

illumina®

NextSeq 1000 和 2000

测序系统指南

ILLUMINA 所有
文档号 1000000109376 v04 CHS
2021 年 4 月

仅供科研使用，不可用于诊断过程。

本文件及其内容归 Illumina, Inc. 及其附属公司（以下简称“Illumina”）所有，并且仅供其客户用于与本文件内所述产品用途相关的合同用途，不得用于其他任何目的。若事先未获得 Illumina 的书面许可，不得出于任何其他目的使用或分发本文件及其内容，以及/或者以其他方式对其进行传播、披露或复制。Illumina 不通过本文件向第三方授权其任何专利、商标、所有权或普通法权利或类似权利。

必须由具备资质且受过相关培训的人员严格明确遵照本文件中的说明操作，以确保本文件中所述产品的使用适当且安全。在使用此类产品之前，相关人员必须通读并理解本文件中的所有内容。

未能完整阅读并明确遵守本文件中包含的所有说明可能会导致产品损坏、对用户或其他人员造成人身伤害以及对其他财产造成损害，并且将导致产品适用的保证失效。

对于由不当使用本文件中描述的产品（包括其部件或软件）引起的任何后果，ILLUMINA 概不承担任何责任。

© 2021 Illumina, Inc. 保留所有权利。

所有商标均为 Illumina, Inc. 或其各自所有者的财产。有关特定的商标信息，请参见 www.illumina.com/company/legal.html。

修订历史记录

文档号	日期	更改描述
1000000109376 v04	2021 年 4 月	<p>增加了有关导入基线文件的说明。</p> <p>增加了 DRAGEN DNA Amplicon 工作流程。</p> <p>增加了 NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 的功能。</p> <p>增加了选择代理服务器的信息。</p> <p>更新了含 Tween 20 的 RSB 的装运和存储温度。</p> <p>更新了 DRAGEN RNA 工作流程，现包含差异基因表达。</p> <p>更新了测序输出文件夹结构。</p> <p>更新了样品表 v2 格式建议。</p>
1000000109376 v03	2020 年 11 月	<p>更正了商品目录号。</p> <p>增加了有关添加新用户的信息。</p>
1000000109376 v02	2020 年 10 月	<p>增加了 NextSeq 1000/2000 P3 Reagents 试剂盒。</p> <p>增加了 DRAGEN Single Cell RNA 工作流程。</p> <p>增加了 DRAGEN Enrichment 工作流程。</p> <p>增加了 FASTQ 压缩选项。</p> <p>增加了有关安装 DRAGEN 管道和许可证更新的说明。</p> <p>增加了有关导入自定义参考基因组的说明。</p> <p>更新了文库类型的装入剂量和浓度。</p> <p>更新了文库稀释说明。</p> <p>增加了自动清除试剂夹盒的说明。</p> <p>更新了有关支持的循环次数的信息。</p> <p>更新了仪器自定义选项。</p> <p>更新了仪器运行设置说明。</p> <p>更新了 DRAGEN 测序输出结构。</p> <p>增加了有关 DRAGEN 质量控制报告的信息。</p> <p>增加了有关从硬盘驱动器删除自定义参考基因组的信息。</p> <p>增加了有关执行系统检查的信息。</p> <p>更新了 v2 格式样品表设置。</p>

文档号	日期	更改描述
1000000109376 v01	2020 年 6 月	<p>更新了 NextSeq 1000/2000 Control Software 的软件描述。</p> <p>指南通篇说明了云、混合、本地和独立模式的区别。</p> <p>更新了夹盒存储和解冻说明。</p> <p>更新了有关支持的循环次数的信息。</p> <p>更新了有关设置二级分析的说明。</p> <p>更新了试剂盒商品目录号。</p> <p>更新了测序操作流程图。</p> <p>更新了有关将网络驱动器指定为默认输出文件夹的说明。</p> <p>更新了支持的文库类型表。</p> <p>增加了有关导入自定义参考基因组的说明。</p> <p>增加了有关设置使用自定义标签试剂盒和自定义文库制备试剂盒的运行的说明。</p> <p>更新了用户帐户和密码要求。</p> <p>增加了有关 DRAGEN 输出文件夹结构的详细信息。</p> <p>阐明了有关从夹盒中排放废试剂的说明。</p> <p>增加了有关 Q-table 的背景信息。</p> <p>更新了有关安装控制软件更新的说明。</p> <p>增加了如何对运行重新排队的说明。</p> <p>增加了有关更新 DRAGEN 管道和许可证的说明。</p> <p>增加了仪器自定义说明。</p> <p>更新了多幅插图以反映新标签。</p> <p>指南通篇将仓门更改为挡板。</p> <p>增加了两个以太网端口的描述。</p>
1000000109376 v00	2020 年 3 月	初始版本。

目录

系统概述	1
更多资源	2
仪器硬件	3
集成软件	5
流程管理	6
测序操作流程图	7
测序的原理	7
系统配置	9
用户帐户要求	9
配置 BaseSpace Sequence Hub 和 Proactive 支持	11
指定默认输出文件夹位置	12
导入自定义参考基因组	15
导入噪声基线文件	15
配置运行模式	16
仪器自定义	17
耗材和设备	20
测序耗材	20
辅助耗材	24
辅助设备	25
操作流程	26
测序注意事项	26
在 BaseSpace Sequence Hub 中计划测序运行	27
解冻未拆封的夹盒和流动槽	34
稀释文库	36
将耗材装入夹盒	37
启动测序运行	39
测序输出	46
Real-Time Analysis 概述	46
Real-Time Analysis 工作流程	48
测序输出文件	51
DRAGEN 二级分析输出文件	52
DRAGEN 二级分析输出文件夹结构	60
维护	63
清理硬盘驱动器空间	63
软件更新	63
DRAGEN 工作流程和许可证更新	65

更换空气过滤器	66
故障诊断	68
解决错误消息	68
重新存放耗材	68
取消运行	69
对运行重新排队	69
对仪器进行电源重启	70
执行系统检查	71
还原为出厂设置	71
捕获安装的映像	71
还原捕获的映像	72
资源和参考资料	73
V2 格式样品表设置	73
暗循环测序	83
索引	85
技术协助	89

系统概述

Illumina® NextSeq™ 1000 测序系统和 Illumina® NextSeq™ 2000 测序系统提供了 NGS¹ 的靶向方法。此系统以应用程序为中心，将 Illumina 测序技术融入到极具成本效益且提供下列功能的台式仪器中：

- **可访问性和可靠性** — NextSeq 1000/2000 提供本地 DRAGEN 分析及仪器上变性和稀释功能。系统内置了成像模块，耗材内置了射流组件，这些配置简化了仪器维护。
- **一步装入耗材** — 一次性夹盒预先注入了运行所需的所有试剂。文库和流动槽直接装入到夹盒中，之后夹盒再装入到仪器上。集成式识别技术实现精确跟踪。
- **NextSeq 1000/2000 软件** — 这是一套集成软件，负责控制仪器操作、处理图像以及生成碱基检出。
 - **云模式** — 使用 BaseSpace Sequence Hub 上的 “Instrument Run Setup (仪器运行设置)” 计划运行。选定的分析工作流程会在云中自动启动。还会在云中提供运行数据和分析结果。
 - **混合模式** — 使用 BaseSpace Sequence Hub 上的 “Instrument Run Setup (仪器运行设置)” 计划运行。选定的分析工作流程随后会通过仪器上的 DRAGEN 启动。
 - **本地模式** — 在本地使用 v2 文件格式样品表计划运行。选定的分析工作流程会通过仪器上的 DRAGEN 自动启动。
 - **独立模式** — 在不使用样品表的情况下计划运行。

本章提供了系统概述，包括有关硬件、软件和数据分析的信息。此外，还汇集了关键概念和贯穿全文的术语。要详细了解规格、数据表、应用程序以及相关产品，请参见 Illumina 网站上的 [NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统产品页面](#)。

¹新一代测序

更多资源

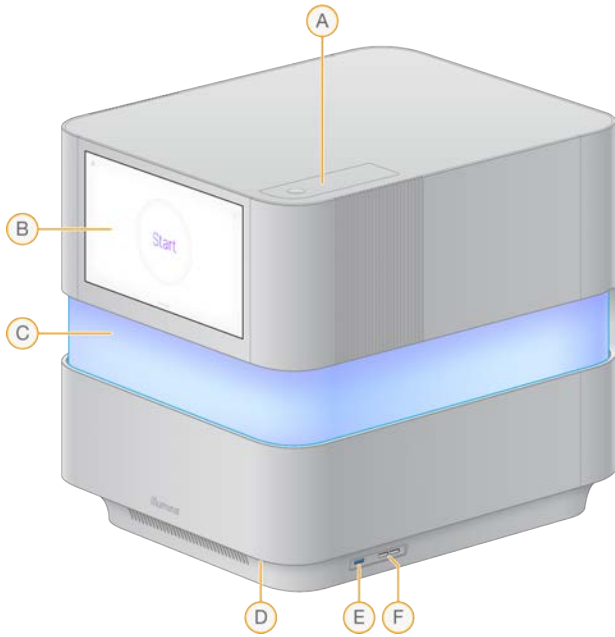
Illumina 网站上的 [NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统支持页面](#) 提供了更多系统资源。这些资源包括软件、培训、兼容产品及以下文档。请务必查看支持页面获取最新版本。

资源	描述
自定义操作流程选择器	这套工具用来生成针对您的文库制备方法、运行参数和分析方法定制的端到端说明，同时提供可优化详细信息级别的选项。
《NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统安全和合规性指南》（文档号 1000000111928）	提供有关操作安全注意事项、合规性声明和仪器标签的信息。
《RFID 读写器模块合规性指南》（文档号 1000000002699）	提供有关仪器中的 RFID 读写器、合规认证和安全注意事项的信息。
《NextSeq 1000 和 2000 变性和稀释文库指南》（文档号 1000000139235）	提供有关手动为测序运行稀释及变性已制备的文库以及制备可选 PhiX 对照品的说明。
《NextSeq 1000 和 2000 自定义引物指南》（文档号 1000000139569）	提供有关使用自定义测序引物代替 Illumina 测序引物的信息。
《NextSeq 2000 测序系统场地准备指南》（文档号 1000000109378）	提供实验室空间规范、电气要求、环境和网络注意事项。
BaseSpace 帮助 (help.basespace.illumina.com)	提供有关使用 BaseSpace™ Sequence Hub 及可用分析选项的信息。
《标签接头混合指南》（文档号 1000000041074）	提供混合准则和双标签策略。
《Illumina 接头序列》（文档号 1000000002694）	提供适用于 Illumina 文库制备试剂盒的接头序列列表。

仪器硬件

NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统由电源按钮、显示器、状态栏、耗材仓和 USB 端口组成。

图 1 外部系统组件



- A. 空气过滤器仓 — 用于放置可更换空气过滤器。
- B. 触摸屏显示器 — 让用户可以使用控制软件界面进行仪器内配置和设置。
- C. 状态栏 — 随着系统执行工作流程的不同阶段，灯光颜色会发生变化。蓝色和紫色表示正在进行交互（例如运行前检查），彩色表示值得注意的时刻和数据（例如测序完成）。关键错误以红灯表示。
- D. 电源按钮 — 控制仪器电源，并指出系统是打开（发光）、关闭（无光）还是关闭但接通交流电源（闪烁）。
- E. 3.0 USB 端口 — 用于连接外部便携式驱动器以进行数据传输。
- F. 2.0 USB 端口 — 用于连接鼠标和键盘。

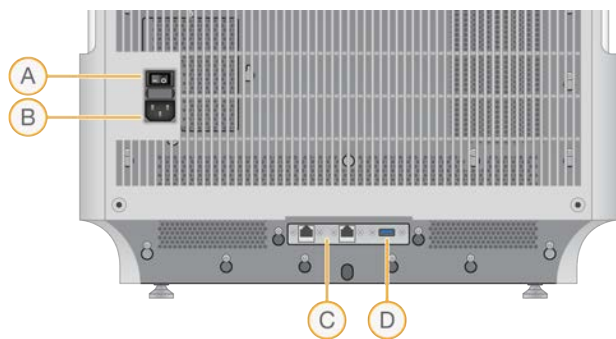
电源和辅助接口

您可轻轻移动仪器，以便接触仪器背面的电源开关、USB 端口和其他辅助接口。

仪器背面有用于控制仪器电源的开关和输入口，以及两个用于选择性连接以太网的以太网端口。3.0 USB 端口用于连接外部便携式驱动器以进行数据传输（这个基于 Linux 的平台上不支持 exFAT）。

NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统附带两个以太网端口，可扩展系统功能和灵活性。例如，一个以太网端口可专用于与内部网络驱动器进行通信，另一个端口专用于进行外部通信（例如 BaseSpace Sequence Hub 或 Proactive 支持）。

图 2 后面板组件

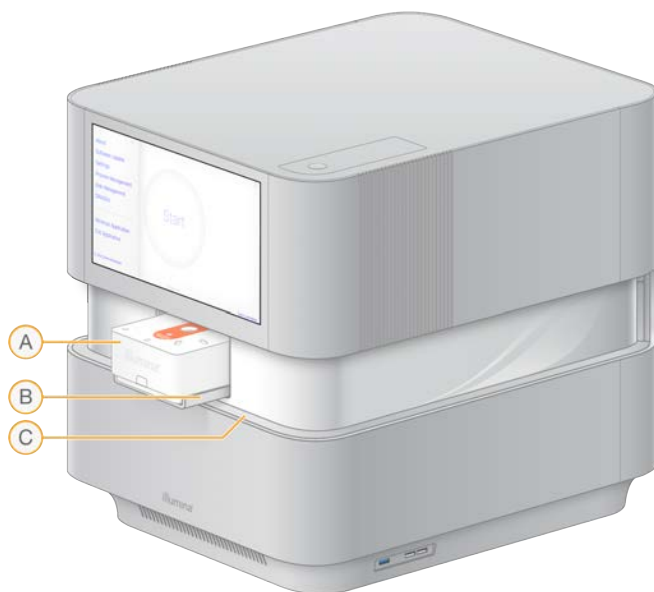


- A. 切换开关 — 打开和关闭仪器电源。
- B. 电源输入口 — 电源线连接。
- C. 以太网端口 (2) — 可选以太网电缆连接。
- D. 3.0 USB 端口 — 用于连接外部硬盘驱动器以进行数据传输。

耗材仓

耗材仓容纳用于测序运行的夹盒，夹盒内有流动槽和稀释好的文库。

图 3 已装入耗材仓



- A. 夹盒 — 容纳流动槽、文库和试剂，并在运行期间收集废试剂。
- B. 托盘 — 在测序期间用于承托夹盒。
- C. 挡板 — 打开挡板可以查看及操作耗材仓。

集成软件

系统软件套装包括用于执行测序运行和分析的集成应用程序。

- **NextSeq 1000/2000 Control Software** — 控制仪器操作，并提供界面用于配置系统、设置测序运行以及在测序过程中监控运行统计信息。
- **Real-Time Analysis (RTA3)** — 在运行期间执行图像分析和碱基检出。有关详细信息，请参见[测序输出（第 46 页）](#)。
- **Universal Copy Service** — 将测序输出文件从运行文件夹复制到 BaseSpace Sequence Hub（如适用）和输出文件夹，您可以在这些位置访问输出文件。

控制软件具有交互性，并会运行自动化后台进程。Real-Time Analysis 和 Universal Copy Service 仅运行后台进程。

系统信息

选择左上角的控制软件菜单，打开“About（关于）”部分。“About（关于）”部分提供 Illumina 联系信息及以下系统信息：

- 仪器序列号
- 计算机名称
- 系统套件版本
- 映像 OS 版本
- 运行总数

通知和警报

通知图标位于右上角。出现警告或错误时，右面板会滑出以显示通知。您可以随时选择该图标，以查看警告和错误的当前或历史通知列表。

- 警告需要引起注意，但不会停止运行，也不需要确认以外的操作。
- 如果有错误，需要执行操作后才能开始或继续运行。

最小化控制软件

将控制软件最小化可访问其他应用程序。例如，可浏览到文件资源管理器中的输出文件夹或查找样品表。

1. 从控制软件菜单中选择 **Minimize Application（最小化应用程序）**。
控制软件即会最小化。
2. 要最大化控制软件，请从工具栏中选择 **NextSeq 1000/2000 Control Software**。

流程管理

“Process Management (流程管理)” 屏幕显示存储在 `/usr/local/illumina/runs` 的临时运行。每个运行通过运行日期、名称和 ID 予以识别。还会显示每个运行的相关信息，例如运行状态、二级分析、输出文件夹和云。选择运行可查看其他信息，包括工作流程、Q30 平均百分比、通过过滤的片段总数和总产量。要删除运行并清理空间，请参见[清理硬盘驱动器空间 \(第 63 页\)](#)。要对仪器内分析重新排队，请参见[对运行重新排队 \(第 69 页\)](#)。

运行状态

下面显示了测序运行的状态：

- **In Progress (进行中)** — 测序运行正在进行。
- **Complete (完成)** — 测序运行已完成。
- **Stopped (已停止)** — 测序运行已停止。
- **Errored (出错)** — 测序运行出现了错误。

二级分析状态

下面显示了仪器内 DRAGEN 二级分析的状态。如果是在 BaseSpace Sequence Hub 中进行分析，状态将显示为“N/A (不适用)”。

- **Not Started (未开始)** — DRAGEN 分析尚未开始。
- **In Progress (进行中)** — DRAGEN 分析正在进行。
- **Stopped (已停止)** — DRAGEN 分析已停止。
- **Errored (出错)** — DRAGEN 分析出现了错误。
- **Complete (完成)** — DRAGEN 分析已完成。

输出文件夹的状态

下面显示了文件复制到输出文件夹的状态：

- **In Progress (进行中)** — 正在将文件复制到输出文件夹。
- **Complete (完成)** — 文件已成功复制到输出文件夹。

云 (BaseSpace Sequence Hub) 的状态

下面显示了通过云上载到 BaseSpace Sequence Hub 的文件的状态：

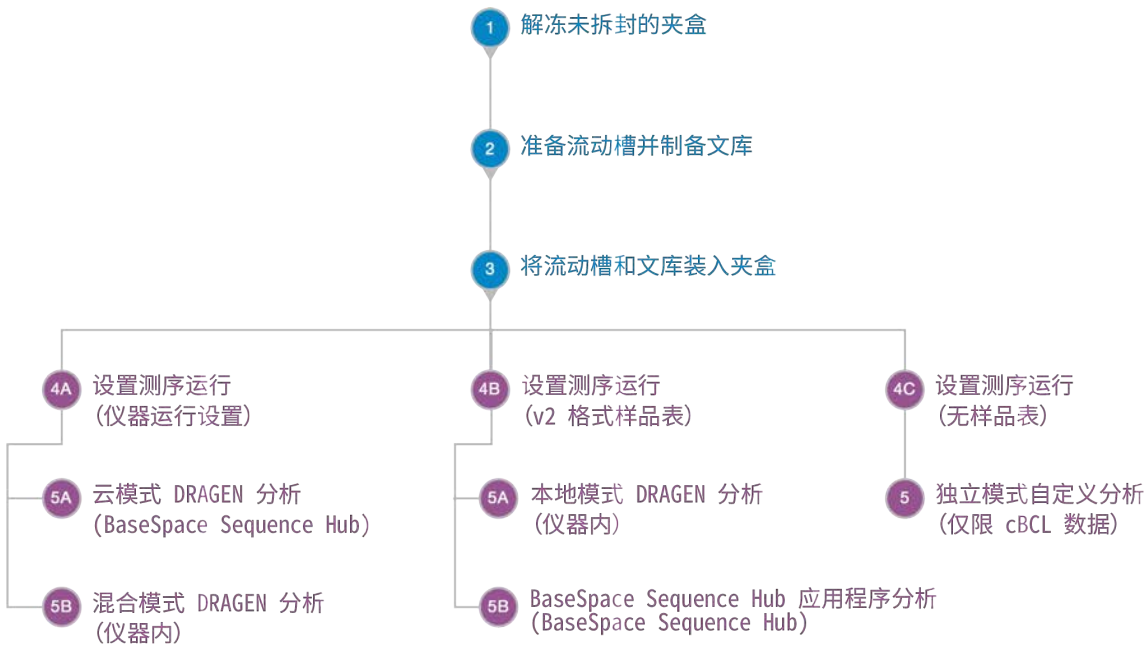
- **In Progress (进行中)** — 控制软件正在将文件上载到 BaseSpace Sequence Hub。
- **Complete (完成)** — 文件已成功上载到 BaseSpace Sequence Hub。

对状态问题进行故障诊断

- 如果运行正在进行，请关闭“Process Management（流程管理）”屏幕，等待五分钟左右，然后重新打开。
- 如果运行未在进行，请对仪器进行电源重启，然后重新打开“ProcessManagement（流程管理）”屏幕。请参见[对仪器进行电源重启（第 70 页）](#)。

测序操作流程图

下图展示了使用 NextSeq 1000/2000 进行测序的操作流程。



测序的原理

NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统上的测序过程分为簇生成、测序和分析三个步骤。每个步骤在测序运行期间都是自动进行的。根据系统配置，会在运行完成后在仪器外执行进一步分析。

簇生成

文库¹会自动变性为单链，并在预装到仪器上时进一步稀释。在簇生成期间，单个 DNA 分子会结合到流动槽的表面，并进行扩增以形成簇²。簇生成大约需用时 4 小时。

¹已连接接头以供测序的 DNA 或 RNA 样品。制备方法有很多种。

²流动槽上生成一个测序片段的一组克隆 DNA 链。流动槽上的每条 DNA 链都会形成一个模板，该模板会扩增，直到簇包含成百上千个拷贝。例如，含有 10,000 个簇的流动槽会生成 10,000 个单端或者 20,000 个双末端片段。

测序

系统通过双通道化学反应（一个绿色通道和一个蓝色通道）来对簇成像，以便对四种核苷酸的数据编码。对流动槽上的一个小区成像后，随即会对下一个小区进行成像。每个测序循环都会重复此过程（每个循环大约需用时 5 分钟）。图像分析之后，Real-Time Analysis 软件会执行碱基检出¹、过滤和质量评分。²

初级分析

随着运行的进行，控制软件会自动将碱基检出文件³ (*.cbcl) 传输到指定的输出文件夹以进行数据分析。测序运行期间，实时分析 (RTA3) 软件会执行图像分析、碱基检出和文库拆分⁴。测序完成时，便会开始二级分析。二级数据分析方法视应用程序和系统配置而定。

二级分析

BaseSpace Sequence Hub 是 Illumina 用于运行监控、数据分析、存储和协作的云计算环境。它负责托管 DRAGEN 和 BaseSpace Sequence Hub 应用程序，这些应用程序支持常见的测序分析方法。

初始测序分析完成后，DRAGEN 会使用其中一个可用的分析管道执行二级分析。

如果使用云或混合模式，DRAGEN 会从 BaseSpace Sequence Hub 的“Instrument Run Setup（仪器运行设置）”中检索样品表、参考基因组和运行输入文件。对于云模式，系统会自动将 cBCL 数据上传到 BaseSpace Sequence Hub，然后 BaseSpace Sequence Hub 会启动 DRAGEN 二级分析。对于混合模式，DRAGEN 二级分析在仪器内执行，输出文件可存储到选定的文件夹或云中。

如果使用本地模式，DRAGEN 会从 NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统中检索提供的样品表、参考基因组和运行输入文件。DRAGEN 二级分析在仪器内执行，输出文件将存储到选定的输出文件夹中。如果选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage（Proactive、运行监控和存储）”，也可以在测序完成后通过 BaseSpace Sequence Hub 应用程序来启动分析。

如果使用的是独立模式，请设置不使用样品表的运行。建议对从 cBCL 数据开始的自定义分析工作流程使用此工作流程。

- 有关 BaseSpace Sequence Hub 的详细信息，请参见 [BaseSpace Sequence Hub 在线帮助](#)。
- 有关 DRAGEN 的详细信息，请参见 [DRAGEN Bio-IT Platform 支持页面](#)。
- 如需所有应用程序的概述，请参见 [BaseSpace 应用程序](#)。

¹确定特定循环中小区内每个簇的碱基（A、C、G 或 T）。

²计算每个碱基检出的一组质量预测因素，然后使用预测因素值来查阅 Q-score。

³内含每次测序循环的每个簇的碱基检出及相关质量分值。

⁴区分库中每个文库的片段的分析过程。

系统配置

本章提供了系统设置说明，包括软件设置描述。

这些说明主要介绍了控制软件，还提供了一些有关配置网络和操作系统的信息。

i | 如果在仪器上使用 Google Chrome，系统会提示您解锁登录密钥环。您可以放心忽略并取消该提示。

用户帐户要求

Linux 操作系统有三个帐户：

- root (超级管理员)
- ilmnadmin (管理员)
- ilmnuser (用户)

管理员帐户仅用于应用系统更新（如更新 NextSeq 1000/2000 Control Software）或供 IT 人员用来装载永久网络驱动器。

用户帐户用于执行所有其他功能，包括测序。

密码要求

完成仪器安装后，现场服务工程师会为这三个帐户启动密码更改。每 180 天（当系统提示时）要更新一次各个密码。

表 1 默认密码策略

策略	设置
强制密码历史记录	记住 5 个密码
锁定阈值	10 次无效登录
最短密码长度	10 个字符
最少字符类型	至少包含以下类型中的三种：数字、大写字母、小写字母、符号
重复字符数上限	3 个字符
密码必须符合复杂性要求	已禁用
用可还原的加密来储存密码	已禁用

添加新用户

1. 登录到 ilmnadmin 帐户。
2. 选择电源按钮，然后打开 ilmnadmin 下拉列表。
3. 选择 **Account Settings** (帐户设置)。
4. 选择 **Unlock** (解锁)，然后输入 ilmnadmin 密码。
5. 选择 **Add User** (添加用户)。
6. 选择标准帐户类型，然后输入新用户名。
7. 选择 **Set password now** (立即设置密码)，然后输入密码。
8. 选择 **Add** (添加)。
新用户随即会添加到用户列表中。
9. 按以下方式向该用户授予 NextSeq 1000/2000 Control Software 的访问权限。
 - a. 打开终端。
 - b. 输入以下命令：

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <新用户名>
```
 - c. 出现提示时，输入 ilmnadmin 密码。
10. 要确认用户权限设置成功，请执行以下操作。
 - a. 登录到新用户帐户。
 - b. 导航到 NextSeq 1000/2000 Control Software。
 - c. 从控制软件菜单中选择 **Settings** (设置)。
 - d. 在默认输出文件夹下，确保您可以选择并保存输出文件夹路径。
如果您可以选择并保存输出文件夹路径而不出现任何错误，即表明权限设置成功。

重置密码

本部分详细介绍如何重置 ilmnuser、ilmnadmin 或 root 密码。系统不提供密码找回功能。如果密码输错次数过多，重置密码时将无法绕过帐户锁定。您必须等待 10 分钟才能重置密码或尝试登录。

重置 ilmnuser 密码

如果您知道 ilmnadmin 或 root 密码，那么您可以重置 ilmnuser 密码。

1. 登录到 ilmnadmin 帐户。
2. 打开终端。
3. 输入 `sudo passwd ilmnuser`。
4. 出现提示时，输入 ilmnadmin 密码。
5. 出现提示时，输入新的 ilmnuser 密码。
6. 出现提示时，重新键入新的 ilmnuser 密码，以确认该新密码。

重置 ilmnadmin 密码

如果您知道 root 密码，那么您可以重置 ilmnadmin 密码。

1. 登录到 root 帐户。
2. 打开终端。
3. 输入 `passwd ilmnadmin` 以更改 ilmnadmin 密码，或输入 `passwd ilmnuser` 以更改 ilmnuser 密码。
4. 出现提示时，输入新密码。
5. 出现提示时，重新键入新密码，以确认该新密码。

重置 Root 密码

要重置 root 密码，请使用以下其中一个选项：

- 如果您从捕获最后一个 OS 映像开始知道密码，请还原为所保存的映像。
- 如果您不记得密码，请联系 Illumina 技术支持部门。

配置 BaseSpace Sequence Hub 和 Proactive 支持

按照下面的说明在您的系统上配置 BaseSpace Sequence Hub 和 Proactive 支持。要设置 BaseSpace Sequence Hub 帐户，请参见 [BaseSpace Sequence Hub 在线帮助](#)。

1. 从控制软件菜单中选择 **Settings**（设置）。
2. 对于 BaseSpace Sequence Hub 和 Proactive 支持设置，选择以下其中一个选项：

选项	描述和要求
Proactive Support Only（仅 Proactive 支持）*	将仪器性能数据发送给 Illumina 以加快故障诊断速度。需要互联网连接。
Proactive and Run Monitoring（Proactive 和运行监控）	将 InterOp 和日志文件发送到 BaseSpace Sequence Hub，以便远程运行监控。此选项是默认选项。需要 BaseSpace Sequence Hub 帐户和互联网连接。
Proactive, Run Monitoring and Storage（Proactive、运行监控和存储）	将 InterOp 文件、日志文件和运行数据发送到 BaseSpace Sequence Hub，以便进行远程监控和分析。需要 BaseSpace Sequence Hub 帐户、互联网连接和样品表。
None（无）	断开运行与 BaseSpace Sequence Hub 帐户的关联，并且不发送 Illumina Proactive 支持所需的仪器性能数据。

* 控制软件版本不同，软件界面上此设置的名称可能也会与本指南中的名称有所不同。

选择“None（无）”以外的任何选项时，都会启用 Proactive 支持。借助这项免费服务，您可以在 MyIllumina 客户仪表板上查看自己的性能数据，而 Illumina 的服务团队则可以更快地对问题进行故障诊断。

i | 默认会启用“Proactive and Run Monitoring (Proactive 和运行监控)”。要想取消此服务,请选择 **None (无)**。

3. 如果您在步骤 2 中选择了“None (无)”,请选择 **Save (保存)** 以完成操作。否则,请继续操作直到步骤 6。
4. 从“Hosting Location (服务器位置)”列表中,选择要将数据上传到的 BaseSpace Sequence Hub 服务器的位置。
请务必使用您所在地区内或离您所在地区最近的服务器位置。
5. 如果您具有企业订阅,请输入您的 BaseSpace Sequence Hub 帐户所用的域名 (URL)。
例如: <https://您的实验室.basespace.illumina.com>。
6. 选择 **Save (保存)**。

指定默认输出文件夹位置

按照本部分中的说明选择默认输出文件夹位置。运行设置期间,您可更改每个运行的输出文件夹。软件会将 cBCL 文件¹及其他运行数据保存到输出文件夹。

除非 BaseSpace Sequence Hub 配置为用于 Proactive、运行监控和存储,否则必须提供输出文件夹。只能将外部或网络驱动器用作默认输出文件夹。使用仪器上的输出文件夹会对测序运行造成负面影响。

指定外部驱动器输出文件夹

按照下面的说明选择外部便携式驱动器作为默认输出文件夹。建议使用格式化为 NTFS 或 GPT/EXTA 的自供电驱动器。

1. 将外部便携式驱动器插入仪器侧面或背面的 3.0 USB 端口。
确保外部便携式驱动器允许写入权限。如果权限设为只读,控制软件将无法在其中保存数据。
2. 在外部便携式驱动器上创建一个新文件夹。此文件夹将成为默认输出文件夹位置。
NextSeq 1000/2000 Control Software 要求至少存在两级嵌套文件夹,才能将该位置识别为外部便携式驱动器。
3. 从控制软件菜单中选择 **Settings (设置)**。
4. 在“Default Output Folder (默认输出文件夹)”下,选择现有的文件夹路径,然后导航到外部便携式驱动器上的新文件夹。
5. [可选] 如果您在“Run Mode (运行模式)”下选择了 **Online Run Setup (在线运行设置)**,请从“Hosting Location (服务器位置)”下拉菜单中选择一项。
6. 选择 **Save (保存)**。

¹内含每次测序循环的每个簇的碱基检出及相关质量分值。

指定网络驱动器默认输出文件夹

按照下面的说明装载永久网络驱动器并指定默认输出文件夹位置。要在 NextSeq 1000/2000 上装载永久网络驱动器，唯一支持的方法是使用服务器消息块 (SMB)/通用 Internet 文件系统 (CIFS) 和网络文件系统 (NFS)。

SMB/CIFS 装载说明

1. 如果 NextSeq 1000/2000 Control Software 已打开，请选择 **Minimize Application**（最小化应用程序）。
2. 登录到 ilmnadmin 帐户。
3. 选择 **Applications**（应用程序）。
4. 在“Favorites（收藏夹）”下，选择 **Terminal**（终端）。
5. 输入 `sudo touch /root/.smbcreds`，然后按 **Enter**。
6. 出现提示时，输入 ilmnadmin 密码。
每次使用 `sudo` 命令时都需要输入 ilmnadmin 密码。
7. 输入 `sudo gedit /root/.smbcreds`，然后按 **Enter** 打开名为 `smbcreds` 的文本文件。
8. `.smbcreds` 文本文件打开后，按以下格式输入您的网络登录凭据。

```
username=<用户名>
password=<密码>
domain=<域名>
```

 输入用户名、密码和域名凭据时，不需要输入括号。仅当远程帐户是域名的一部分时，才需要输入域名凭据。
9. 选择 **Save**（保存），然后退出文件。
10. 识别 SMB/CIFS 服务器的服务器名称和共享名称。
服务器名称和共享名称不能包含空格，例如：
服务器名称：192.168.500.100 或 Myserver-myinstitute-03
共享名称：/share1
11. 在终端输入 `sudo chmod 400 /root/.smbcreds`，然后按 **Enter** 授予对 `.smbcreds` 文本文件的读取访问权限。
12. 输入 `sudo mkdir /mnt/<本地名称>`。
<本地名称> 是网络驱动器中新目录的名称，可以包含空格。此目录为将显示在仪器上的目录。
13. 按 **Enter**。
14. 输入 `sudo gedit /etc/fstab`，然后按 **Enter**。
15. `fstab` 文件打开后，在文件末尾输入以下内容，然后按 **Enter**。

```
//<服务器名称>/<共享名称> /mnt/<本地名称> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```
16. 选择 **Save**（保存），然后退出文件。
17. 在终端输入 `sudo mount -a -vvv`，然后按 **Enter**。
网络驱动器现在已装载为 `/mnt/<本地名称>`。

18. 要确认装载是否成功，请输入 `<df | grep <本地名称>>` 然后按 **Enter**。
文件共享的名称应会显示。
19. 输入 `sudo mkdir /mnt/<本地名称>/<输出目录>` 以在本地目录中创建一个子文件夹。<输出目录> 代表您的默认输出文件夹位置。
NextSeq 1000/2000 Control Software 需要至少两级嵌套文件夹才能将该位置识别为所装载的网络驱动器。
20. 对仪器进行电源重启。请参见[对仪器进行电源重启 \(第 70 页\)](#)。
21. 将永久装载的网络驱动器设为默认输出文件夹。请参见[将永久网络驱动器指定为默认输出文件夹 \(第 14 页\)](#)。

NFS 装载说明

1. 如果 NextSeq 1000/2000 Control Software 已打开，请选择 **Minimize Application (最小化应用程序)**。
2. 登录到 ilmnadmin 帐户。
3. 识别 NFS 服务器的服务器名称。
服务器名称不能包含空格，例如：
服务器名称：192.168.500.100 或 Myserver-myinstitute-03
4. 选择 **Applications (应用程序)**。
5. 在“Favorites (收藏夹)”下，选择 **Terminal (终端)**。
6. 输入 `sudo mkdir /mnt/<本地名称>`，然后按 **Enter**。
<本地名称> 是网络驱动器中新目录的名称。
7. 输入 `sudo gedit /etc/fstab`，然后按 **Enter**。
8. fstab 文件打开后，输入以下内容，然后按 **Enter**。
服务器名称:/share //mnt/<local name> nfs x-systemd.automount,defaults 0 0
9. 选择 **Save (保存)**，然后退出文件。
10. 在终端输入 `sudo mount -a -vvv`，然后按 **Enter**。
网络驱动器现已装载到 <本地名称> 文件夹内的 /mnt/directory 中。
11. 在 <本地名称> 文件夹中创建一个新 <子文件夹>。这个子文件夹便代表您的默认输出文件夹位置。
NextSeq 1000/2000 Control Software 需要至少两级嵌套文件夹才能将该位置识别为所装载的网络驱动器。
12. 对仪器进行电源重启。请参见[对仪器进行电源重启 \(第 70 页\)](#)。
13. 将永久装载的网络驱动器设为默认输出文件夹。请参见[将永久网络驱动器指定为默认输出文件夹 \(第 14 页\)](#)。

将永久网络驱动器指定为默认输出文件夹

1. 登录到 ilmnuser 帐户。
2. 从 NextSeq 1000/2000 Control Software 菜单中选择 **Settings (设置)**。
3. 在“Default Output Folder (默认输出文件夹)”下，选择在 /mnt/<本地名称>/<输出目录> 中永久装载的网络驱动器。

4. [可选] 如果您在“Run Mode (运行模式)”下选择了 **Online Run Setup (在线运行设置)**，请从“Hosting Location (服务器位置)”下拉菜单中选择一项。
5. 选择 **Save (保存)**。

导入自定义参考基因组

只能使用管理员帐户来导入新的自定义参考基因组。有关所有兼容参考基因组的列表，请访问 NextSeq 1000/2000 产品兼容性页面。

1. 使用适用于 Illumina Instruments BaseSpace Sequence Hub 应用程序的参考构建器创建一个参考基因组。有关详细信息，请参见 [适用于 Illumina Instruments v1.0.0 应用程序的参考构建器在线帮助](#)。
2. 选择控制软件菜单，然后选择 **Process Management (流程管理)**。
3. 确保没有正在进行的测序运行或仪器内二级分析。
4. 从控制软件菜单中选择 **Minimize Application (最小化应用程序)**。
5. 登录到 ilmnadmin 帐户。
6. 选择控制软件菜单，然后选择 **DRAGEN**。
7. 在“Genome (基因组)”部分中，选择 **View Installed Genomes (查看安装的基因组)** 以查看所有当前安装的 Illumina 和自定义基因组列表。
8. 关闭该模式窗口。
9. 选择“Import New Reference Genomes (导入新参考基因组)”下的 **Choose (选择)**，导航到便携式驱动器或装载的网络驱动器上的参考基因组文件 (*.tar.gz)，然后选择 **Open (打开)**。
10. 选择 **Import (导入)**。

导入噪声基线文件

如果在体细胞变异模式下使用 DRAGEN Enrichment 工作流程，您可以使用噪声基线文件过滤测序噪声或系统噪声。您可以从 [Illumina 支持网站](#) 下载标准自定义噪声文件，也可以创建自定义噪声基线文件。

生成自定义噪声基线文件

如果使用的是体细胞变异模式，您可以生成自定义噪声基线文件。噪声基线文件是使用与采样受试者不匹配的正常样品构建的。正常样品的建议数量为 50。

要生成自定义噪声基线文件，请使用以下其中一种方法：

- 使用 DRAGEN Bio-IT Platform 服务器。有关说明，请参见 [DRAGEN Bio-IT Platform 在线帮助](#)。
- 在 BaseSpace Sequence Hub 上使用 DRAGEN Baseline Builder 应用程序。使用 BaseSpace Sequence Hub 的“Instrument Run Setup (仪器运行设置)”中的 BCL Convert 管道生成 FASTQ 文件。测序运行完成并且有 50 个样品可用后，将 FASTQ 文件输入到 DRAGEN Baseline Builder 应用程序中。

使用用户界面导入基线文件

导入基线文件后，您可以在体细胞变异模式下使用 DRAGEN Enrichment 工作流程设置测序运行。

1. 从 [Illumina 支持网站](#) 下载标准基线文件，或从 DRAGEN 服务器或 DRAGEN Baseline Builder 应用程序中下载自定义基线文件。
2. 从控制软件菜单中选择 **Minimize Application**（最小化应用程序）。
3. 登录到 ilmnadmin 帐户。
4. 选择 **Applications**（应用程序），然后选择 **Favorites**（收藏夹）。
5. 选择 **+Other Locations**（+其他位置），然后选择 **Computer**（计算机）。
6. 双击 **usr**，然后双击 **local**（本地）。
7. 双击 **illumina**，然后双击 **aux_files**。
8. 将噪声基线文件拖到 **aux_files** 中。

使用终端导入基线文件

导入基线文件后，您可以在体细胞变异模式下使用 DRAGEN Enrichment 工作流程设置测序运行。

1. 从 [Illumina 支持网站](#) 下载标准基线文件，或从 DRAGEN 服务器或 DRAGEN Baseline Builder 应用程序中下载自定义基线文件。
2. 从控制软件菜单中选择 **Minimize Application**（最小化应用程序）。
3. 登录到 ilmnadmin 帐户。
4. 选择 **Applications**（应用程序）。
5. 在“Favorites（收藏夹）”下，选择 **Terminal**（终端）。
6. 输入以下命令：

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

配置运行模式

运行模式适用于所有运行，决定了输入运行参数的位置以及分析数据的方式。

云或混合模式

1. 从控制软件菜单中选择 **Settings**（设置）。
2. 选择“BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support（BaseSpace Sequence Hub 服务和 Proactive 支持）”下的 **Online Run Setup**（在线运行设置）。
3. 根据情况选择下面的选项来配置其他设置：
 - a. **Proactive and Run Monitoring**（Proactive 和运行监控）或 **Proactive, Run Monitoring and Storage**（Proactive、运行监控和存储）。
 - b. **Hosting Location**（服务器位置）的下拉菜单。
 - c. [可选] 输入 **Private Domain Name**（专用域名）。

4. 选择 **Save** (保存)。

本地或独立模式

1. 从控制软件菜单中选择 **Settings** (设置)。
2. 选择“BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support (BaseSpace Sequence Hub 服务和 Proactive 支持)”下的 **Local Run Setup** (本地运行设置)。
3. 根据情况选择下面的选项来配置其他设置：
 - a. **Proactive Support Only** (仅 Proactive 支持)、**Proactive and Run Monitoring** (Proactive 和运行监控)、**Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive、运行监控和存储) 或 **None** (无)。

i | 仅当选择了 **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive、运行监控和存储) 时，BaseSpace Sequence Hub 才允许使用重新排队功能。如果样品表无效，此选项允许您更正样品表并对文库拆分分析重新排队。要使用仪器内的重新排队功能，请参见[对运行重新排队 \(第 69 页\)](#)。

- b. **Hosting Location** (服务器位置) 的下拉菜单。
 - c. [可选] 输入 **Private Domain Name** (专用域名)。
4. 选择 **Save** (保存)。

样品表注意事项 (适用于本地或独立模式)

使用 DRAGEN 进行分析时，必须使用 v2 文件格式的样品表。v2 文件格式的样品表与未启用 DRAGEN 的 BaseSpace Sequence Hub 应用程序也兼容。有关创建 v2 文件格式样品表的信息，请参见[V2 格式样品表设置 \(第 73 页\)](#)。

仪器自定义

本部分包含有关配置可用自定义设置的信息。要设置默认输出文件夹，请参见[指定默认输出文件夹位置 \(第 12 页\)](#)。

为仪器命名

1. 从控制软件菜单中选择 **Settings** (设置)。
2. 选择“Instrument Nickname (仪器昵称)”，然后输入偏好的仪器名称。
该名称会显示在每个屏幕顶部。
3. 选择 **Save** (保存)。

设置变性和稀释首选项

1. 从控制软件菜单中选择 **Settings** (设置)。
2. 选择是否自动在仪器上进行文库变性和稀释。该设置默认为您为之前的运行选择的选项。

- 要自动在仪器上进行文库变性和稀释，请选择 **Denature and Dilute On Board**（在仪器上变性和稀释）复选框。
- 要手动对文库进行变性和稀释，请取消选择 **Denature and Dilute On Board**（在仪器上变性和稀释）复选框。
有关手动对文库进行变性和稀释的说明，请参见《*NextSeq 1000 和 2000 变性和稀释文库指南*》（文档号 1000000139235）。

设置自动试剂清除首选项

1. 从控制软件菜单中选择 **Settings**（设置）。
2. 选择是否让系统在每次运行后都自动将未使用的试剂清除到废试剂仓中，以简化运行完成后的试剂废液弃置流程：
 - 要自动清除，请选中 **Purge Reagent Cartridge**（清除试剂夹盒）复选框。
 - 要跳过自动清除步骤，请取消选择 **Purge Reagent Cartridge**（清除试剂夹盒）复选框（这是默认设置）。清除未使用的试剂会使整个工作流程所需时间增加 2 个小时。
3. 选择 **Save**（保存）。

配置软件更新

1. 从控制软件菜单中选择 **Settings**（设置）。
2. 选择系统是否自动检查软件更新：
 - 要自动检查，请选择 **Autocheck for software updates**（自动检查软件更新）复选框。
 - 要手动检查，请取消选择 **Autocheck for software updates**（自动检查软件更新）复选框。自动检查软件更新需要互联网连接。有关安装软件更新的详细信息，请参见 [软件更新](#)（第 63 页）。
3. 选择 **Save**（保存）。

更改 LCD 亮度

1. 从控制软件菜单中选择 **Settings**（设置）。
2. 将 LCD 亮度滑块移至所需的百分比。
3. 选择 **Save**（保存）。

设置代理服务器

只有 NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 提供代理服务器支持。

1. 从控制软件菜单中选择 **Settings (设置)**。
2. 选择当前代理设置打开“Proxy Settings (代理设置)”屏幕。
3. 选中 **Enable Proxy (启用代理)** 复选框，然后输入服务器 IP 端口地址。
4. [可选] 如果代理服务器需要身份验证，请选中 **Requires Username and Password (需要用户名和密码)** 复选框，然后输入用户名和密码。
5. 选择 **Save (保存)** 保存并验证代理信息。
6. 选择以下其中一个选项：
 - 选择 **Yes, I'm Finished (是，我已完成)** 可重新启动系统并应用新代理设置。
 - 选择 **No, Take Me Back (否，我要返回)** 可返回到“Settings (设置)”屏幕。新代理设置将会保存，但在您重新启动系统之前不会应用。

耗材和设备

本章列出了试剂盒的所有内含物品以及存储条件。还介绍了为完成操作流程以及执行维护和故障诊断程序所必须购买的辅助耗材和设备。

测序耗材

在 NextSeq 1000/2000 上测序需要使用一个一次性 Illumina NextSeq 1000/2000 P2 Reagents 试剂盒或一个一次性 Illumina NextSeq 1000/2000 P3 Reagents 试剂盒。NextSeq 1000/2000 P2 Reagents 试剂盒有三种规格（100 次循环、200 次循环和 300 次循环），NextSeq 1000/2000 P3 Reagents 试剂盒有四种规格（50 次循环、100 次循环、200 次循环和 300 次循环）。

NextSeq 1000 测序系统仅与 Illumina NextSeq 1000/2000 P2 Reagents 试剂盒兼容。

试剂盒提供用于测序的夹盒和流动槽。收到 NextSeq 1000/2000 P2 Reagents 或 NextSeq 1000/2000 P3 Reagents 试剂盒时：

- 立即按所要求的温度存储试剂盒组件，以确保性能正常。
- 未经指示不得打开任何银箔包装袋。
- 将夹盒存放在包装盒中，以免撕坏或刺穿银箔包装袋。
- 存放夹盒时，使箭头朝上。

! 如果夹盒标签未朝上，则会对测序数据造成负面影响。

表 2 试剂盒组件

耗材	数量	存储温度	尺寸
夹盒	1	-25°C 到 -15°C	29.2 cm × 17.8 cm × 12.7 cm (11.5 in × 7 in × 5 in)
流动槽	1	2°C 到 8°C*	21.6 cm × 12.7 cm × 1.9 cm (8.5 in × 5 in × 0.75 in)
含 Tween 20 的 RSB	1	-25°C 到 -15°C	4 cm x 6.6 cm x 5 cm (1.6 in x 2.6 in x 2 in)

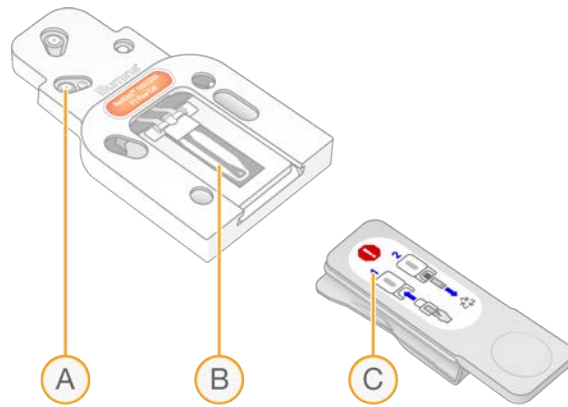
*在室温下装运。

两种耗材都有标识符用于跟踪和确保兼容性。夹盒和流动槽使用了 RFID¹。

¹射频识别

流动槽

该流动槽为图形化单泳道流动槽。这个由玻璃制成的流动槽封装在塑料夹盒中。流动槽上有一个突出的灰色拉条，用于确保安全处理。

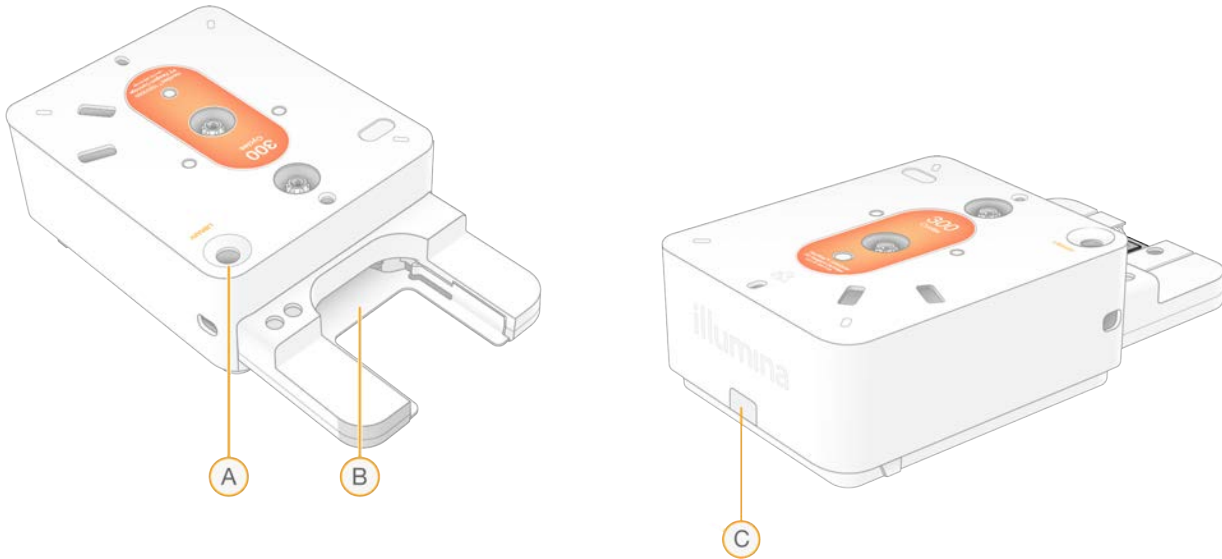


- A. 塑料夹盒
- B. 流动槽
- C. 灰色拉条

数百万个纳米孔覆盖在流动槽的内表面。簇在这些纳米孔中生成，然后系统会通过这些簇执行测序反应。纳米孔的图案式排列可增加输出片段和数据。

夹盒

测序试剂夹盒中预先装入了簇生成试剂、测序试剂、双末端测序试剂和标签试剂。预留了一个封箔槽用于放置文库，正面预留了一个插槽用于放置流动槽。



- A. 文库槽
- B. 流动槽插槽
- C. 排放塞

夹盒可容纳运行所需的所有耗材：试剂、文库和流动槽。文库和流动槽会装到已解冻的夹盒中，之后夹盒会装到仪器上。运行开始后，系统会自动将文库和试剂从夹盒传送到流动槽。

夹盒包含泵、阀和系统的所有射流，包括底面用于收集废试剂的槽。夹盒在运行后将会丢弃，因此无需清洗仪器。

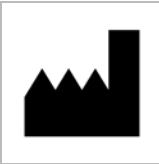


支持的循环次数

夹盒上的标签指示的是要分析的循环次数，而非要执行的循环次数。流动槽可与任何循环次数和任何片段类型兼容。

所有 100 次循环和 200 次循环夹盒额外包含 38 次循环。300 次循环夹盒额外包含 27 次循环。例如，300 次循环夹盒提供的试剂足以进行多达 327 次测序循环。有关测序循环次数的信息，请参见[一个片段中的循环次数（第 27 页）](#)。

符号描述

下表介绍了耗材或耗材包装上的符号。

符号	描述
	耗材的过期日期。为获得最佳结果，请在此日期之前使用耗材。
	表示制造商 (Illumina)。
	预期用途是仅供科研使用 (RUO)。
	表示部件号，用于识别耗材。 ¹
	表示批代码，用于识别耗材的生产批或批次。 ¹
	表示会危害人体健康。
	存储温度范围（以摄氏度为单位）。请在所指示的范围内存储耗材。 ²

辅助耗材

购买用于测序和维护的下列耗材。

测序所需的耗材

表 3 测序所需的耗材

耗材	供应商	用途
一次性无粉手套	一般实验室供应商	一般用途。
NextSeq 1000/2000 P2 (v3) Reagents 试剂盒	Illumina: 商品目录号 20046811 (100 次循环) 商品目录号 20046812 (200 次循环) 商品目录号 20046813 (300 次循环)	为单次运行提供试剂夹盒、流动槽以及含 Tween 20 的 NextSeq 1000/2000 RSB。与 NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 兼容。
NextSeq 2000 P3 Reagents 试剂盒	Illumina: 商品目录号 20046810 (50 次循环) 商品目录号 20040559 (100 次循环) 商品目录号 20040560 (200 次循环) 商品目录号 20040561 (300 次循环)	为单次运行提供试剂夹盒、流动槽以及含 Tween 20 的 NextSeq 1000/2000 RSB。仅与 NextSeq 2000 兼容。
1.5 毫升微细管	Fisher Scientific, 商品目录号 14-222-158 或等效的低吸附试管	将文库稀释到装入浓度。
10 微升移液器吸头	一般实验室供应商	稀释文库。
20 微升移液器吸头	一般实验室供应商	稀释和装入文库。
200 微升移液器吸头	一般实验室供应商	稀释文库。
1000 微升移液器吸头	一般实验室供应商	刺穿文库槽箔纸。
[可选] PhiX 对照品 v3	Illumina, 商品目录号 FC-110-3001	执行仅 PhiX 运行或注入 PhiX 对照品。
[可选] 纸巾	一般实验室供应商	在水槽中解冻后擦干夹盒。

仪器维护所需的耗材

表 4 仪器维护所需的耗材

耗材	供应商	用途
一次性无粉手套	一般实验室供应商	一般用途。
NextSeq 1000/2000 备用空气过滤器*	Illumina, 商品目录号 20029759	每六个月更换一次空气过滤器。

* 仪器随附两个，一个已安装，一个备用。如果不在质保期内，则更换件由用户自备。请直到使用时再拆开包装。

辅助设备

购买下列用于测序的设备。

物品	来源	用途
冰柜, -25°C 到 -15°C	一般实验室供应商	存储夹盒。
冰桶	一般实验室供应商	放置文库，直到测序。
10 微升移液器	一般实验室供应商	将文库稀释到装入浓度。
20 微升移液器	一般实验室供应商	将文库稀释到装入浓度并将文库装入夹盒中。
200 微升移液器	一般实验室供应商	将文库稀释到装入浓度。
冰箱, 2°C 到 8°C	一般实验室供应商	存储流动槽或解冻夹盒。
[可选] 以下其中一种可保持在 25°C 的温控水槽或等效物: <ul style="list-style-type: none"> · Thermo Scientific Precision 35L 循环水槽 (可同时容纳 5 个夹盒) · SHEL LAB 22L 数显循环水槽 (可同时容纳 3 个夹盒) 	<ul style="list-style-type: none"> · Thermo Fisher Scientific, 商品目录号 TSCIR 35 · Shel Lab, 商品目录号 SWBC22 	解冻夹盒。

操作流程

本章提供有关如何准备耗材、稀释文库以及进行设置以便以四种模式之一运行测序的逐步说明，这四种运行模式分别为云、混合、本地和独立模式，其中云、混合和本地模式使用 DRAGEN 或 BaseSpace Sequence Hub，而独立模式则为独立运行，用于生成仅供自定义分析工作流程使用的 cBCL 数据。

处理试剂和其他化学品时，请佩戴护目镜，穿上实验室工作服并戴上无粉手套。

开始执行操作流程之前，请确保已准备好所需的耗材和设备。请参见[耗材和设备](#)（第 20 页）。

使用指定的剂量、温度和持续时间，按所示的顺序遵照操作流程操作。

测序注意事项

开始执行操作流程之前，请回顾下列信息，为稀释文库和设置运行做好准备。达到最佳装入浓度是成功测序和分析的关键所在。输入正确的片段循环次数有助于确保获得最佳的数据输出。

装入剂量和浓度

装入剂量为 20 微升。装入浓度因文库类型而异：

文库类型	装入浓度（皮摩尔/升）
AmpliSeq™ for 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
100% PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1200
TruSeq DNA Nano 550	1500
TruSeq Stranded mRNA	1000

对于其他文库类型，建议的起始装入浓度为 650 皮摩尔/升。请在后续运行中优化该浓度，以确定一个始终能够产生符合规范的数据的装入浓度。

i 要优化装入浓度，请使用运行完成后可用的 `PrimaryAnalysisMetrics.csv` 输出文件中的 % 装入浓度指标。如果 % 装入浓度低于 95%，请在后续运行中以 100 皮摩尔/升的增量增加装入浓度。

一个片段中的循环次数

对于每个片段，输入最小循环次数 26 和最大循环次数 151 有助于确保数据质量。具体的循环次数取决于进行的实验。NextSeq 1000/2000 Control Software 要求片段 1 至少有 1 次循环，但会在片段 1 的循环次数小于 26 时显示警告。

片段 1、标签 1、标签 2 和片段 2 的总循环次数不能大于试剂盒支持的循环次数加 38 次循环（针对 100 次循环和 200 次循环试剂盒）和 27 次循环（针对 P3 300 次循环试剂盒）。如果标签 1 和标签 2 的循环次数小于 6，NextSeq 1000/2000 Control Software 将显示警告。如果标签 1 或标签 2 的循环次数为 0，系统将不显示警告。

最小和最大循环次数包含一次额外的循环。必须在所需片段长度的基础上添加一次循环，以修正定相和预定相的效果。片段长度是片段 1 和片段 2 中的测序循环次数，它不包括额外的循环和标签循环。有关详细信息，请参见 [Real-Time Analysis 工作流程（第 48 页）](#) 中的“定相修正”。

运行设置示例：

- 如果片段长度为 35（单端），请在“Read 1（片段 1）”字段中输入 36。
- 如果每个片段（双末端）的片段长度为 150，请在“Read 1（片段 1）”字段中输入 151，在“Read 2（片段 2）”字段中输入 151。

在 BaseSpace Sequence Hub 中计划测序运行

使用 BaseSpace Sequence Hub 中的“Instrument Run Setup（仪器运行设置）”创建和配置您的运行设置。如果要设置采用云模式或混合模式的运行，请将运行配置提交到“Planned Runs（计划的运行）”选项卡中您的 BaseSpace Sequence Hub 帐户的计划运行列表。“Planned Runs（计划的运行）”选项卡中会显示可用于在 NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统中进行测序的运行。如果要设置采用本地模式的运行，请使用“Instrument Run Setup（仪器运行设置）”创建并导出 v2 文件格式的样品表。或者，请参见 [V2 格式样品表设置（第 73 页）](#)，在没有 BaseSpace Sequence Hub 的情况下使用提供的模板来创建样品表。

BaseSpace Sequence Hub 的“Instrument Run Setup（仪器运行设置）”不支持样品数量超过 1536 个。

设置运行

1. 导航到 BaseSpace Sequence Hub。
2. 输入您的电子邮件地址和 BaseSpace Sequence Hub 密码，然后选择 Sign in（登录）。
3. 选择 Runs（运行）选项卡，然后选择 New Run（新运行）下拉列表。
4. 选择 NextSeq 1000/2000。
5. 在“Run Name（运行名称）”字段中，输入您偏好的唯一名称以标识当前运行。
运行名称最多可包含 225 个字母数字字符、空格、短破折号和下划线。
6. 选择以下其中一个分析位置。
 - BaseSpace — 在云中分析测序数据。
 - Local（本地）— 在仪器内分析测序数据，或生成用于本地模式或混合模式的 v2 格式样品表。
7. 选择分析类型和版本。

有关二级分析的详细信息，请参见 [DRAGEN 二级分析输出文件（第 52 页）](#) 或 BaseSpace Sequence Hub 应用程序文档。如果您之前选择的是 DRAGEN Single Cell RNA 分析，请参见 NextSeq 1000/2000 产品文件页面了解有关第三方单细胞 RNA 文库制备试剂盒兼容性的信息。

i | 要进行仪器内分析，所选版本必须与仪器上安装的 DRAGEN 版本一致。要确认仪器上安装的 DRAGEN 版本，请参见 [DRAGEN 工作流程和许可证更新（第 65 页）](#)。

8. [可选] 按以下方式设置自定义标签试剂盒。

如果您要使用多个文库，这些文库必须具有相同的标签片段长度。

- 选择“Index Adapter Kit（标签接头试剂盒）”下拉列表下的 Add Custom Index Adapter Kit（添加自定义标签接头试剂盒）。
- 选择一种模板类型，然后输入试剂盒名称、接头序列、标签策略和标签序列。确保第二个标签 (i5) 接头序列处于正向。
- 选择 Create New Kit（创建新试剂盒）。

9. [可选] 按以下方式设置自定义文库制备试剂盒。

- 选择“Library Prep Kit（文库制备试剂盒）”下拉列表下的 Add Custom Library Prep Kit（添加自定义文库制备试剂盒）。
- 输入自定义文库制备试剂盒的名称、片段类型、默认片段循环次数和兼容的标签接头试剂盒。
- 选择 Create New Kit（创建新试剂盒）。

10. 选择下面的仪器设置。系统会根据文库制备试剂盒自动选择建议的选项。有些文库制备试剂盒的标签片段数量和片段类型已被硬编码，无法更改。

- 文库制备试剂盒
- 标签接头试剂盒
- 标签片段数量
- 片段类型
- 每个片段的测序循环次数

i | 如果为文库制备试剂盒选择了“Not Specified（未指定）”，则在“Sample Data（样品数据）”部分输入标签序列前，都不会更新标签片段数量。

11. 使用以下其中一个选项将样品信息输入到样品数据电子表格中。要将样品分组以在下游分析期间进行数据汇总，请在“Project（项目）”列中为该组分配一个名称。

- 选择 Import Data（导入数据），然后选择样品表。确保您的样品表符合格式要求。请参见 [V2 格式样品表设置（第 73 页）](#)。在初始下载之后修改样品表会导致分析失败。
- 粘贴直接来自外部文件的样品 ID 以及标签板孔位置或 i7 和 i5 标签。粘贴之前，请在“Rows（行）”字段中输入样品行数，然后选择 +。样品 ID 最多可包含 20 个字母数字字符、连字符和下划线。

i | 有固定布局的标签板需要输入孔位置。没有固定布局的标签需要输入 i7 和 i5 标签。i5 标签必须正向输入。

- 手动输入样品 ID 和对应的孔位置或标签。如果为文库制备试剂盒选择了“Not Specified（未指定）”，请正向输入标签 2 (i5) 序列。

12. 选择 Next (下一步)。

设置二级分析

针对为运行所选的分析类型，配置相应设置。有关 DRAGEN 分析工作流程的详细信息，请参见 [DRAGEN 二级分析输出文件 \(第 52 页\)](#)

Illumina DRAGEN BCL Convert

按照下面的步骤配置 Illumina DRAGEN BCL Convert 分析。

1. 输入以下可选设置。

设置	描述
AdapterRead1	片段 1 的接头序列。如果使用的是 Illumina 文库制备试剂盒，请将 AdapterRead1 字段留空。
AdapterRead2	片段 2 的接头序列。如果使用的是 Illumina 文库制备试剂盒，请将 AdapterRead2 字段留空。
BarcodeMismatchIndex1	第一个标签片段与标签序列之间允许存在的不匹配项数。默认值为 1。如果条形码为 6 碱基对，建议将该值设为 0。
BarcodeMismatchIndex2	第二个标签片段与标签序列之间允许存在的不匹配项数。默认值为 1。如果条形码为 6 碱基对，建议将该值设为 0。
OverrideCycles	<p>用于指定片段的 UMI 循环和遮盖循环的字符串。允许使用下列值：</p> <ul style="list-style-type: none"> · N — 指定要忽略的循环次数。 · Y — 指定测序循环次数。 · I — 指定标签循环次数。 · U — 指定要裁剪的 UMI 循环次数。 <p>每个元素用分号分隔。下面是一些 OverrideCycles 输入示例。</p> <pre>U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66</pre>

2. 选择是否保存 FASTQ 文件的副本。仅当您选择保留 FASTQ 文件时，才会生成 FASTQ 文件。

3. 选择以下其中一个 FASTQ 输出格式选项：

- gzip — 以 gzip 格式保存 FASTQ 文件。
- DRAGEN — 以 ora 格式保存 FASTQ 文件。

4. 完成运行配置。

- 要将运行配置发送到您的 BaseSpace Sequence Hub 帐户，请选择 **Submit Run (提交运行)**。提交到 BaseSpace Sequence Hub 的运行会显示在计划运行列表中，并可用于使用云模式或混合模式的系统。
- 要将运行配置另存为 v2 文件格式的样品表，请从 **Submit Run (提交运行)** 下拉列表中选择 **Export Sample Sheet (导出样品表)**。要在使用本地模式的系统中启动运行，必须使用样品表。仅当将分析位置选为“Local (本地)”时，此选项才可用。

Illumina DRAGEN Enrichment

按照下面的步骤配置 Illumina DRAGEN Enrichment 分析。

1. 选择参考基因组。

如果可能，请使用带 alt aware 的参考基因组。

2. 选择内含目标区域的 *.bed 文件，或上载新的自定义文件。

确保 BED 文件的参考基因组与步骤 1 中所选的参考基因组一致。对于新的自定义 BED 文件，请使用以下命名格式：`name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`。

- **本地模式** — 选择 **Select Custom File (Local) (选择自定义文件 (本地))** 进行上载以用于单次运行，或 **Upload Custom File (BaseSpace) (上载自定义文件 (BaseSpace))** 以重复使用。
- **云模式或混合模式** — 选择 **Upload Custom File (BaseSpace) (上载自定义文件 (BaseSpace))**。自定义 BED 文件仅在其上载到的工作组中可用。

3. 选择胚系或体细胞变异检出器。

4. [可选] 如果使用的是体细胞变异检出器，请选择噪声基线文件。有关详细信息，请参见 [导入噪声基线文件 \(第 15 页\)](#)。

5. 选择映射/比对输出格式。

6. 选择是否保存 FASTQ 文件的副本。仅当您选择保留 FASTQ 文件时，才会生成 FASTQ 文件。

7. 选择以下其中一个 FASTQ 输出格式选项：

- **gzip** — 以 gzip 格式保存 FASTQ 文件。
- **DRAGEN** — 以 ora 格式保存 FASTQ 文件。

8. 完成运行配置。

- 要将运行配置发送到您的 BaseSpace Sequence Hub 帐户，请选择 **Submit Run (提交运行)**。提交到 BaseSpace Sequence Hub 的运行会显示在计划运行列表中，并可用于使用云模式或混合模式的系统。
- 要将运行配置另存为 v2 文件格式的样品表，请从 **Submit Run (提交运行)** 下拉列表中选择 **Export Sample Sheet (导出样品表)**。样品表和二级分析支持文件即会下载到 .zip 文件夹中，使用本地模式在系统上启动运行时需要用到它们。仅当将分析位置选为“Local (本地)”时，此选项才可用。

Illumina DRAGEN Germline

按照下面的步骤配置 Illumina DRAGEN Germline 分析。

1. 选择参考基因组。
如果可能，请使用带 alt aware 的参考基因组。
2. 选择映射/比对输出格式。
3. 选择是否保存 FASTQ 文件的副本。仅当您选择保留 FASTQ 文件时，才会生成 FASTQ 文件。
4. 选择以下其中一个 FASTQ 输出格式选项：
 - **gzip** — 以 gzip 格式保存 FASTQ 文件。
 - **DRAGEN** — 以 ora 格式保存 FASTQ 文件。
5. 完成运行配置。
 - 要将运行配置发送到您的 BaseSpace Sequence Hub 帐户，请选择 **Submit Run (提交运行)**。提交到 BaseSpace Sequence Hub 的运行会显示在计划运行列表中，并可用于使用云模式或混合模式的系统。
 - 要将运行配置另存为 v2 文件格式的样品表，请从 **Submit Run (提交运行)** 下拉列表中选择 **Export Sample Sheet (导出样品表)**。样品表和二级分析支持文件即会下载到 .zip 文件夹中，使用本地模式在系统上启动运行时需要用到它们。仅当将分析位置选为“Local (本地)”时，此选项才可用。

Illumina DRAGEN RNA

按照下面的步骤配置 Illumina DRAGEN RNA 分析。

1. 选择参考基因组。
如果可能，请使用不带 alt aware 的参考基因组。
2. 选择映射/比对输出格式。
3. 选择是否保存 FASTQ 文件的副本。仅当您选择保留 FASTQ 文件时，才会生成 FASTQ 文件。
4. 选择以下其中一个 FASTQ 输出格式选项：
 - **gzip** — 以 gzip 格式保存 FASTQ 文件。
 - **DRAGEN** — 以 ora 格式保存 FASTQ 文件。
5. [可选] 上传基因传输格式 (GTF) 的 RNA 注释文件。
 - **本地模式** — 选择 **Select Custom File (Local) (选择自定义文件 (本地))** 进行上传以用于单次运行，或 **Upload Custom File (BaseSpace) (上传自定义文件 (BaseSpace))** 以重复使用。
 - **云模式或混合模式** — 选择 **Upload Custom File (BaseSpace) (上传自定义文件 (BaseSpace))**。GTF 文件仅在其上载到的工作组中可用。
将 GTF 上传到 BaseSpace Sequence Hub 工作组后，从下拉菜单中选择 RNA 注释文件。
6. 选择是否启用差异表达。
7. 如果启用了差异表达，请为每个样品选择一个对照值或比较值。

在每个比较组中，任何标记为对照品的样品会与标记为比较品的所有样品进行比较。如果样品不包含对照值或比较值，请选择 na 作为值。

8. 完成运行配置。

- 要将运行配置发送到您的 BaseSpace Sequence Hub 帐户，请选择 **Submit Run (提交运行)**。提交到 BaseSpace Sequence Hub 的运行会显示在计划运行列表中，并可用于使用云模式或混合模式的系统。
- 要将运行配置另存为 v2 文件格式的样品表，请从 **Submit Run (提交运行)** 下拉列表中选择 **Export Sample Sheet (导出样品表)**。如果提供了可选 GTF 文件，样品表和二级分析支持文件会下载到 .zip 文件夹中，使用本地模式在系统上启动运行时需要用到它们。仅当将分析位置选为“Local (本地)”时，此选项才可用。

Illumina DRAGEN Single Cell RNA

按照下面的步骤配置 Illumina DRAGEN Single Cell RNA 分析。

1. 选择参考基因组。

如果可能，请使用不带 alt aware 的参考基因组。

2. [可选] 上传基因传输格式 (GTF) 的 RNA 注释文件。

- **本地模式** — 选择 **Select Custom File (Local) (选择自定义文件 (本地))** 进行上传以用于单次运行，或 **Upload Custom File (BaseSpace) (上传自定义文件 (BaseSpace))** 以重复使用。
- **云模式或混合模式** — 选择 **Upload Custom File (BaseSpace) (上传自定义文件 (BaseSpace))**。GTF 文件仅在其上载到的工作组中可用。

将 GTF 上传到 BaseSpace Sequence Hub 工作组后，从下拉菜单中选择 RNA 注释文件。

3. 选择映射/比对输出格式。

4. 选择是否保存 FASTQ 文件的副本。仅当您选择保留 FASTQ 文件时，才会生成 FASTQ 文件。

5. 选择以下其中一个 FASTQ 输出格式选项：

- **gzip** — 以 gzip 格式保存 FASTQ 文件。
- **DRAGEN** — 以 ora 格式保存 FASTQ 文件。

6. 选择与您的文库制备试剂盒类型相同的配置。

例如，如果您选择了单细胞 RNA 文库试剂盒 1 作为文库制备试剂盒，则请为配置类型选择类型 1。

7. 选择条形码片段。

8. [可选] 编辑条形码和 UMI 中的碱基数量。系统会根据您选择的文库制备试剂盒和配置类型自动填充值。

9. 选择链方向。

10. [可选] 选择包含您的条形码序列的文件或上传新的自定义文件。

11. 如果使用的是高级/自定义配置类型，请输入覆盖循环次数、条形码位置和 UMI 位置的值。

12. 完成运行配置。

- 要将运行配置发送到您的 BaseSpace Sequence Hub 帐户，请选择 **Submit Run (提交运行)**。提交到 BaseSpace Sequence Hub 的运行会显示在计划运行列表中，并可用于使用云模式或混合模式的系统。
- 要将运行配置另存为 v2 文件格式的样品表，请从 **Submit Run (提交运行)** 下拉列表中选择 **Export Sample Sheet (导出样品表)**。如果提供了可选 GTF 文件，样品表和二级分析支持文件会下载到 .zip 文件夹中，使用本地模式在系统上启动运行时需要用到它们。仅当将分析位置选为“Local (本地)”时，此选项才可用。

Illumina DRAGEN Amplicon

按照下面的步骤配置 Illumina DRAGEN Amplicon 分析。

1. 选择参考基因组。

2. 选择内含目标区域的 *.bed 文件，或上载新的自定义文件。

确保 BED 文件的参考基因组与步骤 1 中所选的参考基因组一致。对于新的自定义 BED 文件，请使用以下命名格式：`name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`。

- **云模式或混合模式**— 选择 **Upload Custom File (BaseSpace) (上载自定义文件 (BaseSpace))**。自定义 BED 文件仅在其上载到的工作组中可用。
- **本地模式**— 选择 **Select Custom File (Local) (选择自定义文件 (本地))** 进行上载以用于单次运行，或 **Upload Custom File (BaseSpace) (上载自定义文件 (BaseSpace))** 以重复使用。

3. 选择胚系或体细胞变异检出器。

4. 选择映射/比对输出格式。

5. [本地] 选择是否保存 FASTQ 文件的副本。仅当您选择保留 FASTQ 文件时，才会生成 FASTQ 文件。

6. 选择是否保存 FASTQ 文件的副本。仅当您选择保留 FASTQ 文件时，才会生成 FASTQ 文件。

7. 选择以下其中一个 FASTQ 输出格式选项：

- **gzip** — 以 gzip 格式保存 FASTQ 文件。
- **DRAGEN** — 以 ora 格式保存 FASTQ 文件。

8. 完成运行配置。

- 要将运行配置发送到您的 BaseSpace Sequence Hub 帐户，请选择 **Submit Run (提交运行)**。提交到 BaseSpace Sequence Hub 的运行会显示在计划运行列表中，并可用于使用云模式或混合模式的系统。
- [本地] 要将运行配置另存为 v2 文件格式的样品表，请从 **Submit Run (提交运行)** 下拉列表中选择 **Export Sample Sheet (导出样品表)**。样品表和二级分析支持文件即会下载到 .zip 文件夹中，使用本地模式在系统上启动运行时需要用到它们。仅当将分析位置选为“Local (本地)”时，此选项才可用。

解冻未拆封的夹盒和流动槽

此步骤是将未开封包装袋中的夹盒解冻，并准备流动槽。需使用温控水槽、冰箱或室温空气这三种方法之一来解冻包装袋中的夹盒。夹盒解冻后请立即使用，不要再次冷冻。如果夹盒解冻后无法立即使用，请参见[重新存放耗材](#)（第 68 页）。

图 4 未拆封的夹盒



在温控水槽中解冻夹盒

1. 戴上一副新的无粉手套，然后从存储环境中取出夹盒。
2. 从盒中取出夹盒，但不要打开铝箔包装袋。

! 如果夹盒包装已撕裂或刺破，则在水槽中解冻可能会导致测序失败。在此情况下，请在室温下或在冰箱中解冻。

3. 在温度控制在 25°C 的水槽中解冻未拆封的夹盒 6 小时：



- 不论解冻多少个夹盒，都请将水深维持在至少 9.5–10 厘米。
- 将温控水槽设置为 25°C。
- 使包装袋标签朝上，然后置于水槽中，但不要淹没。

! 请勿尝试将夹盒浸没在水槽中。如果包装袋标签未朝上或者夹盒在解冻期间翻转过来，则会对测序数据造成负面影响。


- 水槽解冻的时间不得超过 8 小时。
- 不要同时解冻超出水槽容纳数量的夹盒。有关兼容的水槽，请参见[辅助设备](#)（第 25 页）。
- 请勿堆叠夹盒。

4. 从水槽中取出夹盒并用纸巾擦干。

在冰箱中解冻夹盒

1. 戴上一副新的无粉手套。
2. 在预计运行的前一天，从 -25°C 到 -15°C 的存储环境中取出夹盒。
3. 从盒中取出夹盒，但*不要*打开银箔包装袋。
4. 将夹盒置于室温下，使标签朝上，确保侧面和顶部的空气流通。
 如果包装袋标签未朝上，则会对测序数据造成负面影响。
5. 在室温下解冻 6 小时。
6. 将夹盒置于 2°C 到 8°C 的冰箱中，使标签朝上，确保侧面的空气流通。
 如果包装袋标签未朝上，则会对测序数据造成负面影响。
7. 在冰箱中解冻 12 小时。请勿超过 72 小时。

在室温下解冻夹盒

1. 戴上一副新的无粉手套。
2. 从 -25°C 到 -15°C 的存储环境中取出夹盒。
3. 从盒中取出夹盒，但*不要*打开银箔包装袋。
4. 将夹盒放在适当位置，使标签朝上，确保侧面和顶部的空气流通。
 如果包装袋标签未朝上，则会对测序数据造成负面影响。
5. 在室温下解冻 9 小时。请勿超过 16 小时。

准备流动槽和夹盒

1. 按如下所示准备流动槽。
 - a. 从 2°C 到 8°C 的存储环境中取出新流动槽。
 - b. 将未开封的包装置于室温下 10–15 分钟，以防从包装中取出流动槽时其还处于冷凝状态。现在准备流动槽可确保其适时达到室温。
2. 如果使用冰箱解冻法，请执行以下操作：
 - a. 从 2°C 到 8°C 的存储环境中取出已解冻的夹盒。
 - b. 测序之前，先将未开封的夹盒置于室温下至少 15 分钟。请勿超过 1 小时。

稀释文库

如果使用仪器上变性和稀释功能，此步骤会将文库稀释到适用的装入浓度。可以选择加入 2% PhiX¹，这样可提供额外指标、碱基多样性或阳性对照品。对于碱基多样性较低的文库，应增加 PhiX 加入百分比。

如果要手动对文库进行变性和稀释，请参见《NextSeq 1000 和 2000 变性和稀释文库指南》（文档号 1000000139235）。此步骤仅适用于在仪器上变性和稀释。

将文库稀释到 2 纳摩尔/升

1. [可选] 将 10 纳摩尔/升备用 PhiX 从 -25°C 到 -15°C 的存储环境中取出。
只有在选择加入 PhiX 或执行仅 PhiX 运行时才需要 PhiX。
2. [可选] 将 PhiX 置于室温下解冻 5 分钟，然后使用荧光法（例如 Qubit）进行定量，以确认 PhiX 浓度。
如果无法定量，请使用 10 纳摩尔/升的浓度继续操作。
3. 稍稍振荡文库或 PhiX，然后以 280 × g 的转速离心 1 分钟。
4. 将含 Tween 20 的 RSB 用作稀释液，在低吸附微细管中制备至少 24 微升浓度为 2 纳摩尔/升的文库。
有关加入 PhiX 的说明，请参见 [添加 PhiX 对照品（可选）（第 37 页）](#)。
5. 稍作振荡，然后以 280 × g 的转速离心 1 分钟。

将 2 纳摩尔/升文库稀释到装入浓度

1. 在低吸附微细管中装入以下剂量的溶液，制备 24 微升稀释到合适装入浓度的文库：

文库类型*	装入浓度 (皮摩尔/ 升)	2 纳摩尔/升文库 剂量 (微升)	含 Tween 20 的 RSB 剂量 (微升)
AmpliSeq for 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

¹PhiX 是一个随时可用的小型 Illumina 文库，具有均衡的核苷酸表示。

文库类型*	装入浓度 (皮摩尔/ 升)	2 纳摩尔/升文库 剂量 (微升)	含 Tween 20 的 RSB 剂量 (微升)
TruSeq Stranded mRNA	1000	12	12
100% PhiX	650	7.8	16.2

* 对于未列出的文库类型，请从 650 皮摩尔/升的装入浓度开始，并在后续运行中进行优化。

此表格提供装入浓度示例。NextSeq 1000/2000 与所有 Illumina 文库制备试剂盒兼容，但最佳装入浓度可能有所不同。

2. 稍作振荡，然后以 $280 \times g$ 的转速离心 1 分钟。
3. 将稀释好的文库置于冰上，直至可以测序。
在稀释的当天对稀释到装入浓度的文库进行测序。
4. 按下文所述继续操作。
 - 如果要添加 PhiX，请参见[添加 PhiX 对照品 \(可选\) \(第 37 页\)](#)。
 - 如果不添加 PhiX，或者要执行的是仅 PhiX 运行，请参见[将耗材装入夹盒 \(第 37 页\)](#)。

添加 PhiX 对照品 (可选)

1. 在低吸附微细管中装入以下剂量的溶液，以制备 20 微升浓度为 1 纳摩尔/升的 PhiX：
 - 10 纳摩尔/升 PhiX (2 微升)
 - 含 Tween 20 的 RSB (18 微升)
2. 稍作振荡，然后以 $280 \times g$ 的转速离心 1 分钟。
3. 向 24 微升已稀释到最终装入浓度的文库添加 1 微升浓度为 1 纳摩尔/升的 PhiX。
两者混合后得到浓度约为 2% 的 PhiX 注入液。实际百分比因文库的质量和数量而异。
4. 将加入了 PhiX 的文库置于冰上，直至可以测序。
在稀释的当天对加入了 PhiX 的文库进行测序。

将耗材装入夹盒

此步骤是准备测序用的夹盒，为此，需要混合预先注入的试剂并装入稀释好的文库和流动槽。

准备夹盒

1. 从任何一侧的顶部缺口处撕开或用剪刀剪开夹盒包装袋。
2. 从包装袋中取出夹盒。丢弃包装袋和干燥剂。

3. 将夹盒翻转 10 次以混匀试剂。
翻转期间内部组件可能会发出响声，这是正常现象。

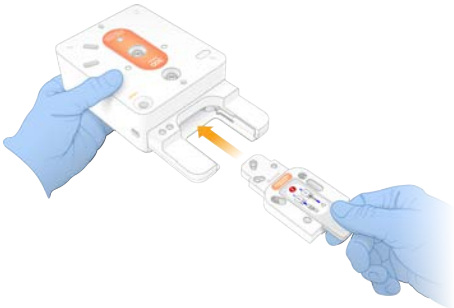


装入流动槽

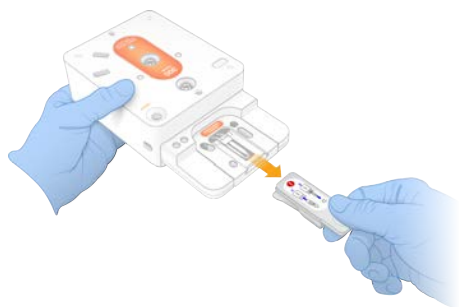
1. 从任何一侧的顶部切口处撕开或用剪刀剪开银箔包装。
如果无法立即使用流动槽，请参见[重新存放耗材](#)（第 68 页）。
2. 将流动槽从包装袋中抽出。
将银箔包装和干燥剂放在一旁，以防需要重新存放流动槽。干燥剂装在小袋中，放在银箔包装的底部。测序开始后，请丢弃包装和干燥剂。



3. 捏住流动槽上的灰色拉条，拉条上的标签朝上。
4. 将流动槽推入到夹盒正面的插槽中。
流动槽放置到位时，会发出咔哒声。如果正确装入，灰色拉条会从夹盒中突出来。



5. 拉回并取下灰色拉条，以露出流动槽。回收拉条。



装入文库

1. 使用新的 P1000 移液器吸头刺入文库槽并将箔纸挤到边沿以扩大孔洞。
2. 丢弃移液器吸头以防污染。
3. 缓慢将移液器吸头下移到文库槽底部，向槽底加入 20 微升稀释文库。避免接触箔纸。





启动测序运行

这一步会以下列四种模式之一启动测序运行：

- 云模式 — 从 NextSeq 1000/2000 Control Software 的计划运行列表中选择运行。测序期间，会将 cBCL 数据上载到 BaseSpace Sequence Hub。测序之后，会自动启动 BaseSpace Sequence Hub 中的 DRAGEN。
- 混合模式 — 从 NextSeq 1000/2000 Control Software 的计划运行列表中选择运行。测序之后，仪器内分析会自动启动。cBCL 数据和 DRAGEN 二级分析输出文件会存储到选定的输出文件夹中。

- **本地模式** — 需手动将 v2 文件格式的样品表导入 NextSeq 1000/2000 Control Software 中。测序之后，仪器内分析会自动启动。cBCL 数据和 DRAGEN 二级分析输出文件会存储到选定的输出文件夹中。如果选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive、运行监控和存储)”，也可以在测序完成后通过 BaseSpace Sequence Hub 应用程序来启动分析。
- **独立模式** — 按照 NextSeq 1000/2000 Control Software 中的说明设置运行以生成 cBCL 数据。

 在运行前检查期间或运行期间打开挡板可能导致运行失败。

 在挡板打开和关闭期间，不要接触仪器，以免受伤。

启动云或混合运行

1. 按[配置运行模式 \(第 16 页\)](#) 中所述配置运行模式。
2. 选择 **Start (开始)**。
3. 输入 BaseSpace Sequence Hub 登录凭据，然后选择 **Sign In (登录)**。
4. 如果您选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive、运行监控和存储)”，请选择包含在 BaseSpace Sequence Hub 的“Instrument Run Setup (仪器运行设置)”中所创建运行的工作组。

 为避免发生错误，必须选择工作组。请务必选择工作组后再继续。

5. 选择 **Next (下一步)**。
6. 选择您的运行。
7. 确认分析、运行长度和二级分析版本是否与正确的运行相匹配。
分析会显示 Cloud_ 来指示分析是在 BaseSpace Sequence Hub 中进行的。
8. 选择 **Review (复查)**。
9. [可选] 输入自定义片段引物和自定义标签引物位置。
有关制备和添加自定义引物的信息，请参见《*NextSeq 1000 和 2000 自定义引物指南*》(文档号 1000000139569)。请务必访问您所用的文库制备试剂盒的兼容产品页面，以确定是否需要 Illumina 自定义引物。
10. [可选] 选择自定义配方。有关详细信息，请参见[暗循环测序 \(第 83 页\)](#)。
如果使用的是 NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 和 Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus 试剂盒或 Illumina Stranded mRNA Prep 试剂盒，系统会自动选择自定义配方。
11. [可选] 要手动对文库进行变性和稀释，请取消选择 **Denature and Dilute On Board (在仪器上变性和稀释)** 复选框。请参见《*NextSeq 1000 和 2000 变性和稀释文库指南*》(文档号 1000000139235)。默认选择在 NextSeq 1000/2000 Control Software 设置中进行配置。
12. [可选] 要更改输出文件夹，请选择“Output Folder (输出文件夹)”字段，并输入新位置。
“Output Folder (输出文件夹)”字段中会自动填充您的默认设置，除非选择了 **Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive、运行监控和存储)**，否则该字段必填。
如果选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive、运行监控和存储)”，“Save to BaseSpace Sequence Hub (保存到 BaseSpace Sequence Hub)”将显示为“Enabled (已启用)”。

如果选择了“Proactive and Run Monitoring (Proactive 和运行监控)”，“Save to BaseSpace Sequence Hub (保存到 BaseSpace Sequence Hub)”将显示为“Disabled (已禁用)”。

13. 检查运行信息，然后选择 **Prep (准备)**。

启动本地运行

1. 按 [配置运行模式 \(第 16 页\)](#) 中所述配置运行模式。
2. 选择 **Start (开始)**。
3. 如果您选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive、运行监控和存储)”或“Proactive and Run Monitoring (Proactive 和运行监控)”，请输入 BaseSpace Sequence Hub 登录凭据，然后选择 **Sign In (登录)**。
4. 如果您选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive、运行监控和存储)”，请选择用来保存运行的 BaseSpace Sequence Hub 工作组，然后选择 **Next (下一步)**。

! 为避免发生错误，必须选择工作组。请务必选择工作组后再继续。

5. 选择“Start With Sample Sheet (从样品表开始)”下的 **Choose... (选择...)**，然后导航到 NextSeq 1000/2000 仪器、便携式驱动器或装载的网络驱动器上的 v2 格式样品表。样品表文件名不能包含特殊字符。

NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 会自动根据样品表检测 DRAGEN 版本，并视需要提示您切换版本。系统上必须安装相应的 DRAGEN 版本。有关安装信息，请参见 [软件更新 \(第 63 页\)](#)。

- **Instrument Run Setup Used (使用仪器运行设置)** — 如果适用，选择包含 v2 格式样品表和支持文件的 .zip 文件夹。否则，选择 v2 格式样品表。
- **Instrument Run Setup Not Used (不使用仪器运行设置)** — 确保二级分析支持文件位于 v2 格式样品表所在的同一目录中。

i 必须选择 v2 格式的样品表。要创建 v2 格式样品表，请从 BaseSpace Sequence Hub 的“Instrument Run Setup (仪器运行设置)”中下载生成的样品表，或者编辑 NextSeq 1000/2000 支持页面上提供的 v2 格式样品表模板。请参见 [V2 格式样品表设置 \(第 73 页\)](#)，了解有关样品表 v2 格式和要求的详细信息。确保样品表中引用的任何文件均位于样品表所在的相同文件夹内。

6. 选择 **Review (复查)**。
7. [可选] 输入自定义片段引物和自定义标签引物位置。
有关制备和添加自定义引物的信息，请参见《*NextSeq 1000 和 2000 自定义引物指南*》(文档号 1000000139569)。请务必访问您所用的文库制备试剂盒的兼容产品页面，以确定是否需要 Illumina 自定义引物。
8. [可选] 选择自定义配方。有关详细信息，请参见 [暗循环测序 \(第 83 页\)](#)。
如果使用的是 NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 和 Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus 试剂盒或 Illumina Stranded mRNA Prep 试剂盒，系统会自动选择自定义配方。
9. [可选] 要手动对文库进行变性和稀释，请取消选择 **Denature and Dilute On Board (在仪器上变性和稀释)** 复选框。请参见《*NextSeq 1000 和 2000 变性和稀释文库指南*》(文档号 1000000139235)。

默认选择在 NextSeq 1000/2000 Control Software 设置中进行配置。

10. [可选] 要更改输出文件夹，请选择“Output Folder（输出文件夹）”字段，并输入新位置。
“Output Folder（输出文件夹）”字段中会自动填充您的默认设置，除非选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage（Proactive、运行监控和存储）”，否则该字段必填。
如果选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage（Proactive、运行监控和存储）”，“Save to BaseSpace Sequence Hub（保存到 BaseSpace Sequence Hub）”将显示为“Enabled（已启用）”。
如果选择了“Proactive and Run Monitoring（Proactive 和运行监控）”，“Save to BaseSpace Sequence Hub（保存到 BaseSpace Sequence Hub）”将显示为“Disabled（已禁用）”。
11. 检查运行信息，然后选择 **Prep（准备）**。

启动独立运行

1. 按 [配置运行模式（第 16 页）](#) 中所述配置运行模式。
2. 选择 **Start（开始）**。
3. 如果您选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage（Proactive、运行监控和存储）”或“Proactive and Run Monitoring（Proactive 和运行监控）”，请输入 BaseSpace Sequence Hub 登录凭据，然后选择 **Sign In（登录）**。
4. 如果您选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage（Proactive、运行监控和存储）”，请选择用来保存运行的 BaseSpace Sequence Hub 工作组，然后选择 **Next（下一步）**。
5. 选择 **Set Up New Run（设置新运行）**。
6. 在“Run Name（运行名称）”字段中，输入您偏好的唯一名称以标识当前运行。
运行名称可包含字母数字字符、短破折号、连字符和下划线。
7. 对于“Read Type（片段类型）”，请选择要执行的测序片段数：
 - **Single Read（单端）** — 执行一个片段，这是较简单、较快的选项。
 - **Paired End（双末端）** — 执行两个片段，这样可始终生成质量更高的数据，并可提供更准确的比对。
8. 输入要在每个片段中执行的循环次数：
标签循环次数没有最大值，但片段循环和标签循环的总次数必须小于夹盒标签上标示的循环次数加 27。

Read 1（片段 1） — 输入循环次数 1–151。

Index 1（标签 1） — 输入标签 1 (i7) 引物的循环次数。对于仅 PhiX 运行，请在两个标签字段中输入 0。

Index 2（标签 2） — 输入标签 2 (i5) 引物的循环次数。

Read 2（片段 2） — 输入最高为 151 的循环次数。此值通常与“Read 1（片段 1）”的值相同。

9. 如果您选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage（Proactive、运行监控和存储）”，请选择 **Choose...（选择...）** 以导入样品表。

NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 会自动根据样品表检测 DRAGEN 版本，并视需要提示您切换版本。系统上必须安装相应的 DRAGEN 版本。有关安装信息，请参见 [软件更新（第 63 页）](#)。

- i** 必须选择 v2 格式的样品表。要创建 v2 格式样品表，请从 BaseSpace Sequence Hub 的 “Instrument Run Setup (仪器运行设置)” 中下载生成的样品表，或者编辑 NextSeq 1000/2000 支持页面上提供的 v2 格式样品表模板。请参见 [V2 格式样品表设置 \(第 73 页\)](#)，了解有关样品表 v2 格式和要求的详细信息。确保样品表中引用的任何文件均位于样品表所在的相同文件夹内。

10. [可选] 输入自定义片段引物和自定义标签引物位置。
有关制备和添加自定义引物的信息，请参见《*NextSeq 1000 和 2000 自定义引物指南*》(文档号 1000000139569)。请务必访问您所用的文库制备试剂盒的兼容产品页面，以确定是否需要 Illumina 自定义引物。
11. [可选] 选择自定义配方。有关详细信息，请参见[暗循环测序 \(第 83 页\)](#)。
12. [可选] 要手动对文库进行变性和稀释，请取消选择 **Denature and Dilute On Board** (在仪器上变性和稀释) 复选框。请参见《*NextSeq 1000 和 2000 变性和稀释文库指南*》(文档号 1000000139235)。默认选择在 NextSeq 1000/2000 Control Software 设置中进行配置。
13. [可选] 要更改输出文件夹，请选择 “Output Folder (输出文件夹)” 字段，并输入新位置。
“Output Folder (输出文件夹)” 字段中会自动填充您的默认设置，除非选择了 “Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive、运行监控和存储)”，否则该字段必填。
14. 选择 **Prep (准备)**。

将耗材装到仪器上

1. 确保在装入流动槽 (灰色拉条已取下) 和稀释好的文库前，已将夹盒解冻并翻转 10 次混匀。
2. 选择 **Load (装入)**。
NextSeq 1000/2000 Control Software 会打开挡板并弹出托盘。
3. 将夹盒放在托盘上，标签朝上，且流动槽在仪器内部。推入夹盒直至其锁定到位。



4. 选择 **Close (关闭)** 以缩回夹盒并关闭挡板。
NextSeq 1000/2000 Control Software 大约会在 3 分钟后显示已扫描耗材的信息。
5. [可选] 选择 **Eject Cartridge (弹出夹盒)** 以取出夹盒。
挡板会在 1 分钟后打开，并随之弹出夹盒。
6. 选择 **Sequence (测序)**。

运行前检查

运行前检查包括仪器检查和接下来的射流检查。射流检查会刺穿夹盒密封纸，导致仪器发出 3 到 4 声“爆裂”声。这属于正常现象。此时试剂便会流过流动槽。

! 一旦开始射流检查，耗材便不能重复使用。

1. 等待 15 分钟左右，直到运行前检查完成。
检查成功完成后，运行便会自动开始。
2. 如果在仪器检查期间出现了错误，请选择 **Retry (重试)** 以重新执行检查。
正在进行检查时，该检查的进度圈将会动态更新。
3. 要对重复出现的错误进行故障诊断，请参见[解决错误消息 \(第 68 页\)](#)。

监控运行进度

1. 当运行进度和指标显示在“Sequencing (测序)”屏幕上时，对它们进行监控。
 - **Estimated run completion (预计运行完成时间)** — 运行完成的预计日期和时间。之前必须已进行过 10 次运行，预计运行完成时间指标才能计算出准确的运行完成时间。
 - **Average %Q30 (Q30 平均百分比)** — Q-score ≥ 30 的碱基检出平均百分比。
 - **Projected Yield (预计产量)** — 运行的预期碱基检出数量。
 - **Total Reads PF (通过过滤的片段总数)** — 通过过滤的双末端 (如适用) 簇的数量 (以百万为单位)。
 - **Real Time Demux (实时文库拆分)** — 当片段 1、标签 1 和标签 2 循环完成后，在片段 2 循环开始时启动的文库拆分的状态。即使未执行标签循环，状态也将显示为“Complete (完成)”。不适用于云模式运行。
 - **Real Time Alignment (实时文库比对)** — 当片段 1、标签 1 和标签 2 循环完成后，在片段 2 循环开始时启动的片段 1 比对的状态。不适用于云模式运行。

第 26 次循环之后 (启动运行后大约 6 小时) 会出现 Q30 和产量指标。
2. 要监控运行流程，请选择控制软件菜单，然后选择 **Process Management (流程管理)**。
3. 要取消运行，请选择 **End Run (结束运行)**。请参见[取消运行 \(第 69 页\)](#)，了解有关取消运行的详细信息。
4. 从仪器中取出耗材。请于 3 天之内从仪器中取出夹盒。

取出耗材

1. 测序完成后，选择 **Eject Cartridge (弹出夹盒)**。
软件会从仪器中弹出用过的夹盒。
2. 从托盘中取出夹盒。
3. 从夹盒中取出流动槽。
4. 根据您所在地区的适用标准弃置流动槽，其内含有电子元件。

5. [可选] 将对应区域（如水槽或危险液体废弃物容器）上夹盒侧面 Illumina 徽标下的排放塞水平或向下拔出以取下排放塞。根据您所在地区的适用标准排出废试剂。如果未启用自动试剂清除功能，排放时间将取决于夹盒大小。

! 这组试剂含有潜在危险化学品。吸入、摄取、皮肤接触和眼睛接触都会对身体造成伤害。请穿戴防护装备，包括适合的护目用具、手套和实验室工作服以避免伤害。将废试剂作为化学废物处理，并根据适用的区域、国家和当地法律及法规丢弃。有关环境、健康和安全的更多信息，请参见 support.illumina.com/sds.html 中的 SDS。

6. 弃置试剂夹盒。
不需要执行运行后清洗，因为射流会随夹盒一起丢弃。
7. 选择 **Close Door**（关闭仓门），重新装入托盘并返回“Home（主页）”界面。
软件会自动重新装入托盘，并且传感器会确认夹盒已取出。

清洁夹盒托盘

仅当试剂渗漏到夹盒托盘上时，才需要清洁夹盒托盘。

1. 从仪器中取出夹盒。
2. 戴上一副新的无粉手套，并穿戴任何其他防护装备。
3. 在抹布上喷洒 10% 漂白剂。
4. 用抹布擦拭夹盒托盘，然后立即使用强力擦拭纸擦除漂白剂。
如果不立即擦除，漂白剂会弄脏夹盒托盘。
5. 在夹盒托盘上喷洒 70% 乙醇溶液，然后立即使用强力擦拭纸将其擦除。
6. 将夹盒托盘放回装入位置。

测序输出

本章描述了用于执行碱基检出、分配质量分值以及输出数据的 Real-Time Analysis 软件。您可在此了解不同的输出文件类型以及这些文件在运行之后的存储位置。

Real-Time Analysis 概述

NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统会在仪器的计算引擎 (CE) 上运行 RTA3，这是 Real-Time Analysis 软件的一种实施。RTA3 会从自相机接收的图像中提取强度、执行碱基检出、为碱基检出分配质量分值、比对 PhiX，以及在 InterOp 文件中报告数据，供您在仪器控制软件中查看。

为优化处理时间，RTA3 会将信息存储在内存中。RTA3 一旦被终止，处理过程便无法恢复，并且正在处理的运行数据在内存中也将丢失。

RTA3 输入

RTA3 需要在本地系统内存中包含小区图像才能进行处理。RTA3 从控制软件接收运行信息和命令。

RTA3 输出

每个颜色通道的图像在内存中均以小区的形式传递给 RTA3。RTA3 根据这些图像输出一组带有质量分值的碱基检出文件和过滤文件。其他所有输出均为支持输出文件。

文件类型	描述
碱基检出文件	所分析的每个小区都包含在一个串联碱基检出 (*.cbcl) 文件中。来自同一泳道和表面的小区会累积到每个泳道和表面对应的 1 个 *.cbcl 文件中。
过滤文件	每个小区生成一个指定簇是否通过过滤的过滤文件 (*.filter)。
簇位置文件	簇位置 (*.locs) 文件包含小区中每个簇的 X、Y 坐标。每次运行都会生成簇位置文件。

输出文件用于 DRAGEN 和 BaseSpace Sequence Hub 中的下游分析。

错误处理

RTA3 会创建日志文件并将其写入 Logs 文件夹。错误以 *.log 文件格式记录在文本文件中。

在处理结束时，以下日志文件会传送至最终输出目的地：

info_00000.log 汇总了重要的运行事件。

error_00000.log 列出在运行期间发生的错误。

warning_00000.log 列出在运行期间发生的警告。

流动槽小区

小区指流动槽上的小成像区域。相机会为每个小区拍摄一个图像。

NextSeq 1000/2000 P2 流动槽共有 132 个小区。NextSeq 1000/2000 P3 流动槽共有 264 个小区。

表 5 流动槽小区

流动槽组件	NextSeq 1000/2000 P2 流动槽	NextSeq 1000/2000 P3 流动槽	描述
泳道	1	2	泳道在光学上是不同的，但从射流方面而言，并不是不同的通道。
表面	2	2	P2 和 P3 流动槽会在顶面和底面两个表面成像。小区的顶面先成像。
每泳道测绘带数	6	6	测绘带是流动槽泳道中的一个列。
每测绘带小区数	11	11	小区是测绘带的一部分，描述流动槽上的一个成像区域。
生成的小区总计	132	264	泳道数 × 表面数 × 测绘带数 × 每测绘带小区数 = 小区总数。

小区命名

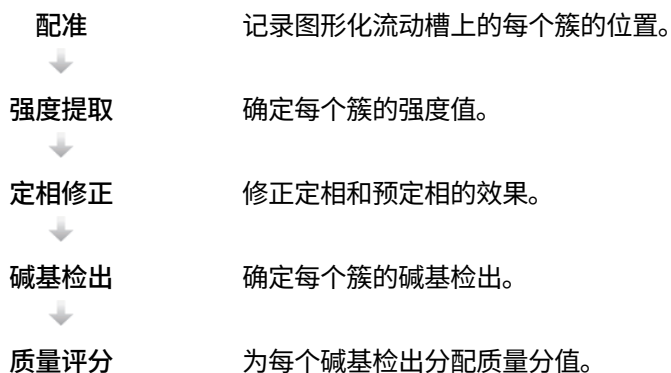
小区名称是一个四位数的数字，代表小区在流动槽上的位置。例如，小区名称 1205 表示小区是位于顶面 2 号测绘带上的 05 号小区。

第一位数代表表面：1 代表顶面，2 代表底面。

第二位数代表测绘带编号：1、2、3、4、5 或 6。

最后两位数代表小区编号。对于 1-4 号测绘带，从流动槽的出口端向入口端进行编号，出口端为 01，入口端为 11。对于 5-6 号测绘带，从入口端向出口端进行编号，入口端为 01，出口端为 11。

Real-Time Analysis 工作流程



配准

配准会将图像与图形化流动槽上旋转正方形阵列的纳米孔进行比对。由于纳米孔呈有序排列，因此系统可预先确定小区中每个簇的 X 和 Y 坐标。簇位置将写入每次运行对应的一个簇位置 (s.locs) 文件。

如果某次循环中有任何图像的配准失败，则在该循环中不会为该小区生成碱基检出。使用 Sequencing Analysis Viewer 可识别配准失败的图像。

强度提取

进行配准之后，强度提取便会计算给定图像中每个纳米孔的强度值。如果配准失败，则无法提取相应小区的强度。

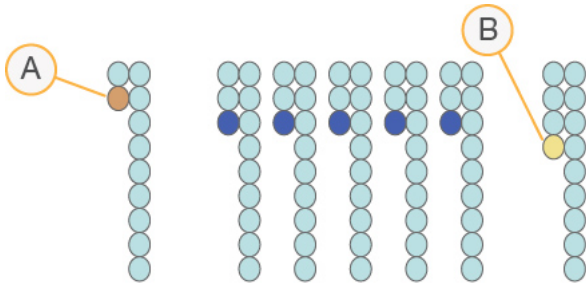
定相修正

在测序反应期间，簇中的每个 DNA 链在每次循环中会扩展一个碱基。定相和预定相在 DNA 链与当前结合循环异相时发生。

当碱基落在后面时，便会发生定相。

当碱基跳到前面时，便会发生预定相。

图 5 定相和预定相



- A. 具有定相碱基的片段
- B. 具有预定相碱基的片段

RTA3 会修正定相和预定相的效果，从而尽可能提高整个运行期间每次循环的数据质量。

碱基检出

碱基检出用于确定特定循环中给定小区的每个簇的碱基（A、C、G 或 T）。NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统使用双通道测序，只需要两个图像即可对四种 DNA 碱基的数据进行编码，一个图像来自绿色通道，一个图像来自蓝色通道。

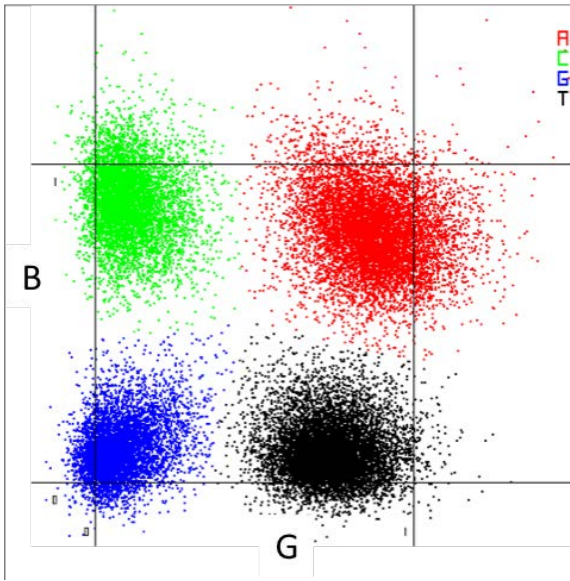
无检出情况标识为 N。当簇未通过过滤、配准失败或簇移出图像时便会发生无检出。

系统会从绿色和蓝色图像提取每个簇的强度并将它们相互比较，由此产生四个不同的群体。每个群体对应于一个碱基。碱基检出流程决定了每个簇属于哪个群体。

表 6 双通道测序的碱基检出

碱基	绿色通道	蓝色通道	结果
A	1 (存在)	1 (存在)	在绿色和蓝色通道都显示强度的簇。
C	0 (不存在)	1 (存在)	只在蓝色通道显示强度的簇。
G	0 (不存在)	0 (不存在)	在已知位置上未显示强度的簇。
T	1 (存在)	0 (不存在)	只在绿色通道中显示强度的簇。

图 6 簇强度展示图



i | 各个簇的颜色与 Sequence Analysis Viewer (SAV) 和 BaseSpace Sequence Hub 的 “Run Data by Cycle (按循环查看运行数据)” 中的碱基百分比图相关，与绿色和蓝色通道并不相关。

簇通过过滤

在运行期间，RTA3 会过滤原始数据，删除任何不符合数据质量阈值的片段，并会去除重叠和低质量的簇。

对于双通道分析，RTA3 使用基于群体的系统确定碱基检出的纯度（强度纯度度量）。如果在前 25 次循环中，纯度小于固定阈值的碱基检出不超过 1 个，簇将通过过滤 (PF)。包括在内时，系统会于第 26 次循环在一部分小区上对通过过滤的簇执行 PhiX 比对。未通过过滤的簇不会检出碱基，也不会进行比对。

质量分值

质量分值 (Q-score) 是对碱基检出不正确概率的预测。Q-score 越高，表示碱基检出的质量越高，正确率也越高。确定 Q-score 之后，结果会记录在碱基检出 (*.cbcl) 文件中。

Q-score 简明地表达了小错误概率。质量分值以 $Q(X)$ 表示，其中 X 是分值。下表显示了质量分值与错误概率之间的关系。

Q-Score $Q(X)$	错误概率
Q40	0.0001 (万分之一)
Q30	0.001 (千分之一)
Q20	0.01 (百分之一)
Q10	0.1 (十分之一)

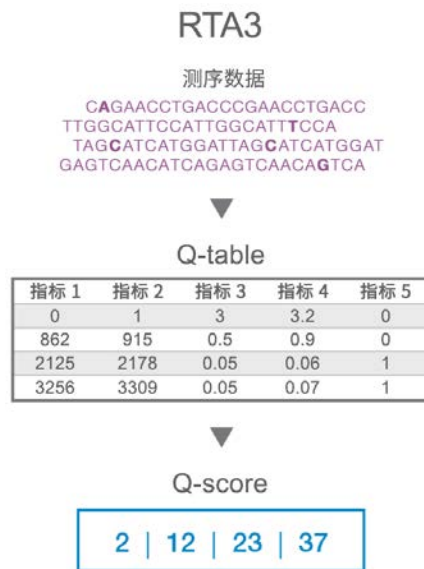
质量评分和报告

质量评分会计算每个碱基检出的一组预测因素，然后使用预测因素值在质量表中查找 Q-score。创建质量表的目的是根据特定的测序平台和化学反应版本配置为生成的运行提供最准确的质量预测。

i | 质量评分基于 Phred 算法的修改版本计算。

为了生成 NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统的 Q-table，根据这些特定预测功能的簇化确定了三组碱基检出。确定碱基检出组后，根据经验为这三个组中的每个组计算了平均错误率，并在该组相关的预测功能旁边的 Q-table 中记录了对应的 Q-score。因此，采用 RTA3 时只能得出三个 Q-score，这些 Q-score 表示相应组的平均错误率（[采用 RTA3 的简化质量评分 \(第 51 页\)](#)）。总体而言，这可使质量评分得到简化，但准确性却很高。质量表中的三个组对应于低品质 (< Q15)、中等品质 (~Q20) 和高品质 (> Q30) 的碱基检出，并分别被分配了特定的分值 12、23 和 37。此外，为所有无检出均分配了一个空分值 2。此 Q-score 报告模型可降低存储空间和带宽要求，且不影响准确性或性能。

图 7 采用 RTA3 的简化质量评分



测序输出文件

文件类型	文件描述、位置和名称
串联碱基检出文件	<p>已分析的每个簇都会纳入一个串联碱基检出文件，并按循环、泳道和表面累积到一个文件中。累积的文件包含每个簇的串联碱基检出以及已编码的质量分值。BaseSpace Sequence Hub 或 bcl2fastq2 会使用串联碱基检出文件。</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1</p> <p>L[泳道]_[表面].cbcl，例如 L001_1.cbcl</p>

文件类型	文件描述、位置和名称
簇位置文件	对于每个流动槽，二进制簇位置文件包含小区中簇的 X 坐标和 Y 坐标。与流动槽的纳米孔布局匹配的六边形布局预定义了坐标。 Data/Intensities s_[泳道].locs
过滤文件	过滤文件指定簇是否通过过滤。过滤文件在第 26 次循环时使用前 25 次循环的数据生成。对于每个小区，会生成一个过滤文件。 Data/Intensities/BaseCalls/L001 s_[泳道]_[小区].filter
InterOp 文件	可以在仪器上（借助仪器控制软件）或仪器外（在 SAV 或 BaseSpace Sequence Hub 中）查看二进制报告文件。InterOp 文件会在整个运行期间加以更新。 InterOp 文件夹
运行信息文件	列出运行名称、每个片段中的循环次数、片段是否为标签片段以及流动槽上测绘带和小区的数量。运行信息文件创建于运行开始时。 [根文件夹], RunInfo.xml

DRAGEN 二级分析输出文件

DRAGEN Bio-IT Platform 使用以下其中一个分析管道，在仪器内进一步分析测序输出。

- BCL Convert
- Germline
- RNA
- Enrichment
- Single Cell RNA
- DNA Amplicon

本部分提供了有关每个 DRAGEN 管道的信息，包括输出文件信息。除了生成专用于每个管道的文件以外，DRAGEN 还会在 <样品名称>.metrics.json 文件和 [DRAGEN BCL Convert 管道（第 57 页）](#) 部分所述的报告中提供根据分析得出的指标。有关 DRAGEN 的详细信息，请参见 [DRAGEN Bio-IT Platform 支持网站页面](#)。

所有 DRAGEN 管道都支持解压缩输入 BCL 文件和压缩输出 BAM/CRAM 文件。

输出文件注意事项：

- 对于运行仪器内分析的 Germline、RNA、Enrichment 和 DNA Amplicon 管道，如果选择了“Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive、运行监控和存储)”，BAM 文件将不会上载到 BaseSpace Sequence Hub。

DRAGEN Enrichment 管道

DRAGEN Enrichment 管道支持以下功能。如果使用的是 DRAGEN 3.7 或更高版本，生殖细胞和体细胞（仅限肿瘤）两种模式都受支持。

- 样品文库拆分
- 映射和比对，包括排序和重复标记
- 小型变异检出
- 结构变异检出

要执行变异检出，样品表中必须包含 *.bed 文件，或者必须在 BaseSpace Sequence Hub 的“Instrument Run Setup（仪器运行设置）”中指定 *.bed 文件。只有双末端片段和胚系模式会生成结构变异检出。

如果使用的是 DRAGEN Enrichment 3.8 或更高版本，则可以输入噪声基线文件，以提高体细胞模式下的性能。请参见 [导入噪声基线文件（第 15 页）](#)。

该管道会生成下列输出文件。

组件	类型	输出文件名
映射/比对	BAM 或 CRAM	· <样品名>.bam, 或 · <样品名>.cram
小型变异检出	VCF 和 gVCF*	· <样品名>.hard-filtered.gvcf.gz · <样品名>.hard-filtered.vcf.gz
结构变异检出	VCF	· <样品名>.sv.vcf.gz

* gVCF 输出文件仅适用于生殖细胞模式。

DRAGEN Germline 管道

DRAGEN Germline 管道支持以下功能：

- 样品文库拆分
- 映射和比对，包括排序和重复标记
- 小型变异检出
- 双末端片段的结构变异检出
- 人类基因组的拷贝数变异检出
- 人类基因组的重复扩张
- 人类基因组的纯合区域
- [DRAGEN v3.8 或更高版本] CYP2D6 检测

只有双末端片段会生成结构变异检出。

该管道会生成下列输出文件。

组件	类型	输出文件名
映射/比对	BAM 或 CRAM	· <样品名>.bam, 或 · <样品名>.cram
小型变异检出	VCF 和 gVCF	· <样品名>.hard-filtered.gvcf.gz · <样品名>.hard-filtered.vcf.gz
结构变异检出器	VCF	· <样品名>.sv.vcf.gz
拷贝数变异	VCF	· <样品名>.cnv.vcf.gz
重复扩张	VCF	· <样品名>.repeats.vcf.gz
纯合区域	CSV 和 BED	· <样品名>.roh_metrics.csv · <样品名>.roh.bed
CYP2D6 检测	TSV	· <样品名>.cyp2d6.tsv

DRAGEN DNA Amplicon 管道

DRAGEN 管道支持以下功能：

- 样品文库拆分
- 映射和比对，包括排序和重复标记
- 胚系变异或体细胞变异模式下的变异检出

要执行变异检出，样品表中必须包含 *.bed 文件，或者必须在 BaseSpace Sequence Hub 的 “Instrument Run Setup (仪器运行设置)” 中指定 *.bed 文件。

该管道会生成下列输出文件。

组件	类型	输出文件名
映射/比对	BAM 或 CRAM	· <样品名>.bam, 或 · <样品名>.cram
小型变异检出	VCF 和 gVCF*	· <样品名>.hard-filtered.gvcf.gz · <样品名>.hard-filtered.vcf.gz

*gVCF 输出文件仅在胚系变异模式下可用。

DRAGEN RNA 管道

DRAGEN RNA 管道支持以下功能

- 样品文库拆分
- 映射和比对，包括排序和重复标记
- 基因融合检测

- 转录本定量
- [DRAGEN v3.8 或更高版本] 差异基因表达

要生成输出文件，请在样品表中指定 GTF 文件，或确保默认的 `genes.gtf.gz` 存在参考基因组。

该管道会生成下列输出文件。

组件	类型	输出文件名	描述
映射/比对	BAM 或 CRAM	<ul style="list-style-type: none"> · <样品名>.bam, 或 · <样品名>.cram 	符合 SAM 规格的比对输出。
基因融合检测	纯文本	<ul style="list-style-type: none"> · <样品名>.fusion_candidates.preliminary 	<ul style="list-style-type: none"> · 应用过滤器之前的融合候选。
		<ul style="list-style-type: none"> · <样品名>.fusion_candidates.final 	<ul style="list-style-type: none"> · 应用过滤器之后的融合候选。
转录本定量	纯文本	<ul style="list-style-type: none"> · sample_name.quant.genes.sf 	<ul style="list-style-type: none"> · 基因层面的转录本定量结果。
		<ul style="list-style-type: none"> · sample_name.quant.sf 	<ul style="list-style-type: none"> · 所有转录本定量结果。
差异表达	PNG	请参见下面的差异表达输出文件表。	要生成输出文件，必须在样品表中设置比较品。

如果启用了差异表达，将输出以下文件。

文件名	描述
Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv	包含差异表达分析指标。
Control_vs_Comparison.genes.counts.csv	描述对照组和比较组中每个样品的每个基因对应的片段数量。
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	对照组和比较组中各样品表达有差异的基因的表达热图。热图只显示表达有差异的基因，调整后的 P-value < .05。如果表达有差异的基因数超过 30 个，则仅使用前 30 个表达有差异的基因。如果 DESeq1 未能汇集或者没有表达有差异的基因，则不会生成该文件。

文件名	描述
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	包含作为平均信号强度因素的基因表达率的变化。为了显示两个样品中的测量值之间的差异，该图将数据转换为 M（对数比）和 A（平均值）标度，然后绘制值。MA 图显示由给定变量引起超过所有样品标准化计数平均值的 log ₂ 差异倍数。如果调整后的 P-value 小于 0.1，则点为红色。窗口外的点绘制为开口三角形。正三角形表示正对数差异倍数。倒三角形表示负对数差异倍数。
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	该图显示说明最大变化的前两个主要部分。
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	包含 DESeq2 结果，描述了每个基因的平均表达、log ₂ （差异倍数）、log ₂ 的标准误差、P-value、调整后的 P-value 和表达状态。
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	包含 DESeq2 计算出的正则化对数转换计数。

DRAGEN Single Cell RNA 管道

DRAGEN 支持以下功能：

- 样品文库拆分
- 映射和比对，包括排序和重复标记
- 细胞和基因分类

要生成输出文件，请在样品表中指定 GTF 文件，或确保默认的 `genes.gtf.gz` 存在参考基因组。

该管道会生成下列输出文件。

组件	类型	输出文件名
映射/比对	BAM 或 CRAM	· <样品名>.bam, 或 · <样品名>.cram
细胞/基因分类	TSV、CSV 和 MTX	· <样品名>.scRNA.barcodeSummary.tsv · <样品名>.scRNA.genes.tsv · <样品名>.scRNA.matrix.mtx
分析报告	HTML	<样品名>.dragen.scrna-report.*.html

DRAGEN BCL Convert 管道

DRAGEN BCL Convert 管道使用测序运行生成的 BCL 数据和样品表信息来输出每个样品的 FASTQ 文件。FASTQ 文件名为 <样品名>.fastq.gz。

该管道会生成下列报告。

组件	类型	输出文件名
文库拆分	CSV	· Demultiplex_Stats.csv
接头指标	CSV	· Adapter_Metrics.csv
标签跳跃	CSV	· Index_Hopping_Counts.csv
高计数未知条形码	CSV	· Top_Unknown_Barcodes.csv

文库拆分统计报告

文库拆分统计报告包含有关被分配给样品表中每个样品的通过过滤片段的数量信息。未明确与某个样品关联的所有片段都被划分到未确定类别。针对分配给每个样品的通过过滤 (PF) 的片段，报告中还包含有关片段内碱基的质量分值信息。

包含的信息如下。

指标	描述
Lane (泳道)	进行样品测序的流动槽泳道。
SampleID (样品 ID)	取自样品表的样品 ID。如果片段未对应于某个样品，该字段会显示为 undetermined(未确定)。
Index (标签)	样品表中标签片段 1 和标签片段 2 的串联，以连字符分隔。如果片段未对应于某个样品，该字段会显示为 undetermined(未确定)。
# Reads (片段数量)	指定泳道中样品的已拆分文库的 PF 片段数量。
# Perfect Index Reads (完全匹配的标签片段数)	与样品表中指定的组合标签序列完全匹配的片段数量。
# One Mismatch Index Reads (一处不匹配的标签片段数)	与样品表中指定的组合标签序列有一处偏差的片段数量。
# of \geq Q30 Bases (PF) (\geq Q30 碱基数 (PF))	与通过 Q30 质量阈值的片段对应的碱基数 (包括接头)。
Mean Quality Score (PF) (平均质量分值 (PF))	与指定泳道中样品对应的片段的平均质量分值。该值包括接头碱基数。

接头指标报告

接头指标文件包含与每个片段关联的接头数和样品碱基数。

包含的信息如下。

指标	描述
Lane (泳道)	进行样品测序的流动槽泳道。
Sample_ID (样品 ID)	取自样品表的样品 ID。如果片段未对应于某个样品，该字段会显示为 <code>undetermined</code> (未确定)。
index (标签)	取自样品表的标签 1 序列。如果样品表中未指定该标签或者样品 ID 值为 <code>undetermined</code> (未确定)，该字段将为空。
index2 (标签 2)	取自样品表的标签 2 序列。如果样品表中未指定标签 2 或者样品 ID 值为 <code>undetermined</code> (未确定)，该字段将为空。
R1_AdapterBases	与样品表中的 AdapterRead1 对应的碱基数。
R1_SampleBases	从对应泳道和样品的片段 1 裁剪掉或遮盖住的碱基数。
R2_AdapterBases	与样品表中的 AdapterRead2 对应的碱基数。
R2_SampleBases	从对应泳道和样品的片段 2 裁剪掉或遮盖住的碱基数。
# Reads (片段数量)	指定泳道中的样品的片段数量。

标签跳跃计数报告

标签跳跃计数报告包含双标签运行的每个预期且已跳跃标签的片段数。报告中只纳入了每个泳道的唯一双标签，在这些泳道中，任一标签中均未检测到条形码冲突。要生成泳道的标签跳跃指标，每个标签中的每对条目都必须具有至少 $2N + 1$ 的汉明距离，其中 N 代表为该标签所指定的条形码不匹配容差。

包含的信息如下。

对于非标签运行、单标签运行或不含唯一双标签的泳道，该文件仅包含标题。

指标	描述
Lane (泳道)	进行样品测序的流动槽泳道。
# Reads (片段数量)	指定泳道中的样品的片段数量。
SampleID (样品 ID)	取自样品表的样品 ID。如果片段未对应于某个样品，该字段会显示为 <code>undetermined</code> (未确定)。

指标	描述
index (标签)	取自样品表的标签 1 序列。如果片段为单端片段或者样品 ID 值为 undetermined (未确定), 该字段将为空。
index2 (标签 2)	取自样品表的标签 2 序列。如果片段为单端片段或者样品 ID 值为 undetermined (未确定), 该字段将为空。

未知条形码排名报告

未知条形码排名报告根据允许的不匹配项数按泳道列出样品表中未标识的前 100 个标签或标签对。如果有多个标签值排在标签计数的第 100 名, 则计数相同的所有标签值都会输出为第 100 项。

包含的信息如下:

指标	描述
Lane (泳道)	进行样品测序的流动槽泳道。
index (标签)	标签片段 1 中每个未知标签的序列。如果未发现未知标签, 该字段将为空。
index2 (标签 2)	标签片段 2 中每个未知标签的序列。如果运行为单端或者未发现未知标签, 该字段将为空。
# Reads (片段数量)	指定泳道中的样品的片段数量。

Illumina DRAGEN 质量控制报告

对于所有管道, DRAGEN FastQC 默认都会生成质量控制图。累积的质量控制结果存储在 AggregatedFastqcMetrics 文件夹中, 每个样品的结果存储在 <样品名> 文件夹中。

如果样品数大于 512, 则不生成 QC 报告。

提供以下质量控制图。

质量控制图	描述
adapter_content	每个碱基对的序列的百分比。
positional_mean_quality	每个片段位置的平均 Phred 碱基质量分值。
gc_content	每个测序片段的 GC 含量百分比。
positional_quality.read_1	包含特定核苷酸且位于片段 1 中给定位置的碱基的平均 Phred 质量值。
gc_quality	
positional_quality.read_2	包含特定核苷酸且位于片段 2 中给定位置的碱基的平均 Phred 质量分值。

质量控制图	描述
n_content	
read_length	每个片段的序列长度。
positional_base_content.read_1	位于片段 1 中给定位置的每个特定核苷酸的碱基数。
read_quality	每个测序片的平均 Phred 质量分值。
positional_base_content.read_2	位于片段 2 中给定位置的每个特定核苷酸的碱基数。

DRAGEN 二级分析输出文件夹结构

DRAGEN 默认会在“Settings（设置）”选项卡中所选的输出文件夹中生成输出文件。对于每个工作流程，DRAGEN 都会在 `report.html` 文件中生成摘要报告。

📁 Data

📄 report.html

📄 report_files

📁 AggregateFastQCPlots

📄 *.png

📄 *stderr_.txt

📄 *stdout_.txt

📄 dragen_prev_48_hrs.log

📄 dlm_prev_48_hrs.log

📄 SampleSheet.csv

📄 运行输入文件 (例如 BED、GTF 文件)

📁 sample_name

📁 enrich_caller、germline_seq、dna_amplicon_seq、ma_seq 或 scrna_seq

📁 sample_name

📄 *.png

📄 dragen_*.log

📄 sample_name.*.metrics.csv

📄 [DNA] sample_name.*.vcf.gz

📄 [DNA] sample_name.*.gvcf.gz—对 DRAGEN Bio-IT Platform Amplicon（体细胞）管道不可用。

📄 sample_name.*.bam 或 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 — 仅当 KeepFastq 设置为 true 时可用。

- 📄 *.fastq.gz

📁 ora_fastq — 仅当 FastqCompressionFormat 设置为 dragen 时可用。

- 📄 *.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 — 仅针对双末端片段。

0001

dataset.json

0002

dataset.json

Adapter_Metrics.csv

Demultiplex_Stats.csv

Index_Hopping_Counts.csv

Read1Metrics — 仅针对双末端片段。

Adapter_Metrics.csv

Index_Hopping_Counts.csv

维护

本章描述了维护系统正常运行所必需的程序。您可在此了解如何安装软件更新、更换空气过滤器以及执行其他定期维护程序。让控制软件保持最新版本可确保您的系统安装了最新的错误修复和功能，能够以最佳状态运行。

清理硬盘驱动器空间

测序运行需要大约 200 GB 的本地硬盘驱动器空间。空间不足时，会显示警告通知。按照下面的步骤，通过从临时运行文件夹中删除已完成的运行和已安装的参考基因组来清理空间。

! 仅通过 NextSeq 1000/2000 Control Software 删除运行，不要通过操作系统手动删除。手动删除运行可能会对控制软件造成负面影响。

1. 从控制软件菜单中选择 **Disk Management (磁盘管理)**。
“Disk Management (磁盘管理)” 屏幕随即显示，其中会列出已保存到本地硬盘驱动器的运行和参考基因组。
2. 针对要删除的运行，选择 **Delete Run (删除运行)**。
删除运行将删除本地运行文件夹。而作为运行文件夹副本的输出文件夹会保留。
3. 在对话框中，选择 **Yes, Delete Run (是，删除运行)** 确认删除运行。
4. 对要删除的每个运行重复步骤 2 和 3。
5. 针对要删除的基因组，选择 **Delete Genome (删除基因组)**。
6. 在对话框中，选择 **Yes, Delete Genome (是，删除基因组)**。
7. 对要删除的每个基因组重复步骤 5 和 6。
8. 完成后，关闭 “Disk Management (磁盘管理)” 以返回 “Home (主页)” 界面。

软件更新

更新软件可确保您的系统具有最新的功能和修复补丁。软件更新捆绑到一个系统套件中，其中包含下列软件：

- NextSeq 1000/2000 Control Software
- NextSeq 1000/2000 配方
- Universal Copy Service
- Real-Time Analysis


i 系统套件中不含 DRAGEN 模块。请根据需要单独安装这些模块。从支持页面访问 DRAGEN 模块软件。

系统配置为自动或手动下载软件更新：

- **Automatic updates (自动更新)** — 自动从 BaseSpace Sequence Hub 下载更新供您安装。此选项需要互联网连接，但不需要 BaseSpace Sequence Hub 帐户。
- **Manual updates (手动更新)** — 从 Web 手动下载更新，保存在本地或便携式驱动器上，然后从保存的位置安装。此选项不需要仪器连接互联网。


安装自动软件更新

1. 确保没有正在进行的测序运行或仪器内二级分析。
2. 登录到 ilmnadmin 帐户。
3. 从控制软件菜单中选择 **Software Update (软件更新)**。
配置为自动更新的系统在软件更新可用时显示警报。
4. 要检查更新，请选择 **Check Online for Software Update (在线检查软件更新)**。
5. 选择 **Update Now (立即更新)** 下载软件的新版本。
下载完成后，控制软件即会关闭，安装向导将会显示。
控制软件会自动重新启动。重新启动后，系统会自动进行所有固件更新。

 安装开始后，将无法取消更新。您只能在下载期间取消更新。

安装手动软件更新

1. 登录到 ilmnadmin 帐户。
2. 确保没有正在进行的测序运行或仪器内二级分析。
3. 当软件更新可用时，从 [NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统支持页面](#) 下载套件安装程序 (*.tar.gz)。将安装程序保存到本地或便携式驱动器。
4. 如果之前是将安装程序保存到便携式驱动器，请将该驱动器插入 USB 3.0 端口，仪器侧面和背面均有此类端口。
5. 在控制软件中，从控制软件菜单中选择 **Software Update (软件更新)**。
6. 选择 **Choose... (选择...)** 以导航到安装程序。
7. 选择 **Update Now (立即更新)** 开始安装。
安装期间，控制软件会显示繁忙指示符。
控制软件会自动重新启动。重新启动后，系统会自动进行所有固件更新。

 安装开始后，将无法取消更新。您只能在下载期间取消更新。

DRAGEN 工作流程和许可证更新

只有系统管理员可以安装 DRAGEN 工作流程和续订 DRAGEN 许可证。

在线续订 DRAGEN 许可证

如果 NextSeq 1000/2000 已连接互联网，请按以下方式更新 DRAGEN Bio-IT Platform 许可证。

1. 联系 Illumina 技术支持部门获取新许可证密钥。
2. 等待 24 个小时，让系统自动更新许可证，或按以下方式立即更新许可证。
 - a. 选择控制软件菜单，然后选择 **DRAGEN**。
 - b. 选择 **Check Online (在线检查)** 检查是否有新的 DRAGEN 许可证密钥。
 - c. 如果有，请选择 **Update (更新)**。

离线续订 DRAGEN 许可证

如果 NextSeq 1000/2000 未连接互联网，请按以下方式更新 DRAGEN Bio-IT Platform 许可证。

1. 联系 Illumina 技术支持部门获取新许可证密钥。将 `license.zip` 文件保存到本地或便携式驱动器。
2. 如果之前是将 *.zip 文件保存到便携式驱动器，请将该驱动器插入 USB 3.0 端口，仪器侧面和背面均有此类端口。视需要轻轻移动仪器，以便接触到背面。
3. 选择控制软件菜单，然后选择 **DRAGEN**。
4. 选择 **Choose (选择)** 导航到该 *.zip 文件，然后选择 **Open (打开)**。

在线安装 DRAGEN 工作流程

如果 NextSeq 1000/2000 已连接互联网，则可以在 NextSeq 1000/2000 Control Software 中直接安装 DRAGEN 工作流程。只有 NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 支持在线安装 DRAGEN 工作流程。

1. 选择控制软件菜单，然后选择 **Process Management (流程管理)**。
2. 确保没有正在进行的测序运行或仪器内二级分析。
3. 选择控制软件菜单，然后选择 **DRAGEN**。
“Version (版本)” 下的 “Available Workflows (可用工作流程)” 部分列出了系统上当前安装的工作流程。
4. 要在 NextSeq 1000/2000 Control Software 中安装 DRAGEN 工作流程，请选择 **Check Online (在线检查)**。
并非所有 DRAGEN 版本和工作流程都支持在线安装。对于其他工作流程，请通过离线方式安装。
5. 选中要安装的工作流程对应的复选框。请务必先安装最新版本的 BCL Convert (如果未安装)。
您可以在发行说明中查看有关工作流程最新版本的信息。
6. 选择 **Install (安装)** 开始安装。
7. 输入系统密码 `ilmnadmin`，然后选择 **Authenticate (身份验证)**。

离线安装 DRAGEN 工作流程

1. 当有可用的 DRAGEN 工作流程更新时，从 [DRAGEN 支持页面](#) 下载安装程序 (*.tar.gz)。将安装程序保存到本地或便携式驱动器。
2. 如果之前是将安装程序保存到便携式驱动器，请将该驱动器插入 USB 3.0 端口，仪器侧面和背面均有此类端口。视需要轻轻移动仪器，以便接触到背面。
3. 选择控制软件菜单，然后选择 **Process Management (流程管理)**。
4. 确保没有正在进行的测序运行或仪器内二级分析。
5. 选择控制软件菜单，然后选择 **DRAGEN**。
6. 在“Version (版本)”下，选择 **Browse for New Version (浏览新版本)** 以导航到安装程序。
7. 选择 **Install (安装)** 开始安装。
8. 输入系统密码 ilmnadmin，然后选择 **Authenticate (身份验证)**。

更换空气过滤器

每 6 个月按照以下说明更换一次过期的空气过滤器。

空气过滤器是个一次性方盒，它盖住了仪器右侧的风扇，可确保冷却功能正常并防止污物进入系统。仪器在交付时预装了一个空气过滤器，并随附了一个备用空气过滤器。仪器保修合同有效期内可提供额外的备用空气过滤器，您也可向 Illumina 另行购买。

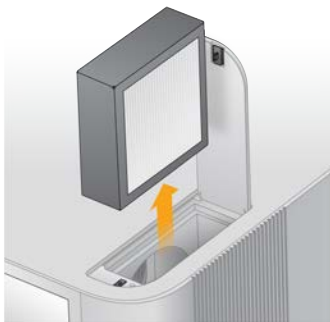
1. 在仪器顶部，如下图所示按压顶部面板的右侧使其松脱。



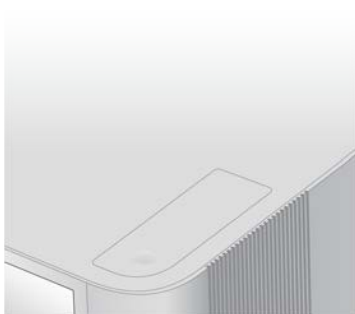
2. 打开面板。



3. 按压以弹出空气过滤器盒，从面板中间取下并丢弃。



4. 将新的空气过滤器插入插槽中，然后按压使其固定。
5. 关上顶部面板并按压到位。



6. 将仪器移回原来的位置。

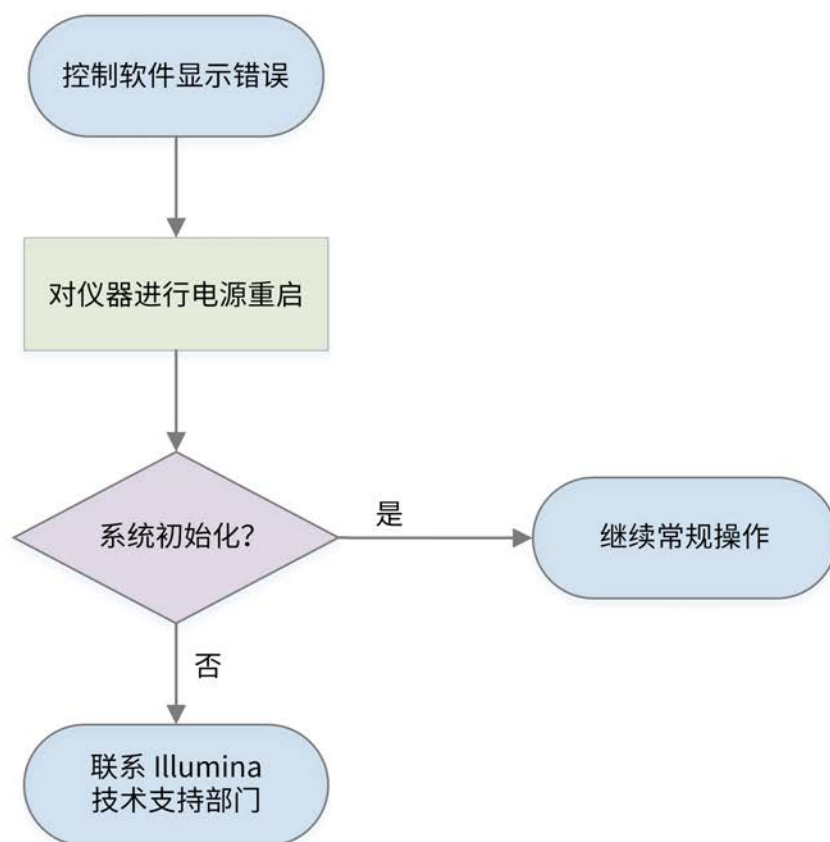
故障诊断

本章提供了取消运行、对仪器进行电源重启以及其他故障诊断程序的逐步说明。

解决错误消息

本附录提供各种故障诊断步骤的详细说明。下面的流程图概述了对错误消息进行故障诊断的过程，这些消息出现于初始化、运行设置或测序期间，并且无法通过重试予以解决。

许多错误都可通过电源重启（关闭仪器，然后将其重新启动）来解决。有关电源重启的详细信息，请参见[对仪器进行电源重启](#)（第 70 页）。



重新存放耗材

如果在射流检查前的仪器运行前检查期间，仪器发生错误，请按照下面的说明存储已解冻的夹盒和流动槽。

1. 将流动槽与夹盒分离。
2. 从槽中取出并丢弃稀释后的文库（最多约为 18 微升）。

- !** 为下一次运行制备相同文库的新鲜稀释液，以免样品与槽中残留的文库发生交叉污染。
- 将夹盒置于 2°C 到 8°C 的存储环境中，使标签朝上，确保所有侧面的空气流通。
请勿超过 72 小时。如果夹盒已在冰箱中过夜解冻 12 小时，则存放时间不得超过 60 小时。
 - 将流动槽放回含有干燥剂的原始铝箔包装。
 - 用胶带将铝箔包装封好，然后置于 2°C 到 8°C 的存储环境中。
请勿超过 72 小时。

取消运行

- 选择 **End Run (结束运行)**。
- 要自动清除试剂夹盒，请选中 **Purge Reagent Cartridge (清除试剂夹盒)** 复选框。
默认选择在 NextSeq 1000/2000 Control Software 设置中进行配置。
- 选择 **Yes, end the sequencing run (是，结束测序运行)**。
取消运行操作不可逆。在运行前检查中的仪器检查之后，软件无法恢复运行，并且耗材不能重复使用。
- 选择 **Eject Cartridge (弹出夹盒)** 打开挡板并弹出托盘。
- 从托盘中取出夹盒。
- 根据取消的时间，选择存储或弃置夹盒：

情况	实例
您是在仪器运行前检查之前或期间取消运行的，并且想重复使用耗材。	请参见 重新存放耗材 (第 68 页) 。
所有其他情况。	请参见 取出耗材 (第 44 页)

- 选择 **Close Door (关闭仓门)**，重新装入托盘并返回“Home (主页)”界面。
传感器会确认夹盒已取出。

对运行重新排队

如果“Process Management (流程管理)”中的“Status of Secondary Analysis (二级分析状态)”显示了错误，您可以对运行重新排队，针对生成的 cBCL 文件重新执行仪器内 DRAGEN 分析。要使重新排队功能正常运行，原先的运行文件夹必须仍在仪器上。使用此重新排队功能不会对 BaseSpace Sequence Hub 中的运行重新排队。要在 BaseSpace Sequence Hub 中重新排队，请参见“在 BaseSpace Sequence Hub 帮助中心中修正样品表”。

- 更新 v2 格式样品表，然后将样品表保存到便携式驱动器或装载的网络驱动器。
- 如果之前是将样品表保存到便携式驱动器，请将该驱动器插入 USB 3.0 端口，仪器侧面和背面均有此类端口。视需要轻轻移动仪器，以便接触到背面。
- 选择控制软件菜单，然后选择 **Process Management (流程管理)**。
- 确保没有正在进行的测序运行或仪器内二级分析。

5. 选择要重新排队的已完成运行旁边的 **Requeue**（重新排队）。
6. 选择 **Choose**（选择）导航到更新的样品表，然后选择 **Open**（打开）。
7. 选择 **Start Requeue**（开始重新排队）。

对仪器进行电源重启

对仪器进行电源重启可安全关闭然后重新启动系统，以恢复中断的连接、比对规格或解决初始化失败问题。软件消息会指出何时重启电源以解决错误或警告。

1. 从控制软件菜单中选择 **Shut Down Instrument**（关闭仪器）。
2. 如果系统不关闭，请按住仪器右侧的电源按钮，直到指示灯变暗。
3. 电源按钮闪烁时，按后面板上切换开关的关机 (O) 一侧。
电源关闭后，电源按钮可能会继续闪烁。

图 8 切换开关位置



4. 等待 30 秒。
5. 按切换开关的开机 (I) 一侧。
6. 当电源按钮闪烁时，等待 30 秒，然后按下该按钮。

图 9 电源按钮位置



7. 等待 5 分钟左右，让操作系统加载。操作系统加载好后，登录系统。

控制软件会启动并初始化系统。等待 5 分钟左右，让系统初始化。初始化完成后，“Home（主页）”界面即会显示。

执行系统检查

正常操作或仪器维护不需要执行系统检查。但是，Illumina 技术支持代表可能会要求您执行系统检查以进行故障诊断。

四个子系统检查大约需要执行 58 分钟，将对运行前检查错误和其他问题进行故障诊断。这些测试用于确认组件是否正确对准且可正常工作。

测试结果将输出到 `/usr/local/illumina/system-check` 中的 `system-check` 文件夹。

务必在运行系统检查之前取出夹盒。

运行系统检查

1. 从控制软件菜单中，选择 **System Checks（系统检查）**。
2. 为您想要执行的下列任何系统检查选中对应的复选框。
 - **Network Connectivity（网络连接）** — 检查您的网络连接状态和性能。
 - **Enclosure（外壳）** — 检查热力系统和挡板升降装置的性能。
 - **Motion（运动）** — 检查 Z 轴和 XY 轴的行程限制和性能。
 - **Optics（光学）** — 检查成像模块的性能。
3. 选择 **Start（开始）**。


还原为出厂设置

可通过将系统还原为出厂默认值来将软件降级或从不理想的配置中恢复。此功能只能由 Illumina 代表使用。

捕获安装的映像

捕获系统映像，以便备份成功运行的软件安装。可在以后的某个时间点还原该系统映像。建议您在与 Illumina 代表一起完成首次安装和密码更改之后立即捕获系统映像。

1. 重新启动 Linux。
2. 出现选择操作系统的提示时，选择 **Capture Installed Image（捕获安装的映像）**。
操作系统选项会短暂显示，之后会自动继续执行 NextSeq 1000/2000 Control Software。

 | 由于内存中只会保留一个映像，因此这将覆盖之前捕获的映像。

3. 等待 30 分钟左右，让系统捕获当前安装的映像。
捕获期间可能会重启数次。完成后，系统会重启，且当前安装的映像会存储到内存中。

还原捕获的映像

可通过将系统还原到之前捕获的映像来从不理想的配置中恢复。

1. 重新启动 Linux。
2. 出现选择操作系统的提示时，选择 **Restore Installed Image**（还原安装的映像）。
操作系统选项会短暂显示，之后会自动继续执行 NextSeq 1000/2000 Control Software。

i | 密码与系统映像相绑定。还原后，请使用所还原映像的密码登录系统。

3. 等待 30 分钟左右，直到还原完成。
还原期间可能会重启数次。完成后，系统会重启，且映像会还原。

资源和参考资料

V2 格式样品表设置

如果选择了本地模式，您可使用 v2 文件格式的样品表来配置运行设置。请在“Instrument Run Setup（仪器运行设置）”中创建样品表，或者通过编辑 *NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统 v2 格式样品表模板* 进行创建。编辑样品表时，请确保下面的部分和字段均已按所列顺序包含在内并符合要求。编辑好后，请使用便携式驱动器或装载的网络驱动器将样品表传输到 NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统中。当您在控制软件中导航到样品表时，系统会将它复制到仪器上的运行前文件夹，此时您便可以取出便携式驱动器。

确保您的 v2 格式样品表设置满足以下要求：

- BCLConvert_Data 样品表部分指定的标签序列应与 NextSeq 1000/2000 中选择的标签试剂盒匹配。
- 如果使用的是 NextSeq 1000/2000 Control Software v1.2，则必须在系统上安装并启用样品表中指定的 DRAGEN 版本。有关安装信息，请参见 [软件更新（第 63 页）](#)。
- 如果使用的是 NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3，则必须在系统上安装样品表中指定的 DRAGEN 版本。控制软件会自动根据样品表检测 DRAGEN 版本，并视需要提示您切换活动版本。有关安装信息，请参见 [软件更新（第 63 页）](#)。

如果要使用 DRAGEN，您需配置其他设置。有关详细信息，请参见 [DRAGEN 样品表设置（第 76 页）](#)

请从 NextSeq 1000 和 NextSeq 2000 测序系统支持页面的产品文件部分中下载 v2 格式样品表模板。如果您之前是使用“Instrument Run Setup（仪器运行设置）”创建样品表的，在初始下载之后修改样品表会导致分析失败。

文件名不能包含特殊字符。

[Header] 要求

[Header] 部分包含运行的整体信息。下面是可用的 [Header] 字段和描述。

字段	必填	描述
FileFormatVersion	是	样品表版本。为该值输入 2。
RunName	否	您偏好的唯一运行名称。RunName 可包含字母数字字符、下划线、短破折号和句号。如果 RunName 含有空格或特殊字符，分析将会失败。
RunDescription	否	运行的描述。
InstrumentPlatform	否	NextSeq 1000/2000

字段	必填	描述
InstrumentType	否	NextSeq 1000/2000

[Reads] 要求

[Reads] 部分描述用于基因组和标签片段 1 和 2 的测序循环次数。下面是可用的 [Reads] 字段和描述。

字段	必填	描述
Read1Cycles	是	第一个片段的循环次数。该值必须为大于零的整数。
Read2Cycles	否	第二个片段的循环次数。
Index1Cycles	否	第一个标签片段的循环次数。测序多个样品时为必填项。最大循环次数为 10 次。
Index2Cycles	否	第二个标签片段的循环次数。最大循环次数为 10 次。

[Sequencing_Settings] 要求

使用 [Sequencing_Settings] 部分可指定您要使用的文库制备试剂盒。

字段	必填	描述
LibraryPrepKits	否	<p>您的文库制备试剂盒。只允许使用一个文库制备试剂盒。</p> <p>在 NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 中，如果将 Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus 试剂盒或 Illumina Stranded mRNA Prep 试剂盒指定为文库制备试剂盒，系统会自动选择所需的自定义配方。</p> <p>输入以下其中一个值。</p> <ul style="list-style-type: none"> · Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus 试剂盒 — ILMNStrandedTotalRNA · Illumina Stranded mRNA Prep 试剂盒 — ILMNStrandedmRNA

BCL Convert 要求

BCL Convert 部分提供有关将数据从 BCL 转换为 FASTQ 的信息。BCL Convert 选项包括两个单独的部分：[BCLConvert_Settings] 和 [BCLConvert_Data]。BCL Convert 部分需要有关标签接头序列的信息。要确定与每个片段和标签兼容的接头序列，请参见《Illumina 接头序列》（文档号 100000002694）。

下面是可用的 [BCLConvert_Settings] 字段和描述。

字段	必填	描述
SoftwareVersion	是	系统当前安装的 DRAGEN 软件版本。请使用版本名称中包含的所有三个整数。例如 3.5.7。
BarcodeMismatchesIndex1	否	第一个标签片段与标签序列之间允许存在的不匹配项数。值可以是 0、1 或 2。默认值为 1。
BarcodeMismatchesIndex2	否	第二个标签片段与标签序列之间允许存在的不匹配项数。值可以是 0、1 或 2。默认值为 1。
FastqCompressionFormat	否	要将 FASTQ 文件输出为 *.gz 文件，请输入 gzip。要将 FASTQ 文件另存为 *.ora 文件并使用 DRAGEN Decompression，请输入 dragen。
AdapterRead1	否	要从片段 1 末端裁剪掉或遮盖住的序列。含有 A、C、G 或 T 的片段 1 接头序列。默认情况下指的是 AdapterRead1 裁剪循环。
AdapterRead2	否	要从片段 2 末端裁剪掉或遮盖住的序列。含有 A、C、G 或 T 的片段 2 接头序列。默认情况下指的是 AdapterRead2 裁剪循环。
OverrideCycles	否	用于指定片段的 UMI 循环和遮盖循环的字符串。允许使用下列值： <ul style="list-style-type: none"> · N — 指定要忽略的循环次数。 · Y — 指定测序循环次数。 · I — 指定标签循环次数。 · U — 指定要裁剪的 UMI 循环次数。 每个元素用分号分隔。下面是一些 OverrideCycles 输入示例。 U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

下面是可用的 [BCLConvert_Data] 字段和描述。

字段	必填	描述
Sample_ID (样品 ID)	是	样品的 ID。样品 ID 最多可包含 20 个字母数字字符、连字符和下划线。ID 区分大小写。请用短破折号或下划线分隔每个标识符。例如 Sample1-DQB1-022515。
Index (标签)	否	与样品相关联的标签序列。只允许输入 A、C、T、G。测序多个样品时为必填项。
Index2 (标签 2)	否	与样品相关联的第二个标签序列。只允许输入 A、C、T、G。确保第二个标签 (i5) 接头序列处于正向。DRAGEN 在二级分析期间会自动反向补充 i5 标签。
Lane (泳道)	否	流动槽的泳道。泳道用一个整数值表示。

DRAGEN 样品表设置

本部分描述了每个 DRAGEN 管道的样品表要求。将 DRAGEN 管道设置添加为样品表上的最后一部分。只能使用一个 DRAGEN 管道。

每个 DRAGEN 管道都包含单独的设置和数据部分。

DRAGEN Germline 管道要求

下面是可用的 [DragenGermline_Settings] 字段和描述。

字段	必填	描述
SoftwareVersion	是	系统当前安装的 DRAGEN 软件版本。请使用版本名称中包含的所有三个整数。例如 3.5.7。 软件版本必须与 BCLConvert_Settings 部分指定的版本相匹配。
ReferenceGenomeDir	是	参考基因组名称。例如 hg19_alt_aware。请使用 /usr/local/illumina/genomes 中的参考基因组的名称。要使用自定义参考基因组，请参见适用于 <i>Illumina Instruments v1.0.0 应用程序的参考构建器在线帮助</i> 。
MapAlignOutFormat	否	输出文件的格式。允许的值为 bam 或 cram。如未指定任何值，则默认为无。
KeepFastq	否	要保存 FASTQ 输出文件，请输入 true。要删除 FASTQ 输出文件，请输入 false。

下面是可用的 [DragenGermline_Data] 字段和描述。

字段	必填	描述
Sample_ID (样品 ID)	是	样品的 ID。样品 ID 最多可包含 20 个字母数字字符。ID 区分大小写。请用短破折号分隔每个标识符。例如 Sample1-DQB1-022515。样品 ID 必须与 BCLConvert_Data 部分指定的 ID 相匹配。

DRAGEN RNA 管道要求

下面是可用的 [DragenRNA_Settings] 字段和描述。

字段	必填	描述
SoftwareVersion	是	系统当前安装的 DRAGEN 软件版本。请使用版本名称中包含的所有三个整数。例如 3.5.7。软件版本必须与 BCLConvert_Settings 部分指定的版本相匹配。
ReferenceGenomeDir	是	参考基因组名称。例如 hg38_noalt_with_decoy。请使用 /usr/local/illumina/genomes 中的参考基因组的名称。要使用自定义参考基因组，请参见 <i>适用于 Illumina Instruments v1.0.0 应用程序的参考构建器在线帮助</i> 。
RnaGeneAnnotationFile	否	含有 RNA 基因注释的文件。仅允许使用字母数字字符。如未提供，将使用指定参考基因组所含的默认注释文件。
MapAlignOutFormat	否	输出文件的格式。允许的值为 bam 或 cram。如未指定任何值，则默认为无。
KeepFastq	否	要保存 FASTQ 输出文件，请输入 true。要删除 FASTQ 输出文件，请输入 false。
DifferentialExpressionEnable	否	要启用差异基因表达，请输入 true。输入 false 会从分析中排除差异基因表达。

下面是可用的 [DragenRna_Data] 字段和描述。

字段	必填	描述
Sample_ID	是	样品的 ID。样品 ID 最多可包含 20 个字母数字字符。ID 区分大小写。请用短破折号分隔每个标识符。例如 Sample1-DQB1-022515。样品 ID 必须与 BCLConvert_Data 部分指定的 ID 相匹配。

字段	必填	描述
Comparison<N>	否	每个样品的对照值或比较值。如果样品没有对照值或比较值，则会为该样品分配 na。标记为对照品的所有样品会与标记为比较品的所有样品进行比较。N 值反映样品的比较组。

DRAGEN Enrichment 管道要求

下面是可用的 [DragenEnrichment_Settings] 字段和描述。

字段	必填	描述
SoftwareVersion	是	系统当前安装的 DRAGEN 软件版本。请使用版本名称中包含的所有三个整数。例如 3.5.7。 软件版本必须与 BCLConvert_Settings 部分指定的版本相匹配。
ReferenceGenomeDir	是	参考基因组名称。例如 hg38_alt_aware。参考基因组位于 /usr/local/illumina/genomes。要使用自定义参考基因组，请参见适用于 <i>Illumina Instruments v1.0.0</i> 应用程序的参考构建器在线帮助。
BedFile	是	内含目标区域的 bed 文件。
GermlineOrSomatic	是	要执行富集胚系变异分析，请输入 germline。要执行富集体细胞变异分析，请输入 somatic。
KeepFastq	否	要保存 FASTQ 输出文件，请输入 true。要删除 FASTQ 输出文件，请输入 false。
MapAlignOutFormat	否	输出文件的格式。允许的值为 bam 或 cram。如未指定任何值，则默认为无。
AuxNoiseBaselineFile	否	噪声基线文件的文件名。您可以使用 *.txt 或 *.gz 文件格式。噪声基线文件仅在使用体细胞变异模式时可用。有关详细信息，请参见 导入噪声基线文件（第 15 页） 。

下面是可用的 [DragenEnrichment_Data] 字段和描述。

字段	必填	描述
Sample_ID	是	样品的 ID。样品 ID 最多可包含 20 个字母数字字符。ID 区分大小写。请用短破折号分隔每个标识符。例如 Sample1-DQB1-022515。样品 ID 必须与 BCLConvert_Data 部分指定的 ID 相匹配。

DRAGEN DNA Amplicon 管道要求

下面是可用的 [DragenAmplicon_Settings] 字段和描述。

字段	必填	描述
SoftwareVersion	是	系统当前安装的 DRAGEN 软件版本。请使用版本名称中包含的所有三个整数。例如 3.5.7。 软件版本必须与 BCLConvert_Settings 部分指定的版本相匹配。
ReferenceGenomeDir	是	参考基因组名称。例如 hg38_alt_aware。参考基因组位于 /usr/local/illumina/genomes。要使用自定义参考基因组，请参见适用于 <i>Illumina Instruments v1.0.0</i> 应用程序的参考构建器在线帮助。
DnaBedFile	是	内含目标区域的 bed 文件。可以输入 *.txt 或 *.gz 文件格式的 bed 文件。
DnaGermlineOrSomatic	是	要执行 DNA Amplicon 胚系变异分析，请输入 germline。要执行 DNA Amplicon 体细胞分析，请输入 somatic。
KeepFastq	否	要保存 FASTQ 输出文件，请输入 true。要删除 FASTQ 输出文件，请输入 false。
MapAlignOutFormat	否	输出文件的格式。允许的值为 bam 或 cram。如未指定任何值，则默认为无。

下面是可用的 [DragenAmplicon_Data] 字段和描述。

字段	必填	描述
Sample_ID	是	样品的 ID。样品 ID 最多可包含 20 个字母数字字符。ID 区分大小写。请用短破折号分隔每个标识符。例如 Sample1-DQB1-022515。样品 ID 必须与 BCLConvert_Data 部分指定的 ID 相匹配。
DnaOrRna	是	要执行的 Amplicon 分析类型。DRAGEN v3.8 仅支持 DNA 分析。输入 dna。

DRAGEN Single Cell RNA 管道要求

下面是可用的 [DragenSingleCellRNA_Settings] 字段和描述。有关第三方试剂盒兼容性的信息，请参见 DRAGEN Bio-IT Platform 的产品兼容性支持页面。

单细胞文库试剂盒 1-5

下面的样品表设置适用于与 DRAGEN 单细胞文库试剂盒 1-5 基因结构相同的文库制备试剂盒。请查看 DRAGEN Bio-IT Platform 的产品兼容性支持页面，以确认您的试剂盒的基因结构。

字段	必填	描述
SoftwareVersion	是	系统当前安装的 DRAGEN 软件版本。请使用版本名称中包含的所有三个整数。例如 3.5.7。 软件版本必须与 BCLConvert_Settings 部分指定的版本相匹配。
ReferenceGenomeDir	是	参考基因组名称。例如 hg38_alt_aware。参考基因组位于 /usr/local/illumina/genomes。要使用自定义参考基因组，请参见适用于 <i>Illumina Instruments v1.0.0</i> 应用程序的参考构建器在线帮助。
RnaLibraryType	否	输入以下值之一： <ul style="list-style-type: none"> · SF — 正向链。SF 为默认值。 · SR — 反向链。 · U — 非链。
RnaGeneAnnotationFile	否	含有 RNA 基因注释的文件。仅允许使用字母数字字符。如未提供，将使用指定参考基因组所含的默认注释文件。
BarcodeRead	否	测序运行中的条形码片段位置，其中包含条形码和 UMI。该值可能包含 Read1 或 Read2。默认值为 Read1。
BarcodePosition	是	与针对 BarcodeRead 输入的值中的条形码相对应的碱基位置。碱基位置添加了标签，从位置零开始。请按以下格式输入 BarcodePosition 值： 0_<条形码结束位置> 例如，如果条形码包含 16 个碱基，该值便为 0_15。
UmiPosition	是	与针对 BarcodeRead 输入的值中的 UMI 相对应的碱基位置。请按以下格式输入 UmiPosition 值： <UMI 开始位置>_<UMI 结束位置> 例如，如果 UMI 包含 10 个碱基，条形码包含 16 个碱基，则该值为 16_25。
BarcodeSequenceWhitelist	否	含有要包含的条形码序列的文件名。文件名只能包含字母数字字符、短破折号、下划线和句号。

字段	必填	描述
KeepFastq	否	要保存 FASTQ 输出文件，请输入 <code>true</code> 。要删除 FASTQ 输出文件，请输入 <code>false</code> 。
MapAlignOutFormat	否	输出文件的格式。允许的值为 <code>bam</code> 或 <code>cram</code> 。如未指定任何值，则默认为无。

下面是可用的 [DragenSingleCellRNA_Data] 字段和描述。

字段	必填	描述
Sample_ID	是	样品的 ID。样品 ID 最多可包含 20 个字母数字字符。ID 区分大小写。请用短破折号分隔每个标识符。例如 <code>Sample1-DQB1-022515</code> 。样品 ID 必须与 <code>BCLConvert_Data</code> 部分指定的 ID 相匹配。

单细胞文库试剂盒 6

下面的样品表设置适用于与 DRAGEN 单细胞文库试剂盒 6 基因结构相同的文库制备试剂盒。请查看 DRAGEN Bio-IT Platform 的产品兼容性支持页面，以确认您的试剂盒的基因结构。

字段	必填	描述
SoftwareVersion	是	系统当前安装的 DRAGEN 软件版本。请使用版本名称中包含的所有三个整数。例如 <code>3.5.7</code> 。 软件版本必须与 <code>BCLConvert_Settings</code> 部分指定的版本相匹配。
ReferenceGenomeDir	是	参考基因组名称。例如 <code>hg38_alt_aware</code> 。参考基因组位于 <code>/usr/local/illumina/genomes</code> 。要使用自定义参考基因组，请参见适用于 <i>Illumina Instruments v1.0.0</i> 应用程序的参考构建器在线帮助。
RnaLibraryType	否	输入以下值之一： <ul style="list-style-type: none"> · SF — 正向链。 · SR — 反向链。 · U — 非链。
RnaGeneAnnotationFile	否	含有 RNA 基因注释的文件。仅允许使用字母数字字符。如未提供，将使用指定参考基因组所含的默认注释文件。

字段	必填	描述
BarcodeRead	否	测序运行中的条形码片段位置，其中包含条形码和 UMI。该值可能包含 Read1 或 Read2。默认值为 Read1。
BarcodePosition	是	与针对 BarcodeRead 输入的值中的条形码相对应的碱基位置。碱基位置添加了标签，从位置零开始。请按以下格式输入 BarcodePosition 值： 0_<第一个条形码的结束位置>+<第二个条形码的开始位置>_<第二个条形码的结束位置>+<第三个条形码的开始位置>_<第三个条形码的结束位置> 例如，如果是以下结构，则值为 0_8+21_29+43_51： <ul style="list-style-type: none"> · 第一个条形码中包含 9 个碱基 (0_8)。 · 第一个条形码和第二个条形码之间有 12 个碱基。 · 第二个条形码中包含 9 个碱基 (21_29)。 · 第二个条形码和第三个条形码之间有 13 个碱基。 · 第三个条形码中包含 9 个碱基 (43_51)。
UmiPosition	是	与指定的 BarCodeRead 中的 UMI 相对应的碱基位置。请按以下格式输入字符串： <UMI 开始位置>_<UMI 结束位置> 例如，如果 UMI 包含 8 个碱基，并且 UMI 之前的碱基总数为 51，则该值为 52_59。
BarcodeSequenceWhitelist	否	包含列入白名单的条形码序列的文件的名称。文件名只能包含字母数字字符、短破折号、下划线和句号。
KeepFastq	否	要保存 FASTQ 输出文件，请输入 true。要删除 FASTQ 输出文件，请输入 false。
MapAlignOutFormat	否	输出文件的格式。允许的值为 bam 或 cram。如未指定任何值，则默认为无。

下面是可用的 [DrogenSingleCellRNA_Data] 字段和描述。

字段	必填	描述
Sample_ID	是	样品的 ID。样品 ID 最多可包含 20 个字母数字字符。ID 区分大小写。请用短破折号分隔每个标识符。例如 Sample1-DQB1-022515。样品 ID 必须与 BCLConvert_Data 部分指定的 ID 相匹配。

暗循环测序

本部分介绍如何在配方中使用暗循环测序。

暗循环测序用于完成测序循环的仅化学反应步骤。请查看 [Illumina 支持网站](#) 上针对您所用的文库制备试剂盒的兼容产品页面，以确定是否需要暗循环测序。

按照下面的步骤执行暗循环测序。

编辑配方文件

1. 从 [Illumina 支持网站](#) 下载配方 XML 文件。
2. 编辑配方 XML 文件。
 - a. 根据您的片段和标签测序配置确定相应的操作流程部分。每个自定义配方可能有六个不同的可编辑操作流程。

例如，对于未配置标签测序的单个片段 1，操作流程将会是 `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`。
 - b. 在 `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` 和 `<ReadRef ReadName="Read 2"/>` 之前，在新行上输入以下暗循环步骤。


```
<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />
```
 - c. 针对每个所需的暗循环，在新行上输入暗循环步骤。
3. 保存配方 XML 文件。

下面是一个带有暗循环的配方示例：

```
<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" />
...
```

将配方附加到运行

1. 在控制软件的“Run Setup (运行设置)”中，选择“Custom Recipe (自定义配方)”下面的 **Choose (选择)**。
2. 导航到更新好的配方 XML 文件。
3. 选择 **Open (打开)**。
4. 返回到 [启动测序运行 \(第 39 页\)](#)。

索引

%

%PF 50

A

安装软件 63

B

BaseSpace Sequence Hub 1

 设置 11

 文档 11

BCL 文件 6

bcl2fastq2 46

白皮书 51

帮助, 技术 89

备件 66

本地分析 1

编辑运行参数 42

变性 7

标签

 循环 27

表面编号 47

别名 17

冰柜规格 25

冰箱规格 25

C

CBCL 文件 50

CE 46

仓门

 关闭 43

操作系统 70

测绘带 47

测试试剂盒 25

成像 46-47

承滴盘

 垫板 25

程序片段 5

出厂默认值 71-72

初始化 70

 失败 70

纯度过滤 50

磁盘空间 6, 63

簇强度 48

簇位置 46, 51

错误 5, 70

 概率 50-51

 消息 68

错误日志 46

D

单端 42

灯光栏 3

电源按钮 3, 70

电源线 4

电源重启 68

垫板 25

定相和预定相 48

E

额外的循环 27

F

FASTQ 转换 46

分析

 方法 5, 8

风扇 66

服务器位置 11

G

跟踪耗材 1

关闭 70

规格比对 70

过滤簇 50

过滤文件 46, 51

过期日期 66

H

- 耗材
 - 跟踪 1
 - 扫描 43
- 耗材仓 3
- 核苷酸 49
- 红色通道 49
- 互联网连接 11

I

- Illumina Proactive 支持 11
- InterOp 文件 46, 51
- IP 地址 5

J

- 基于云的分析 1
- 计算机名称 5
- 计算引擎 46
- 技术协助 89
- 夹盒
 - 装入方向 43
- 碱基检出 5
- 碱基检出文件 8, 46, 51
- 键盘 4
- 降级软件 71-72
- 交流电源
 - 输入口 4
- 警报 63
- 警告 5, 70
- 酒精棉片 25

K

- 客户支持 89
- 空气过滤器
 - 备件 25
 - 位置 66
- 扩增 7

L

- Local Run Manager 5
- 流程管理 63
- 绿色通道 49

M

- 命名
 - 计算机名称 5
 - 仪器名称 17
- 模板生成 48
- 默认输出文件夹 42

N

- NextSeq 1000/2000 试剂 24
- 纳米孔 48

P

- PhiX 25
 - 比对 46
- PhiX 对照品 v3 24
- Phred 算法 51
- 配方 63
- 配准失败 48
- 片段循环 27
- 片段长度 27
- 漂白剂擦拭纸 25

Q

- Q-score 50-51
- 企业订阅 11
- 强度值 48
- 切换开关 4, 70
- 驱动器 D 63

R

- RSB 替代品 24
- RunInfo.xml 51

- 日志文件 46
- 软件
 - 安装 63
 - 更新警报 18
 - 降级 71-72
- 软件套装 1, 5

S

- Sequencing Analysis Viewer 46, 48
- System Suite 安装程序 63
- 删除运行 6, 63
- 商品目录号 24
- 声音设置 17
- 试剂盒 24
 - 商品目录号 25
- 手动软件更新 63
- 首次安装 66, 71-72
- 输出文件夹 42, 63
- 鼠标 4
- 数据质量 50
- 双末端 42
- 双通道测序 49
- 缩略图 51

T

- 通过过滤 (PF) 50
- 图标 5
- 图像 46
- 图像分析 5
- 托管位置 11

U

- UNC 路径 42
- Universal Copy Service 5, 63
- USB 端口 4

W

- Windows
 - 登录 70
- 文档 89

- 文库
 - 变性 7
- 无检出 48-49

X

- 稀释文库 7
- 系统检查 68
- 显示器 3
- 相机 47
- 小区 46
- 小区编号 47
- 性能数据 11
- 序列号 5
- 循环次数 27

Y

- 仪器性能数据 11
- 移动 4
- 以太网电缆 4
- 以太网端口 4
- 音频设置 17
- 映射驱动器 42
- 硬盘驱动器 6, 63
- 泳道 47
- 域 11
- 运行
 - 指标 46
- 运行参数
 - 编辑 42
- 运行大小 63
- 运行计数 5
- 运行设置
 - 示例 27
- 运行文件夹 63
- 运行状态 6

Z

- 支持页面 63
- 质保 25
- 质量表 51

中断的连接 70
重启 71-72
重悬缓冲液 24
专用域 11
状态栏 3
自动更新 63

技术协助

如需技术协助，请与 Illumina 技术支持部门联系。

网站: www.illumina.com
电子邮件: techsupport@illumina.com

Illumina 技术支持部门电话号码

地区	免费电话	国际
爱尔兰	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
奥地利	+43 800 006249	+43 1 9286540
澳大利亚	+61 1800 775 688	
比利时	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
丹麦	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
德国	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
法国	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
菲律宾	+63 180016510798	
芬兰	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
韩国	+82 80 234 5300	
荷兰	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
加拿大	+1 800 809 4566	
马来西亚	+60 1800 80 6789	
美国	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
挪威	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
日本	+81 0800 111 5011	
瑞典	+46 2 00883979	+46 8 50619671
瑞士	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
泰国	+66 1800 011 304	
西班牙	+34 800 300 143	+34 911 899 417
新加坡	1 800 5792 745	
新西兰	+64 800 451 650	

地区	免费电话	国际
意大利	+39 800 985513	+39 236003759
印度	+91 8006500375	
印度尼西亚		0078036510048
英国	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
越南	+84 1206 5263	
中国		+86 400 066 5835
中国台湾	+886 8 06651752	
中国香港特别行政区	+852 800 960 230	

安全数据表 (safety data sheet, 简称 SDS) — 可通过 Illumina 网站 (support.illumina.com/sds.html) 获取。

产品文档 — 可从 support.illumina.com 下载。



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (北美以外地区)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

仅供科研使用，不可用于诊断过程。

© 2021 Illumina, Inc. 保留所有权利。

illumina®