
6. Изберете **Install** (Инсталиране) за започване на инсталацията.
7. Въведете `ilmnadmin` за системната парола и изберете **Authenticate** (Удостоверяване).

Инсталиране на работните процеси на DRAGEN офлайн

1. Когато актуализацията на работния процес на DRAGEN е налична, изтеглете инсталиращата програма (*.tar.gz) от [страницата за поддръжка на DRAGEN](#). Запишете инсталиращата програма на локално или портативно устройство.
2. Ако сте запазили инсталиращата програма на портативно устройство, включете устройството в USB 3.0 порт, разположен отстрани и на гърба на инструмента. Преместете инструмента, както е необходимо, за да получите достъп до гърба му.
3. Изберете менюто на контролния софтуер и след това изберете **Process Management** (Управление на процесите).
4. Уверете се, че няма изпълнявания на секвениране или извършване на вторичен анализ на инструмента.
5. Изберете менюто на контролния софтуер, след което изберете **DRAGEN**.
6. Под Version (Версия) изберете **Browse for New Version** (Преглед за нова версия) за навигиране до инсталиращата програма.
7. Изберете **Install** (Инсталиране) за започване на инсталацията.
8. Въведете ilmnadmin за системната парола и изберете **Authenticate** (Удостоверяване).

Подмяна на въздушен филтър

Използвайте изброените по-долу инструкции, за да подмените въздушен филтър с изтекъл срок на годност на всеки 6 месеца.

Въздушният филтър е правоъгълна касета за еднократна употреба, която покрива вентилатора от дясната страна на инструмента. Той осигурява правилното охлаждане и предотвратява попадането на отпадъци в системата. Инструментът се доставя с един инсталиран и един резервен въздушен филтър. Допълнителни резервни части са включени във валиден договор за сервизно обслужване на инструменти или те могат да бъдат закупени отделно от Illumina.

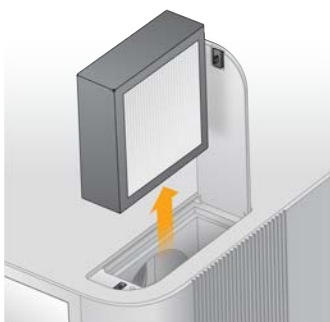
1. В горната част на инструмента натиснете дясната страна на горния панел, за да се освободи, както е показано на следващата илюстрация.



- Отворете панела.



- Натиснете, за да освободите касетата на въздушния филтър, извадете от центъра на панела и изхвърлете.



- Поставете нов въздушен филтър в приемника и го натиснете, за да се фиксира.
- Затворете горния панел и натиснете на място.



- Върнете инструмента до първоначалната позиция.

Отстраняване на неизправности

Този раздел предоставя инструкции стъпка по стъпка за отказване на изпълняване, изключване и рестартиране на инструмента и други процедури за отстраняване на неизправности.

Отстраняване на съобщение за грешка


Това приложение предоставя подробни инструкции за различни стъпки за отстраняване на неизправности. В блоксхемата по-долу е предоставен общ преглед на съобщенията за грешка при отстраняване на неизправности, които се показват по време на инициализирането, конфигурирането на изпълняване или секвенирането и които не се разрешават с повторен опит.

Много от грешките могат да бъдат разрешени чрез прилагане на изключване и рестартиране: изключване на инструмента и рестартиране му след това. Вижте [Изключване и рестартиране на инструмента на страница 91](#) за повече информация за изключване и рестартиране.



Връщане на консумативи за съхранение

Използвайте следните инструкции за съхранение на размразена касета или поточна клетка в случай на грешка на инструмента по време на проверка преди изпълняване на инструмента преди проверка на флуидиката.

1. Разделете поточната клетка от касетата.
2. Премахнете и изхвърлете разредената библиотека от резервоара (до около 18 µl).
-  Подгответе пряно разреждане от същата библиотека за следващото изпълняване, за да предотвратите кръстосано замърсяване на пробата с остатъчната библиотека в резервоара.
3. Позиционирайте касетата за съхранение при 2°C до 8°C така, че етикетът да сочи нагоре и от всички страни да може да циркулира въздух.
Не превишавайте 72 часа. Ако касетата е била размразена в хладилника за 12 часа през нощта, не превишавайте 60 часа.
4. Върнете поточната клетка в оригиналната опаковка от метално фолио с десикант.
5. Залепете с фолиевата опаковка и поставете за съхранение при 2°C до 8°C.
Не превишавайте 72 часа.

Отказ на изпълняване

1. Изберете **End Run** (Прекратяване на изпълняване).
2. За да изчистите автоматично касета с реагенти, изберете квадратчето за отметка **Purge Reagent Cartridge** (Изчистване на касета с реагенти).
Изборът по подразбиране е конфигуриран в настройките на контролния софтуер на NextSeq 1000/2000.
3. Изберете **Yes, end the sequencing run** (Да, искам да приключа изпълняването на секвениране).
Отказването на изпълняване е окончателно. Софтуерът не може да продължи с изпълняването и консумативите не могат да бъдат използвани повторно след частта за проверка на инструмента за проверки преди изпълняване.
4. Изберете **Eject Cartridge** (Изваждане на касета), за да отворите вратичката и да извадите таблата.
5. Отстранете касетата от таблата.
6. Съхранете или изхвърлете касетата в зависимост от момента, в който е настъпил отказът:

Обстоятелство	Вариант
Вие сте отказали преди или по време на проверката преди изпълняване на инструмента и искате да използвате отново консумативите.	Вижте Връщане на консумативи за съхранение на страница 89 .
Всички останали обстоятелства.	Вижте Изваждане на консумативите на страница 58 .

- Изберете **Close Door** (Затваряне на вратичката), за да заредите повторно таблата и да се върнете към екрана Home (Начало).
Сензорите потвърждават отстраняването на касетата.

Повторно нареждане на изпълняване на опашка

Ако се появи грешка за Status of Secondary Analysis (Състояние на вторичен анализ) в Process Management (Управление на процеси), можете да наредите изпълняването отново на опашка за повторно изпълняване на анализ в DRAGEN на инструмента на генерираните sBCL файлове. Оригиналната папка за изпълняване трябва все още да е налична на инструмента за функцията за нареждане отново на опашка. Използването на функцията за нареждане отново на опашка не нарежда отново на опашка изпълнявания в секвенциален концентратор BaseSpace. За нареждане отново на опашка в секвенциален концентратор BaseSpace вижте Fix Sample Sheet (Поправяне на бланка с проба) в помощния център на секвенциален концентратор BaseSpace.

- Актуализирайте вашата бланка с проба v2 и след това запишете бланката с проба към портативно или монтирано мрежово устройство.
- Ако сте записали бланката с проба към портативно устройство, поставете устройството в USB 3.0 порт, разположен от страни и на гърба на инструмента. Преместете инструмента, както е необходимо, за да получите достъп до гърба му.
- Изберете менюто на контролния софтуер и след това изберете **Process Management** (Управление на процесите).
- Уверете се, че няма изпълнявания на секвениране или извършване на вторични анализи на инструмента.
- Изберете **Queue** (Нареждане отново на опашка) до завършеното изпълняване за нареждане отново на опашка.
- Изберете **Choose** (Избиране) за навигиране до актуализираната бланка с проба и след това изберете **Open** (Отваряне).
- Изберете **Start Queue** (Стартиране на нареждане отново на опашка).

Изключване и рестартиране на инструмента

Прилагането на изключване и рестартиране на инструмента безопасно изключва и рестартира системата, за да възстанови прекъснатата връзка, да извърши подравняване спрямо спецификация или да разреши проблем с неуспешно инициализиране. Съобщенията в софтуера посочват кога да извършите цикъл на захранване, за да разрешите грешка или предупреждение.

1. От менюто на контролния софтуер изберете **Shut Down Instrument** (Изключване на инструмента).
2. Ако системата не се изключва, задръжте бутона за захранване от дясната страна на инструмента, докато светлината изчезне.
3. Когато бутонът за захранване премигне, натиснете превключвателя за изключване на позиция (O) на задния панел.
Бутонът за захранване може да продължи да премигва след изключване на захранването.

Фигура 8 Местоположение на превключвателя



4. Изчакайте 30 секунди.
5. Натиснете страната за включване (I) на превключвателя.
6. Когато бутонът за захранване премигне, изчакайте 30 секунди и го натиснете.

Фигура 9 Местоположение на бутона за захранване



7. Изчакайте 5 минути, за да се зареди операционната система. Когато операционната система се зареди, влезте в системата.

Контролният софтуер се стартира и инициализира системата. Изчакайте 5 минути за инициализиране на системата. Показва се екранът Home (Начало), когато инициализирането е завършено.

Извършване на проверка на системата

Не се изисква системна проверка за нормална работа или поддръжка на инструмент. Въпреки това представител на техническата поддръжка на Illumina може да поиска да изпълни системна проверка за целите на отстраняване на неизправности.

Четири подсистемни проверки отнемат около 58 минути за отстраняване на неизправности при грешки по време на проверка преди изпълняване и други проблеми. Тестовите потвърждават дали компонентите са правилно подравнени и функционират.

Резултатите от теста се извеждат към папката `system-check`, намираща се в `/usr/local/illumina/system-check`.

Уверете се, че разтоварвате касетата преди изпълняване на системни проверки.

Изпълняване на системна проверка

1. От менюто на контролния софтуер изберете **System Check** (Проверка на системата).
2. Изберете квадратчето за отметка за която и да е от следните проверки на системата, които искате да изпълните.
 - **Network Connectivity** (Мрежова свързаност) – проверява състоянието на мрежова връзка и производителност.
 - **Enclosure** (Заграждане) – проверява производителността на топлинната система и механизма за повдигане на вратичката.
 - **Motion** (Движение) – проверява ограниченията за придвижване и производителност на Z-стадий и XY-стадий.
 - **Optics** (Оптика) – проверява производителността на модула за изобразяване.
3. Изберете **Start** (Начало).

Връщане до фабричните настройки

Върнете системата до фабричните настройки по подразбиране, за да върнете софтуера до по-стара версия или да осигурите възстановяване след нежелана конфигурация. Тази функция трябва да се използва само от представител на Illumina.

Заснемане на инсталирано изображение

Заснемете системно изображение, за да архивирате успешно функционираща софтуерна инсталация. Това системно изображение може да бъде възстановено на по-късен етап. Препоръчително е да заснемете изображението на системата веднага след завършване на първоначалната инсталация и да промените на паролата си с представител на Illumina.

1. Рестартирайте Linux.
2. Когато сте подканени да изберете операционна система, изберете **Capture Installed Image** (Заснемане на инсталирано изображение).

Показват се за кратко опциите за операционна система преди автоматично продължаване към контролния софтуер на NextSeq 1000/2000.



Тъй като в паметта се запазва само едно изображение, това ще замени предварително заснетото изображение.

3. Изчакайте около 30 минути, докато системата заснеме текущото инсталирано изображение. Заснемането може да включва няколко рестартирания. Когато завърши, системата се рестартира с текущото инсталирано изображение, съхранено в паметта.

Възстановяване на заснетото изображение

Възстановете системата до предишното заснето изображение за възстановяване от нежелана конфигурация.

1. Рестартирайте Linux.
2. Когато сте подканени да изберете операционна система, изберете **Restore Installed Image** (Възстановяване на инсталирано изображение).

Показват се за кратко опциите за операционна система преди автоматично продължаване към контролния софтуер на NextSeq 1000/2000.



Паролите са обвързани със системното изображение. След възстановяване използвайте паролата на възстановеното изображение за вход в системата.

3. Изчакайте около 30 минути, за да завърши възстановяването. Връщането може да включва няколко рестартирания. Когато завърши, системата се рестартира с възстановеното изображение.

Източници и справочна литература

Настройки на бланка с проба v2

Ако следвате Local mode (Локален режим), можете да използвате файлов формат v2 за бланка с проба за конфигуриране на настройките ви за изпълняване. Създайте бланката с проба в Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмента) или чрез редактиране на *NextSeq 1000 and NextSeq 2000 Sequencing Systems Sample Sheet v2 Template* (Шаблон на бланка с проба v2 за системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000). Когато редактирате бланката с проба се уверете, че следните раздели и полета са включени в посочената последователност и отговарят на изискванията. След редактиране използвайте преносимо или монтирано мрежово устройство, за да прехвърлите бланката с проба в системите за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000. Когато навигирате до бланката с проба в контролния софтуер, бланката с проби се копира в папка преди изпълняване на инструмента така, че портативното устройство да може да се премахне.

Уверете се, че настройките на бланката с проба v2 отговарят на следните изисквания:

- Индексните секвенции, посочени в раздела на бланката с проба BCLConvert_Data (Данни за конвертиране в BCL), трябва да отговарят на индексния комплект, избран в NextSeq 1000/2000.
- Ако използвате контролния софтуер v1.2 на NextSeq 1000/2000, версията на DRAGEN, посочена в бланката с проба, трябва да бъде инсталирана и активна на системата. За информация за инсталиране вижте [Софтуерни актуализации на страница 83](#).
- Ако използвате контролния софтуер v1.3 на NextSeq 1000/2000, версията на DRAGEN, посочена в бланката с проба, трябва да бъде инсталирана на системата. Контролният софтуер автоматично открива версията на DRAGEN от бланката с проба и ви подканва да превключите активните версии, ако е необходимо. За информация за инсталиране вижте [Софтуерни актуализации на страница 83](#).

Ако използвате DRAGEN, ще е необходимо да конфигурирате допълнителни настройки. За повече информация вижте [Настройки на бланка с проба в DRAGEN на страница 99](#)

Изтеглете шаблона на бланка с проба v2 от продуктови файлове в страницата за поддръжка на системи за секвениране NextSeq 1000 и NextSeq 2000. Ако сте създали бланка с проба чрез Instrument Run Setup (Конфигуриране на изпълняване на инструмент), промяната на бланката с проба след първоначалното изтегляне може да доведе до неуспех в анализа.

Имената на файловете не може да съдържат специални знаци.

Изисквания за [Горен колонтитул]

Разделът [Горен колонтитул] включва обобщаваща информация за вашето изпълняване. Следните са налични в полетата и описанията на [Горен колонтитул].

Поле	Изисква се	Описание
FileFormatVersion (Версия на файловия формат)	Да	Версията на бланката с проба. Въведете 2 за тази стойност.
RunName (Име на изпълняване)	Не	Уникалното име на изпълняване по ваше предпочитание. RunName (Име на изпълняване) може да съдържа цифрено-буквени знаци, долни черти, тирета и точки. Ако RunName (Име на изпълняване) съдържа интервали или специални знаци, анализът е неуспешен.
RunDescription (Описание на изпълняване)	Не	Описание на изпълняването.
InstrumentPlatform (Платформа на инструмента)	Не	NextSeq 1000/2000
InstrumentType (Тип на инструмента)	Не	NextSeq 1000/2000

Изисквания за [Разчитания]

Разделът [Разчитания] описва броя на цикли на секвениране, използвани за геномни и индексни разчитания 1 и 2. Следните са наличните полета и описания на [Разчитания].

Поле	Изисква се	Описание
Read1Cycles (Цикли на разчитане 1)	Да	Брой цикли в първото разчитане. Стойността може да бъде цяло число, по-голямо от нула.
Read2Cycles (Цикли на разчитане 2)	Не	Брой цикли във второто разчитане.
Index1Cycles (Цикли в индекс 1)	Не	Брой цикли в първото индексно разчитане. Изисква се, когато се секвенира повече от една проба. Максималният брой е 10 цикъла.
Index2Cycles (Цикли в индекс 2)	Не	Брой цикли във второто индексно разчитане. Максималният брой е 10 цикъла.

Изисквания за [Настройки на секвениране]

Използвайте раздела [Настройки на секвениране] за определяне на комплекта за приготвяне на библиотеки, който използвате.

Поле	Изисква се	Описание
LibraryPrepKits (Комплекти за приготвяне на библиотеки)	Не	<p>Вашият комплект за приготвяне на библиотеки. Позволен е само един комплект за приготвяне на библиотеки.</p> <p>Ако използвате контролния софтуер v1.3 на NextSeq 1000/2000, персонализирана рецепта се избира автоматично, ако са посочени комплект Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus или комплект Illumina Stranded mRNA Prep като комплект за приготвяне на библиотеки.</p> <p>Въведете една от следните стойности:</p> <ul style="list-style-type: none"> Комплект Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus – <code>ILMNStrandedTotalRNA</code> Комплект Illumina Stranded mRNA Prep – <code>ILMNStrandedmRNA</code>

Изисквания за конвертиране в BCL

Разделите за конвертиране в BCL предоставят информация за конвертиране на вашите данни от BCL в FASTQ. Опциите за конвертиране в BCL включват два отделни раздела: [BCLConvert_Settings] (Настройки на конвертиране в BCL) и [BCLConvert_Data] (Данни за конвертиране в BCL). Разделите за конвертиране в BCL изискват информация относно индексните адаптерни секвенции. За идентифициране на съвместимата адаптерна секвенция за всяко разчитане и индекс вижте *Адаптерни секвенции на Illumina (документ № 1000000002694)*.

Следните са наличните полета и описания [BCLConvert_Settings] (Настройки на конвертиране в BCL).

Поле	Изисква се	Описание
SoftwareVersion (Версия на софтуера)	Да	Версията на софтуера на DRAGEN, който е инсталиран в момента на системата. Използвайте всички три цели числа в името на версията. Например 3.5.7.
BarcodeMismatchesIndex1 (Индекс 1 на несъвпадения на баркод)	Не	Броят на позволени несъвпадения между първото индексно разчитане и индексната секвенция. Стойностите могат да бъдат 0, 1 или 2. Стойността по подразбиране е 1.
BarcodeMismatchesIndex2 (Индекс за несъвпадения на баркод 2)	Не	Броят на позволени несъвпадения между второто индексно разчитане и индексната секвенция. Стойностите могат да бъдат 0, 1 или 2. Стойността по подразбиране е 1.
FastqCompressionFormat (Формат за компресия на Fastq)	Не	За изходни FASTQ файлове като *.gz файл въведете <code>gzip</code> . За записване на FASTQ файлове като *.ora файл и използване с DRAGEN Decompression (Декомпресиране на DRAGEN), въведете <code>dragen</code> .
AdapterRead1 (Адаптерно разчитане 1)	Не	Секвенцията за изрязване или маскиране от края на разчитане 1. Адаптерната секвенция на Read 1 (Разчитане 1) съдържаща A, C, G или T. AdapterRead1 (Адаптерно разчитане 1) изрязва кръгове по подразбиране.

Поле	Изисква се	Описание
AdapterRead2 (Адаптерно разчитане 2)	Не	Секвенцията за изрязване или маскиране от края на разчитане 2. Адаптерната секвенция на Read 2 (Разчитане 2), съдържаща A, C, G или T. AdapterRead2 (Адаптерно разчитане 2) изрязва кръгове по подразбиране.
OverrideCycles (Презаписване на цикли)	Не	Низ, използван за задаване на UMI цикли и маскиране на цикли на разчитане. Позволен са следните стойности: <ul style="list-style-type: none"> • N – задава цикли за игнориране. • Y – задава цикли за секвениране. • I – задава индексни цикли. • U – задава UMI цикли за изрязване. Всеки елемент е разделен с точка и запетая. Следните са примери за входни данни за OverrideCycles (Презаписване на цикли). U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

Следните са наличните полета и описания на [BCLConvert_Data] (Данни за конвертиране в BCL).

Поле	Изисква се	Описание
Sample_ID (Идентификатор на проба)	Да	Идентификаторът на пробата. Идентификаторът на пробата може да съдържа до 20 буквено-цифрени знака, дефиси и долни черти. Идентификаторът е различаващ главни от малки букви. Разделете всеки идентификатор с тире или долна черта. Например Sample1-DQB1-022515.
Index (Индекс)	Не	Индексната секвенция, свързана с пробата. Само A, C, T, G са разрешени. Изисква се, когато се секвенира повече от една проба.

Поле	Изисква се	Описание
Index2 (Индекс 2)	Не	Втората индексна секвенция, свързана с пробата. Само A, C, T, G са разрешени. Уверете се, че вторите индексни (i5) адаптерни секвенции са с предна ориентация. DRAGEN автоматично обръща комплементарните i5 индекси по време на вторичния анализ.
Lane (Линия)	Не	Линията на поточната клетка. Линиите се представляват от една целочислена стойност.

Настройки на бланка с проба в DRAGEN

Този раздел описва изискванията на бланката с проба за всеки тръбопровод в DRAGEN. Добавете вашите настройки на тръбопровод в DRAGEN като последния раздел на вашата бланка с проба. Можете да използвате само един тръбопровод в DRAGEN.

Всеки тръбопровод в DRAGEN включва различни раздели за настройки и данни.

Изисквания за тръбопровод за герминативна линия в DRAGEN

Следните са наличните полета и описания на [DragenGermline_Settings] (Настройки на герминативна линия в Dragen).

Поле	Изисква се	Описание
SoftwareVersion (Версия на софтуера)	Да	Версията на софтуера на DRAGEN, който е инсталиран в момента на системата. Използвайте всички три цели числа в името на версията. Например 3.5.7. Версията на софтуера трябва да съвпада с версията, определена в раздела Настройки на конвертиране в BCL.
ReferenceGenomeDir (Директория на референтен геном)	Да	Име на референтния геном. Например hg19_alt_aware. Използвайте името на референтния геном, който се намира в <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . За да използвате персонализиран референтен геном, вижте <i>конструктора на справки за онлайн помощта за приложението Illumina Instruments v1.0.0</i> .

Поле	Изисква се	Описание
MapAlignOutFormat	Не	Форматирането на изходния файл. Позволените стойности са bam или cram. Ако не е определена стойност, тази по подразбиране липсва.
KeepFastq	Не	За да запишете изходните FASTQ файлове, въведете true (вярно). За да премахнете изходните FASTQ файлове, въведете false (грешно).

Следните са наличните полета и описания на [DragenGermline_Data] (Данни за герминативна линия в Dragen).

Поле	Изисква се	Описание
Sample_ID (Идентификатор на проба)	Да	Идентификаторът на пробата. Идентификаторът на пробата може да съдържа до 20 буквено-цифрени знака. Идентификаторът е различаващ главни от малки букви. Разделете всеки идентификатор с тире. Например Sample1-DQB1-022515. Идентификатори на пробата трябва да съвпадат с идентификаторите, определени в раздела Данни за конвертиране в BCL.

Изисквания за тръбопровод на РНК в DRAGEN

Следните са наличните полета и описания на [DragenRNA_Settings] (Настройки на РНК в Dragen).

Поле	Изисква се	Описание
SoftwareVersion (Версия на софтуера)	Да	Версията на софтуера на DRAGEN, който е инсталиран в момента на системата. Използвайте всички три цели числа в името на версията. Например 3.5.7. Версията на софтуера трябва да съвпада с версията, определена в раздела Настройки на конвертиране в BCL.

Поле	Изисква се	Описание
ReferenceGenomeDir (Директория на референтен геном)	Да	Име на референтния геном. Например hg38_noalt_with_decoy. Използвайте името на референтния геном, който се намира в /usr/local/illumina/genomes. За да използвате персонализиран референтен геном, вижте <i>конструктора на справки за онлайн помощта за приложението Illumina Instruments v1.0.0</i> .
RnaGeneAnnotationFile (Файл с анотации за РНК ген)	Не	Файлът, който съдържа анотации за РНК ген. Позволените стойности са само буквено-цифрени знаци. Ако не е предоставен, се използва файлът с анотации по подразбиране, който е включен в определен референтен геном.
MapAlignOutFormat	Не	Форматирането на изходния файл. Позволените стойности са bam или cram. Ако не е определена стойност, тази по подразбиране липсва.
KeepFastq	Не	За да запишете изходните FASTQ файлове, въведете true (вярно). За да премахнете изходните FASTQ файлове, въведете false (грешно).
DifferentialExpressionEnable (Активиране на диференциална експресия)	Не	За да активирате диференциална гена експресия, въведете true (вярно). Въведете false (грешно), за да изключите диференциалната гена експресия от анализа.

Следните са наличните полета и описания на [DrogenRna_Data] (Данни за РНК в Dragen).

Поле	Изисква се	Описание
Sample_ID (Идентификатор на проба)	Да	Идентификаторът на пробата. Идентификаторът на пробата може да съдържа до 20 буквено-цифрени знака. Идентификаторът е различаващ главни от малки букви. Разделете всеки идентификатор с тире. Например Sample1-DQB1-022515. Идентификатори на пробата трябва да съвпадат с идентификаторите, определени в раздела Данни за конвертиране в BCL.
Comparison<N> (Сравнение <N>)	Не	Стойността на контролата или сравнението за всяка проба. Ако няма контролна или сравнителна стойност за пробата, пробата е назначена като na (не е приложимо). Всички проби, маркирани с контрола, са сравнени с всички проби, маркирани със сравнение. Стойността N отразява сравнителната група за пробите.

Изисквания за тръбопровод за обогатяване в DRAGEN

Следните са наличните полета и описания на [DrogenEnrichment_Settings] (Настройки за обогатяване в Dragen).

Поле	Изисква се	Описание
SoftwareVersion (Версия на софтуера)	Да	Версията на софтуера на DRAGEN, който е инсталиран в момента на системата. Използвайте всички три цели числа в името на версията. Например 3.5.7. Версията на софтуера трябва да съвпада с версията, определена в раздела Настройки на конвертиране в BCL.

Поле	Изисква се	Описание
ReferenceGenomeDir (Директория на референтен геном)	Да	Име на референтния геном. Например hg38_alt_aware. Референтните геноми се намират в /usr/local/illumina/genomes. За да използвате персонализиран референтен геном, вижте <i>конструктора на справки за онлайн помощта за приложението Illumina Instruments v1.0.0</i> .
BedFile (Bed файл)	Да	Bed файлът, съдържащ регионите, които са цел.
GermlineOrSomatic (Герминативна линия или соматичен)	Да	За изпълнение на обогатителен анализ на герминативна линия въведете <code>germline</code> (герминативна линия). За изпълнение на обогатителен соматичен анализ, въведете <code>somatic</code> (соматичен).
KeepFastq	Не	За да запишете изходните FASTQ файлове, въведете <code>true</code> (вярно). За да премахнете изходните FASTQ файлове, въведете <code>false</code> (грешно).
MapAlignOutFormat	Не	Форматирането на изходния файл. Позволените стойности са <code>bam</code> или <code>cram</code> . Ако не е определена стойност, тази по подразбиране липсва.
AuxNoiseBaselineFile (Файл за допълнителни смущения на основната линия)	Не	Името на файла за смущения на основната линия. Може да използвате файлов формат <code>*.txt</code> или <code>*.gz</code> . Файловете за смущения на основната линия са налични само при използване на соматичен режим. Вижте Импортиране на файлове за смущения на основната линия на страница 19 за повече информация.

Следните са наличните полета и описания на [DragenEnrichment_Data] (Данни за обогатяване в Dragen).

Поле	Изисква се	Описание
Sample_ID (Идентификатор на проба)	Да	Идентификаторът на пробата. Идентификаторът на пробата може да съдържа до 20 буквено-цифрени знака. Идентификаторът е различаващ главни от малки букви. Разделете всеки идентификатор с тире. Например идентификаторите Sample1-DQB1-022515.Sample трябва да съвпадат с идентификаторите, определени в раздела Данни за конвертиране в BCL.

Изисквания за тръбопровод на ДНК ампликон в DRAGEN

Следните са наличните полета и описания на [DragenAmplicon_Settings] (Настройки на ампликон в Dragen).

Поле	Изисква се	Описание
SoftwareVersion (Версия на софтуера)	Да	Версията на софтуера на DRAGEN, който е инсталиран в момента на системата. Използвайте всички три цели числа в името на версията. Например 3.5.7. Версията на софтуера трябва да съвпада с версията, определена в раздела Настройки на конвертиране в BCL.
ReferenceGenomeDir (Директория на референтен геном)	Да	Име на референтния геном. Например hg38_alt_aware. Референтните геноми се намират в /usr/local/illumina/genomes. За да използвате персонализиран референтен геном, вижте <i>конструктора на справки за онлайн помощта за приложението Illumina Instruments v1.0.0</i> .
DnaBedFile (ДНК bed файл)	Да	Bed файлът, съдържащ регионите, които са цел. Изходните данни на bed файла може да бъдат във файлов формат *.txt или *.gz.

Поле	Изисква се	Описание
DnaGermlineOrSomatic (ДНК на герминативна или соматична линия)	Да	За изпълнение на анализ на герминативен ДНК ампликон, въведете <code>germline</code> (герминативна линия). За изпълнение на анализ на соматичен ДНК ампликон, въведете <code>somatic</code> (соматичен).
KeepFastq	Не	За да запишете изходните FASTQ файлове, въведете <code>true</code> (вярно). За да премахнете изходните FASTQ файлове, въведете <code>false</code> (грешно).
MapAlignOutFormat	Не	Форматирането на изходния файл. Позволените стойности са <code>bam</code> или <code>cram</code> . Ако не е определена стойност, тази по подразбиране липсва.

Следните са наличните полета и описания на [DragenAmplicon_Data] (Данни за ампликон в Dragen).

Поле	Изисква се	Описание
Sample_ID (Идентификатор на проба)	Да	Идентификаторът на пробата. Идентификаторът на пробата може да съдържа до 20 буквено-цифрени знака. Идентификаторът е различаващ главни от малки букви. Разделете всеки идентификатор с тире. Например идентификаторите Sample1-DQB1-022515.Sample трябва да съвпадат с идентификаторите, определени в раздела Данни за конвертиране в BCL.
DnaOrRna (ДНК или РНК)	Да	Типът анализ на ампликони за изпълнение. Само анализ на ДНК се поддържа за DRAGEN v3.8. Въведете <code>dna</code> (ДНК).

Изисквания за тръбопровод на единичноклетъчна РНК в DRAGEN

Следните са наличните полета и описания на [DragenSingleCellRNA_Settings] (Настройки на едноклетъчна РНК в Dragen). За информация относно съвместимост в комплекти на трети страни вижте страницата за поддръжка за продуктова съвместимост на платформата DRAGEN Bio-IT.

Комплекти за библиотека на единична клетка 1 – 5

Следните настройки за бланка с проба се прилагат към комплектите за приготвяне на библиотека със същата генетична структура като комплекти за библиотека на единична клетка в DRAGEN 1 – 5. Използвайте страницата за поддръжка за продуктова съвместимост на платформата DRAGEN Bio-IT за потвърждение на генетичната структура за вашия комплект.

Поле	Изисква се	Описание
SoftwareVersion (Версия на софтуера)	Да	Версията на софтуера на DRAGEN, който е инсталиран в момента на системата. Използвайте всички три цели числа в името на версията. Например 3.5.7. Версията на софтуера трябва да съвпада с версията, определена в раздела Настройки на конвертиране в BCL.
ReferenceGenomeDir (Директория на референтен геном)	Да	Име на референтния геном. Например hg38_alt_aware. Референтните геноми се намират в /usr/local/illumina/genomes. За да използвате персонализиран референтен геном, вижте конструктора на справки за онлайн помощта за приложението <i>Illumina Instruments v1.0.0</i> .
RnaLibraryType (Тип библиотека за РНК)	Не	Въведете една от следните стойности: <ul style="list-style-type: none"> • SF – правоверижна. SF е стойността по подразбиране. • SR – обратноверижна. • U – неверижна.
RnaGeneAnnotationFile (Файл с анотации за РНК ген)	Не	Файлът, който съдържа анотации за РНК ген. Позволен са само буквено-цифрени знаци. Ако не е предоставен, се използва файлът с анотации по подразбиране, който е включен в определен референтен геном.
BarcodeRead (Разчитане на баркод)	Не	Местоположението в рамките на изпълняването на секвениране на разчитането на баркод, което съдържа както баркода, така и UMI. Стойностите могат да съдържат Read1 (Разчитане 1) или Read2 (Разчитане 2). Стойността по подразбиране е Read1 (Разчитане 1).

Поле	Изисква се	Описание
BarcodePosition (Позиция на баркода)	Да	<p>Местоположението на базите, съответстващи на баркода в рамките на стойността, въведена за BarcodeRead (Разчитане на баркода). Позициите на базите са индексирани, като се започне от нулева позиция. Въведете стойността на BarcodePosition (Позиция на баркода) в следния формат:</p> <pre>0_<barcode end position></pre> <p>Например, ако баркодът съдържа 16 бази, стойността е 0_15.</p>
UmiPosition (Позиция на UMI)	Да	<p>Местоположението на базите, съответстващи на UMI в рамките на стойността, въведена за BarcodeRead (Разчитане на баркода). Въведете стойността на UmiPosition (Позиция на UMI) в следния формат:</p> <pre><UMI start position>_<UMI end position></pre> <p>Например, ако UMI съдържа 10 бази и баркодът съдържа 16, стойността е 16_25.</p>
BarcodeSequenceWhitelist (Бял списък на баркод секвенция)	Не	Името на файла, съдържащ секвенцията на баркода за добавяне. Името на файла може да съдържа цифрено-буквени знаци, тирета, долни черти и точки.
KeepFastq	Не	За да запишете изходните FASTQ файлове, въведете <code>true</code> (вярно). За да премахнете изходните FASTQ файлове, въведете <code>false</code> (грешно).
MapAlignOutFormat	Не	Форматирането на изходния файл. Позволените стойности са <code>bam</code> или <code>cram</code> . Ако не е определена стойност, тази по подразбиране липсва.

Следните са наличните полета и описания на [DraGenSingleCellRNA_Data] (Данни за едноклетъчна РНК в DraGen).

Поле	Изисква се	Описание
Sample_ID (Идентификатор на проба)	Да	Идентификаторът на пробата. Идентификаторът на пробата може да съдържа до 20 буквено-цифрени знака. Идентификаторът е различаващ главни от малки букви. Разделете всеки идентификатор с тире. Например идентификаторите Sample1-DQB1-022515.Sample трябва да съвпадат с идентификаторите, определени в раздела Данни за конвертиране в BCL.

Комплект за библиотека на единична клетка 6

Следните настройки на бланка с проба се прилагат към комплектите за приготвяне на библиотеки със същата генетична структура като комплекти за библиотека на единична клетка 6. Използвайте страницата за поддръжка за продуктова съвместимост на платформата DRAGEN Bio-IT за потвърждение на генетичната структура на вашия комплект.

Поле	Изисква се	Описание
SoftwareVersion (Версия на софтуера)	Да	Версията на софтуера на DRAGEN, който е инсталиран в момента на системата. Използвайте всички три цели числа в името на версията. Например 3.5.7. Версията на софтуера трябва да съвпада с версията, определена в раздела Настройки на конвертиране в BCL.
ReferenceGenomeDir (Директория на референтен геном)	Да	Име на референтния геном. Например hg38_alt_aware. Референтните геноми се намират в /usr/local/illumina/genomes. За да използвате персонализиран референтен геном, вижте конструктора на справки за онлайн помощта за приложението <i>Illumina Instruments v1.0.0</i> .

Поле	Изисква се	Описание
RnaLibraryType (Тип библиотека за РНК)	Не	<p>Въведете една от следните стойности:</p> <ul style="list-style-type: none"> • SF – правоверижна. • SR – обратноверижна. • U – неверижна.
RnaGeneAnnotationFile (Файл с анотации за РНК ген)	Не	<p>Файлът, който съдържа анотации за РНК ген. Позволени са само буквено-цифрени знаци. Ако не е предоставен, се използва файлът с анотации по подразбиране, който е включен в определен референтен геном.</p>
BarcodeRead (Разчитане на баркод)	Не	<p>Местоположението в рамките на изпълняването на секвениране на разчитането на баркод, което съдържа както баркода, така и UMI. Стойностите могат да съдържат Read1 (Разчитане 1) или Read2 (Разчитане 2). Стойността по подразбиране е Read1 (Разчитане 1).</p>
BarcodePosition (Позиция на баркода)	Да	<p>Местоположението на базите, съответстващи на баркодовете в рамките на стойността, въведена за BarcodeRead (Разчитане на баркода). Позициите на базите са индексирани, като се започне от нулева позиция. Въведете стойността на BarcodePosition (Позиция на баркода) в следния формат:</p> <pre>0_<first barcode end position>+<second barcode start position>_<second barcode end position>+<third barcode start position>_<third barcode end position></pre> <p>Например следната структура би довела до стойността 0_8+21_29+43_51:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 9 бази в първия баркод (0_8). • 12 бази между първия и втория баркод. • 9 бази във втория баркод (21_29). • 13 бази между втория и третия баркод. • 9 бази в третия баркод (43_51).

Поле	Изисква се	Описание
UmiPosition (Позиция на UMI)	Да	Местоположението на базите, съответстващи на UMI в рамките на стойността, въведена за BarCodeRead (Разчитане на баркода). Въведете низа в следния формат: <UMI start position>_<UMI end position> Например, ако UMI съдържа 8 бази и броят на базите преди UMI е общо 51, стойността е 52_59.
BarcodeSequenceWhitelist (Бял списък на баркод секвенция)	Не	Името на файла, съдържащ секвенцията на баркода за добавяне към белия списък. Името на файла може да съдържа цифрено-буквени знаци, тирета, долни черти и точки.
KeepFastq	Не	За да запишете изходните FASTQ файлове, въведете <code>true</code> (вярно). За да премахнете изходните FASTQ файлове, въведете <code>false</code> (грешно).
MapAlignOutFormat	Не	Форматирането на изходния файл. Позволените стойности са <code>bam</code> или <code>cram</code> . Ако не е определена стойност, тази по подразбиране липсва.

Следните са наличните полета и описания на [DrogenSingleCellRNA_Data] (Данни за едноклетъчна РНК в Drogen).

Поле	Изисква се	Описание
Sample_ID (Идентификатор на проба)	Да	Идентификаторът на пробата. Идентификаторът на пробата може да съдържа до 20 буквено-цифрени знака. Идентификаторът е различаващ главни от малки букви. Разделете всеки идентификатор с тире. Например идентификаторите Sample1-DQB1-022515.Sample трябва да съвпадат с идентификаторите, определени в раздела Данни за конвертиране в BCL.

Секвениране чрез цикъл на Dark

Този раздел описва как да използвате секвенирането чрез цикъла на Dark в рецептата.

Секвенирането чрез цикъл на Dark се използва за завършване само на химическите стъпки на цикъла на секвениране. Проверете страницата за съвместими продукти за вашия комплект за приготвяне на библиотека в [сайта за поддръжка на Illumina](#), за да видите дали се изисква секвениране чрез цикъл на Dark.

Използвайте следните стъпки за секвенирането чрез цикъла на Dark.

Редактиране на файл с рецепта

1. Изтеглете XML файла с рецепта от [сайта за поддръжка на Illumina](#).
2. Редактирайте XML файла с рецепта.
 - a. Определете подходящия раздел на протокол на основата на вашата конфигурация за разчитане и индексно секвениране. Има шест различни възможни протоколи на персонализирана рецепта, които могат да бъдат редактирани.
Например протоколът за единично Read 1 (Разчитане 1) без конфигурация на индексното секвениране ще бъде `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
 - b. Преди `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` и `<ReadRef ReadName="Read 2"/>` въведете следната стъпка за цикъл на Dark на нов ред.
`<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />`.
 - c. Въведете стъпката за цикъла на Dark на нов ред за всеки изискван цикъл на Dark.
3. Запишете XML файла с рецепта.

Следното е примерна рецепта за цикъл на Dark:

```
<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="BIX Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Transfer" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <Obdd ChemistryName="Library Denaturation and Dilution" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <Obcg ChemistryName="Cluster Generation" />
  <ChemistryRef ChemistryName="SBS Prime" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Read Prep" />
  <DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />
  <ReadRef ReadName="Read 1" />
```

```
<SetThermalZoneTemp Enable="false" Zone="FlowCellHeater" />
</Protocol>
<Protocol Name="1 Read 1 Index" ProtocolType="1Read1Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="2min 60C Vacuum Hold" />
  ...
```

Прилагане на рецептата към изпълняването

1. В Run Setup (Конфигуриране на изпълняване) в контролния софтуер изберете **Choose** (Избиране) под Custom Recipe (Персонализирана рецепта).
2. Навигирайте до актуализирания XML файл с рецепта.
3. Изберете **Open** (Отваряне).
4. Върнете се към [Инициране на изпълняване на секвениране на страница 50](#) (Инициране на изпълняване на секвениране).

Индекс

%

%PF 65

В

BCL файлове 6

bcl2fastq2 60

С

СBCL файлове, грешки
вероятност 66

CE 60

Compute Engine 60

Е

Ethernet кабел 4

Ethernet порт 4

F

FASTQ конвертиране 60

I

InterOp файлове 60, 67

IP адрес 6

L

Local Run Manager 5

P

PhiX 30

подравняване 60

PhiX Control v3 29

Process Management (Управление на
процесите) 82

R

RunInfo.xml 67

S

Sequencing Analysis Viewer 60, 63

U

UNC пътища 54

Universal Copy Service 5, 83

USB портове 4

W

Windows

вход 91

A

автоматични актуализации 83

алгоритъм на Phred 66

алкохолни кърпички 30

амплификация 9

анализ

методи 5, 9

анализ на изображения 5

анализ, базиран в облака 1

аудио настройки 22

Б

без обозначавания 63-64

бели листа 66

библиотеки

денатуриране 9

брой изпълнявания 6

брой цикли 33

бутон за захранване 3, 91

буфер за ресуспензия 29

В

вентилатори 86
вратички
 затваряне 56
връзка с интернет 14
връщане до по-стара версия на
 софтуера 92-93
въздушни филтри
 допълнителни 30
 местоположение 86

Г

гаранция 30
генериране на шаблон 63
грешки 6, 91
 вероятност 66
 съобщения 88

Д

данни за производителността 14
данни за производителността на
 инструмента 14
двуканално секвениране 64
денатуриране 9
диск D 82
дисково пространство 6, 82
документация 117
домейни 14
допълнителни цикли 33
дължини на разчитане 33

Е

единично разчитане 54

З

заместител на RSB 29
захранващ кабел 4
звукови настройки 22

зелен канал 64

И

известия 83
изключване 91
изключване и рестартиране 88
изображения 60
изобразяване 60-61
изпълнявания
 измервания 60
изтриване на изпълнявания 6, 82
икони 6
име на компютъра 6
индекс
 цикли 33
инициализиране 91
 неуспешно 91
инсталатор на системен пакет 83
инсталиране на софтуер 83
интензитети на клъстери 63

К

камери 61
картографиран дялове 54
касета
 ориентация на зареждане 56
каталожни номера 29
качество на данни 65
клавиатури 4
клъстери за филтриране 65
комплекти 29
 каталожни номера 30
консумативи
 проследяване 1
 сканиране 56
конфигурация за изпълняване
 примери 33
конфигуриране при първоначална
 употреба 86, 92-93
корпоративен абонамент 14
кърпички с белина 30

Л

лента за светлини 3
лента за състояние 3
линии 61
локален анализ 1

М

местоположение на сървър 14
местоположение на хостинг 14
местоположения на клъстери 60, 67
Миниатюри 67
мишка 4
монитор 3

Н

наименуване
име на инструмент 22
име на инструмента 22
име на компютъра 6
нанокладенчета 63
неуспехи на регистрацията 63
номериране на плочка 62
номериране на повърхност 62
нуклеотиди 64

О

обозначаване с бази 5
операционна система 91
отделение за консумативи 3
откоси 61-62

П

папка за изходни файлове 54, 82
папка за изходни файлове по
подразбиране 54
папка на изпълняване 82
параметри на изпълняване
редактиране 54

плочки 60
поддръжка за клиенти 117
подложки 30
поднос за капки
подложки 30
подравняване спрямо спецификация 91
помощ, техническа 117
превключвател 4, 91
предупреждения 6, 91
прекъснати връзки 91
преместване 4
Проактивна поддръжка на Illumina 14
проверки на системата 88
променливотоково захранване
контакт 4
проследяване на консумативи 1
псевдоним 22

Р

размер на изпълняване 82
разреждане на библиотеки 9
Реагенти за NextSeq 1000/2000 29
редактиране на параметри на
изпълняване 54
резерви 86
резултати за качество 66
рестартиране 92-93
рецепти 83
ръчни софтуерни актуализации 83

С

сдвоени краища 54
секвенциален концентратор BaseSpace 1
документация 14
настройки 14
сериен номер 6
софтуер
върщане до по-стара версия 92-93
известия за актуализации 23
инсталиране 83
софтуерен пакет 1, 5

спецификации на фризера 30
спецификации на хладилника 30
срокове на годност 86
стойности на екстракция 63
страници за поддръжка 83
състояние на изпълняване 6

T

таблици за качество 66
твърд диск 6, 82
тестов комплект 30
техническа помощ 117

Ф

фабрични настройки по подразбиране 92-
93
Фазиране и префазиране 63
файлове за обозначаване на бази 9, 60, 67
файлове за филтри 60
файлове за хронологии 61
филтър за задържане 65
филтър за преминаване (PF) 65
фрагменти от рецепта 6

X

хронологии за грешки 61

Ц

цикли на разчитане 33

Ч

частен домейн 14
червен канал 64

Техническа помощ

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

Уеб сайт: www.illumina.com

Имейл: techsupport@illumina.com

Телефонни номера на отдела за техническа поддръжка на Illumina

Регион	Безплатен	Международен
Австралия	+61 1800 775 688	
Австрия	+43 800006249	+43 1 9286540
Белгия	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
Виетнам	+84 1206 5263	
Германия	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Дания	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
Индия	+91 8006500375	
Индонезия		0078036510048
Ирландия	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Испания	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Италия	+39 800 985513	+39 236003759
Канада	+1 800 809 4566	
Китай		+86 400 066 5835
Малайзия	+60 1800 80 6789	
Нидерландия	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Нова Зеландия	+64 800 451 650	
Норвегия	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Обединеното кралство	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
Сингапур	1 800 5792 745	
Съединени американски щати	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Тайван, Китай	+886 8 06651752	
Тайланд	+66 1800 011 304	

Регион	Безплатен	Международен
Филипините	+63 180016510798	
Финландия	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
Франция	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Хонконг, Китай	+852 800 960 230	
Швейцария	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Швеция	+46 2 00883979	+46 8 50619671
Южна Корея	+82 80 234 5300	
Япония	+81 0800 111 5011	

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

Документация на продукта – налична за изтегляне от 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

Само за изследователска употреба. Не е предназначено за употреба в диагностични процедури.

© 2021 г. Illumina, Inc. Всички права запазени.

illumina®