

# NextSeq 1000 og 2000

Vejledning til sekventeringssystem

Dette dokument og dets indhold er ophavsretligt beskyttet af Illumina, Inc. og dets datterselskaber ("Illumina") og er udelukkende beregnet til kundens kontraktmæssige brug i forbindelse med anvendelsen af det produkt eller de produkter, som er beskrevet heri, og til intet andet formål. Dette dokument og dets indhold må ikke bruges eller distribueres til noget andet formål og/eller på anden måde kommunikeret, offentliggøres eller reproduceres på nogen som helst måde uden forudgående skriftligt samtykke fra Illumina. Med dette dokument udsteder Illumina ingen licens under sit patent, varemærke, sin copyright eller sædvaneret eller lignende rettigheder for nogen tredjeparter.

Instruktionerne i dette dokument skal følges nøje og fuldstændigt af kvalificerede og behørigt uddannede medarbejdere for at sikre, at det produkt eller de produkter, der er beskrevet heri, anvendes korrekt og sikkert. Alt indhold i dette dokument skal læses grundigt og forstås inden brug af produktet/produkterne.

HVIS ALLE INSTRUKTIONERNE HERI IKKE GENNEMLÆSES FULDT UD OG FØLGES NØJE, KAN DET MEDFØRE SKADE PÅ PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE, SKADE PÅ PERSONER, HERUNDER BRUGERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANDEN EJENDOM OG VIL GØRE ENHVER GARANTI GÆLDENDE FOR PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE UGYLDIG.

ILLUMINA PÅTAGER SIG INTET ANSVAR SOM FØLGE AF FORKERT BRUG AF DET PRODUKT ELLER DE PRODUKTER, DER ER BESKREVET HERI (HERUNDER DELE HERAF ELLER SOFTWARE).

© 2021 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

Alle varemærker tilhører Illumina, Inc. eller de respektive ejere. Specifikke varemærkeoplysninger er tilgængelige på [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

# Revisionshistorik

Dokumentnr.	Dato	Beskrivelse af ændring
1000000109376 v04	April 2021	Tilføjelse af vejledning i import af baselinefiler. Tilføjelse af DRAGEN DNA Amplicon-arbejdsgangen. Tilføjelse af funktioner for NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware v1.3. Tilføjelse af oplysninger om valg af proxyserver. Opdatering af oplysninger om transport og opbevaringstemperatur for RSB with Tween 20. Opdatering af DRAGEN RNA-arbejdsgangen i form af tilføjelse af differentiell genekspression. Opdatering af sekventeringsoutputmappestruktur Opdatering af anbefalinger vedrørende formatet af prøveark v2.
1000000109376 v03	November 2020	Korrigerende af katalognumre. Tilføjelse af oplysninger vedrørende tilføjelse af nye brugere.

Dokumentnr.	Dato	Beskrivelse af ændring
1000000109376 v02	Oktober 2020	<p>Tilføjelse af NextSeq 1000/2000 P3-reagenssæt.</p> <p>Tilføjelse af DRAGEN Single Cell RNA-arbejdsgang.</p> <p>Tilføjelse af DRAGEN Enrichment-arbejdsgang.</p> <p>Tilføjelse af indstillinger for FASTQ-komprimering.</p> <p>Tilføjelse af vejledning i installation af DRAGEN-pipeline og licensopdateringer.</p> <p>Tilføjelse af vejledning i import af brugerdefinerede referencegenomer.</p> <p>Opdatering af overførselsvolumen og -koncentrationer for bibliotekstyper.</p> <p>Opdatering af vejledningen i biblioteksfortynding.</p> <p>Tilføjelse af vejledning i automatisk tømning af reagenskassetten.</p> <p>Opdatering af oplysningerne vedrørende understøttede antal cyklusser.</p> <p>Opdatering af brugerdefinerede indstillinger for instrumentet.</p> <p>Opdatering af vejledningen i konfiguration af kørsel på instrumentet.</p> <p>Opdatering af DRAGEN-sekventeringsoutputstruktur.</p> <p>Tilføjelse af oplysninger om DRAGEN-QC-rapporter.</p> <p>Tilføjelse af oplysninger vedrørende fjernelse af brugerdefinerede referencegenomer fra harddisken.</p> <p>Tilføjelse af oplysninger vedrørende udførelse af systemkontroller.</p> <p>Opdatering af indstillinger for prøveark v2.</p>

Dokumentnr.	Dato	Beskrivelse af ændring
1000000109376 v01	Juni 2020	<p>Opdatering af softwarebeskrivelser for NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware.</p> <p>Tydeliggørelse af forskellen mellem cloud-tilstand, hybridtilstand, lokal tilstand og enkeltstående tilstand igennem hele vejledningen.</p> <p>Opdatering af vejledningen i opbevaring og optøning af kassetter.</p> <p>Opdatering af oplysninger vedrørende understøttede antal cyklusser.</p> <p>Opdatering af vejledningen i konfiguration af sekundær analyse.</p> <p>Opdatering af katalognumre for reagenssæt.</p> <p>Opdatering af diagram over sekventeringsprotokol.</p> <p>Opdatering af vejledningen i angivelse af et netværksdrev som standardoutputmappe.</p> <p>Opdatering af tabel over understøttede bibliotekstyper.</p> <p>Tilføjelse af vejledning i import af et brugerdefineret referencegenom.</p> <p>Tilføjelse af vejledning i konfiguration af en kørsel ved brug af et brugerdefineret indekssæt og et brugerdefineret biblioteksklargøringsæt.</p> <p>Opdatering af krav til brugerkonto og adgangskode.</p> <p>Tilføjelse af oplysninger om DRAGEN-outputmappestruktur.</p> <p>Præcisering af vejledningen i tømning af kassetten for brugte reagenser.</p> <p>Tilføjelse af baggrundsinformation om Q-tabellen.</p> <p>Opdatering af vejledningen i installation af opdateringer til kontrolsoftwaren.</p> <p>Tilføjelse af vejledning i genindsættelse af kørsel i kø.</p> <p>Tilføjelse af vejledning i opdatering af DRAGEN-pipelines og -licens.</p> <p>Tilføjelse af vejledning i brugertilpasning af instrument.</p> <p>Opdatering af illustrationer for at afspejle ny mærkning.</p> <p>Ændring af dør til afskærmning igennem hele vejledningen.</p> <p>Tilføjelse af beskrivelse af de to ethernetporte.</p>

<b>Dokumentnr.</b>	<b>Dato</b>	<b>Beskrivelse af ændring</b>
1000000109376 v00	Marts 2020	Oprindelig udgivelse.

# Indholdsfortegnelse

Systemoversigt .....	1
Yderligere ressourcer .....	1
Instrument-hardware .....	3
Integreret software .....	5
Processtyring .....	6
Diagram over sekventeringsprotokol .....	8
Sådan virker sekventering .....	8
Systemkonfiguration .....	11
Krav til brugerkonto .....	11
Konfiguration af BaseSpace-sekventeringshub og Proactive Support .....	13
Angivelse af standardplacering for outputmappen .....	15
Import af brugerdefinerede referencegenomer .....	18
Import af baselinefiler for støj .....	18
Konfiguration af kørselstilstand .....	20
Brugertilpasning af instrumentet .....	21
Materialer og udstyr .....	23
Sekventeringsmaterialer .....	23
Hjælpematerialer .....	27
Hjælpeudstyr .....	28
Protokol .....	30
Overvejelser i forbindelse med sekventering .....	30
Planlægning af en sekventeringskørsel på BaseSpace-sekventeringshub .....	32
Optøning af kassette i pose og flowcelle .....	40
Fortyndning af biblioteker .....	42
Overførsel af materialer til kassetten .....	44
Initiering af en sekventeringskørsel .....	46
Sekventeringsoutput .....	55
Oversigt over Real-Time Analysis .....	55
Arbejdsgang i Real-Time Analysis .....	58
Sekventeringsoutputfiler .....	62
Outputfiler til den sekundære DRAGEN-analyse .....	63
Outputmappestruktur for sekundær DRAGEN-analyse .....	72
Vedligeholdelse .....	75
Frigørelse af plads på harddisken .....	75
Softwareopdateringer .....	75
DRAGEN-arbejdsgang og -licensopdateringer .....	77

Udskiftning af luftfilter .....	79
Fejlfinding .....	81
Løsninger på fejlbeskeder .....	81
Tilbagesætning af materialer på køl .....	82
Annullering af en kørsel .....	82
Genindsættelse af kørsel i kø .....	83
Genstart af instrumentet .....	83
Gennemførelse af en systemkontrol .....	84
Gendannelse til fabriksindstillinger .....	85
Afbildning af installation .....	85
Gendannelse til optaget billede .....	86
Ressourcer og referencer .....	87
Indstillinger for prøveark v2 .....	87
Mørkecyklus-sekventering .....	102
Indeks .....	104
<b>Teknisk hjælp .....</b>	<b>108</b>



# Systemoversigt

Illumina® NextSeq™ 1000-sekventeringssystem og Illumina® NextSeq™ 2000-sekventeringssystem tilbyder en targeteret metode til NGS<sup>1</sup>. Dette programfokuserede system samler Illuminas sekventeringsteknologi i ét omkostningseffektivt bordinstrument med følgende funktioner:

- **Tilgængelighed og driftssikkerhed** – NextSeq 1000/2000 omfatter lokal DRAGEN-analyse og denaturering og fortynding på instrumentet. Der er indbygget et billedoptagelsesmodul i systemet, og fluidikdelene er bygget ind i materialet, hvilket letter vedligeholdelsen af instrumentet.
- **Enkelt overførsel af materialer** – Engangskassetten indeholder allerede alle de nødvendige reagenser til en kørsel. Biblioteket og flowcellen sættes direkte i kassetten, som så sættes i instrumentet. Integrerede identifikatorer muliggør præcis sporing.
- **NextSeq 1000/2000-software** – Den integrerede softwarepakke styrer driften af instrumentet, behandler billeder og genererer basebestemmelser.
  - **Cloud-tilstand** – Planlæg din kørsel via Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) på BaseSpace-sekventeringshub. Den valgte analysearbejdsgang initieres automatisk i skyen. Kørselsdata og analyseresultater gives også i skyen.
  - **Hybridtilstand** – Planlæg din kørsel via Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) på BaseSpace-sekventeringshub. Den valgte analysearbejdsgang initieres herefter via DRAGEN på instrumentet.
  - **Lokal tilstand** – Planlæg din kørsel lokalt med et prøveark i filformat v2. Den valgte analysearbejdsgang initieres automatisk via DRAGEN på instrumentet.
  - **Enkeltstående tilstand** – Planlæg din kørsel uden et prøveark.

I dette afsnit finder du en oversigt over systemet, herunder oplysninger om hardware, software og dataanalyse. Du bliver desuden introduceret for de vigtigste koncepter og termer i dokumentationen. Du kan finde detaljerede specifikationer, datablade, programmer og relaterede produkter på [NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystem-produktsiden](#) på Illuminas websted.

## Yderligere ressourcer

Du kan finde yderligere systemressourcer på [supportsiderne til NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemer](#) på Illuminas websted. Disse ressourcer omfatter software, træning, kompatible produkter og følgende dokumentation. Tjek altid supportsiderne for de seneste versioner.

---

<sup>1</sup>next-generation-sekventering

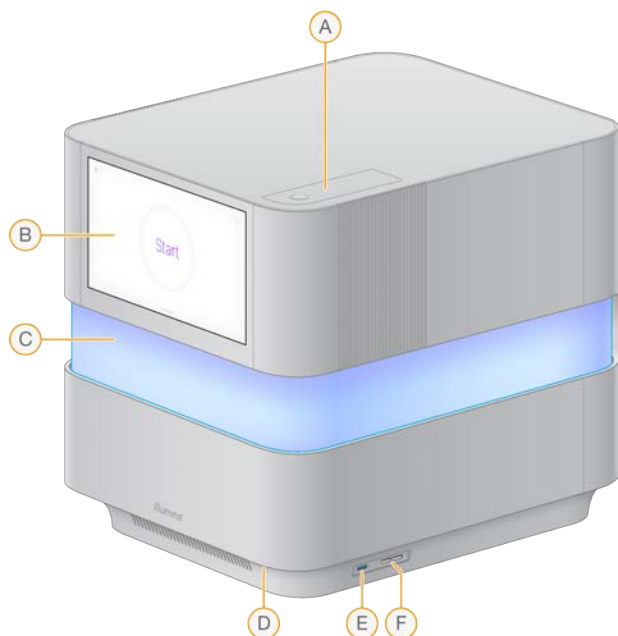
<b>Ressource</b>	<b>Beskrivelse</b>
<a href="#">Custom Protocol Selector (Brugertilpasset protokolvælger)</a>	Et værktøj til at generere punkt-til-punkt-instruktioner, der er særligt tilpasset din biblioteksklargøringsmetode, kørselsparametre og analysemetode med muligheder for at justere detaljeringsniveauet.
<i>NextSeq 1000 and NextSeq 2000 Sequencing Systems Safety and Compliance Guide (Sikkerheds- og overensstemmelsesvejledning til NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemerne) (dokumentnr. 1000000111928)</i>	Indeholder oplysninger om driftssikkerhedsmæssige overvejelser, overensstemmelseserklæringer og instrumentmærkning.
<i>RFID Reader Module Compliance Guide (Overensstemmelsesvejledning til RFID-læsermodul) (dokumentnr. 1000000002699)</i>	Indeholder oplysninger om RFID-læseren i instrumentet, overensstemmescertificering og sikkerhedsmæssige overvejelser.
<i>NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide (Vejledning i denaturering og fortynding af biblioteker til NextSeq 1000 og 2000) (dokumentnr. 1000000139235)</i>	Indeholder instruktioner i manuel denaturering og fortynding af klargjorte biblioteker til en sekventeringskørsel og klargøring af valgfri PhiX-kontrol.
<i>NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide (Vejledning i brugerdefinerede primere til NextSeq 1000 og 2000) (dokumentnr. 1000000139569)</i>	Indeholder oplysninger om udskiftning af Illumina-sekventeringsprimere med brugerdefinerede sekventeringsprimere.
<i>NextSeq 2000 Sequencing System Site Prep Guide (Stedforberedelsesvejledning til NextSeq 2000-sekventeringssystem) (dokumentnr. 1000000109378)</i>	Indeholder specifikationer for laboratoriepladsen, elektriske krav og miljø- og netværksmæssige overvejelser.

Ressource	Beskrivelse
<i>BaseSpace-hjælp</i> ( <a href="http://help.basespace.illumina.com">help.basespace.illumina.com</a> )	Indeholder oplysninger om brug af BaseSpace™ - sekventeringshub og tilgængelige analysemuligheder.
<i>Index Adapters Pooling Guide</i> (Vejledning i puljeoprettelse med indeksadaptere) (dokumentnr. 1000000041074)	Indeholder retningslinjer for puljeoprettelse og strategier for dobbelt indeksering.
<i>Illumina Adapter Sequences</i> (Illumina-adaptersekvenser) (dokumentnr. 1000000002694)	Indeholder lister over adaptersekvenserne til Illumina-biblioteksklargøringskit.

## Instrument-hardware

NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemer har en strømknop, en skærm, en statuslinje, et materialekammer og USB-porte.

Figur 1 Eksterne systemkomponenter



- A. **Luftfilterkammer** – Giver adgang til det udskiftelige luftfilter.
- B. **Touchskærm** – Til konfiguration og opsætning på instrumentet via kontrolsoftwarens brugergrænseflade.
- C. **Statuslinje** – Lyset skifter i takt med, at systemet gennemfører arbejdsgangen. Blå og lilla angiver interaktivitet (f.eks. prækørselskontrol), og flerfarvet lys angiver vigtige tidspunkter og data (f.eks. fuldførelse af sekventering). Kritiske fejl vises med rødt lys.

- D. **Strømknap** – Anvendes til at tænde og slukke for strømmen på instrumentet og viser, om systemet er tændt (lyser), slukket (mørk) eller slukket men sluttet til stikkontakt (blinker).
- E. **3.0 USB-port** – Til tilslutning af et eksternt drev til dataoverførsel.
- F. **2.0 USB-porte** – Til tilslutning af mus og tastatur.

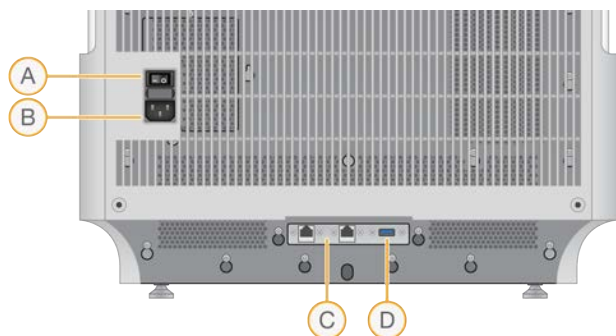
## Strøm og forbindelser

Du kan flytte instrumentet forsigtigt for at få adgang til tænd/sluk-knappen, USB-porten og andre forbindelser på bagsiden af instrumentet.

På bagsiden af instrumentet er der en knap og en indgang til strømtilslutning/-afbrydelse og to ethernet-porte til en valgfri ethernetforbindelse. En 3.0 USB-port giver mulighed for tilslutning af et eksternt drev til dataoverførsel (denne Linux-baserede platform understøtter ikke exFAT).

NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemer er udstyret med to ethernetporte til udvidelse af systemets kapacitet og fleksibilitet. For eksempel kan den ene ethernetport anvendes til kommunikation med et internt netværksdrev og den anden til eksternt kommunikation, eksempelvis med BaseSpace-sekventeringshub eller Proactive Support.

Figur 2 Komponenter på bagsidepanelet

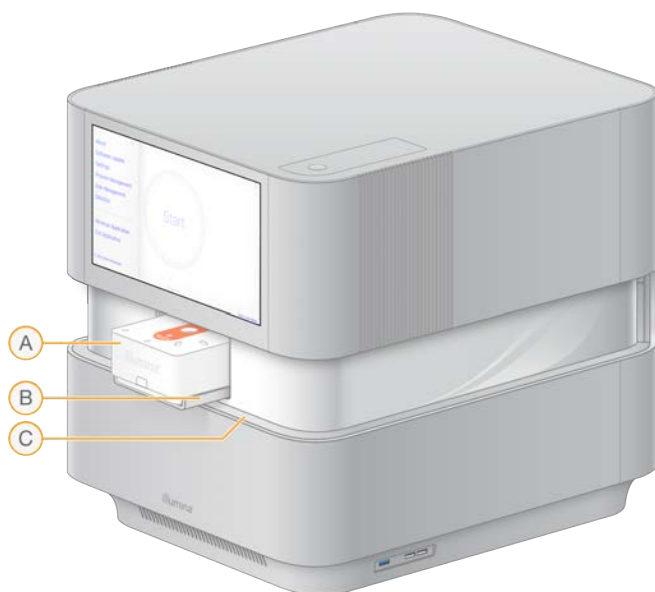


- A. **Til/fra-knap** – Slår strømmen til instrumentet til og fra.
- B. **Strømindgang** – Tilslutning af strømkabel.
- C. **Ethernetporte (2)** – Valgfri tilslutning af ethernetkabler.
- D. **3.0 USB-port** – Til tilslutning af en eksternt harddisk til dataoverførsel.

## Materialekammer

Materialekammeret indeholder kassetten, herunder flowcellen og det fortyndede bibliotek, til en sekventeringskørsel.

Figur 3 Materialekammer med materialer



- A. **Kassette** – Indeholder flowcellen, biblioteket og reagenserne og opsamler anvendte reagenser under kørslen.
- B. **Bakke** – Holder kassetten under sekventeringen.
- C. **Afskærmning** – Åbnes for at give adgang til materialekammeret.

## Integreret software

Systemsoftwarepakken inkluderer integrerede programmer, som udfører sekventeringskørsler og analyser.

- **NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware** – Styrer instrumentdriften og har en brugergrænseflade til konfiguration af systemet, konfiguration af en sekventeringskørsel og monitorering af kørselsstatistik under sekventeringen.
- **Real-Time Analysis (RTA3)** – Udfører billedanalysen og basebestemmelsen i løbet af kørslen. Du kan finde yderligere oplysninger under [Sekventeringsoutput på side 55](#).
- **Universal Copy Service** – Kopierer sekventeringsoutputfilerne fra kørselsmappen til BaseSpace-sekventeringshub (hvis relevant) og outputmappen, hvor du kan tilgå dem.

Kontrolsoftwaren er interaktiv og kører automatiske baggrundsprocesser. Real-Time Analysis og Universal Copy Service kører kun baggrundsprocesser.

## Systemoplysninger

Vælg kontrolsoftwaremenuen i øverste venstre hjørne for at åbne afsnittet About (Om). Afsnittet About (Om) indeholder Illuminas kontaktoplysninger og følgende systemoplysninger:

- Instrumentets serienummer
- Computernavn
- Systempakkeversion
- Afbildning af OS-version
- Totalt antal kørsler

## Notifikationer og vigtige meddelelser

Du finder ikonet for notifikationer i øverste højre hjørne. I tilfælde af en advarsel eller fejl åbnes højre panel for at vise notifikationer. Du kan når som helst trykke på ikonet for at få vist en liste over aktuelle og tidligere notifikationer om advarsler og fejl.

- Advarsler kræver opmærksomhed, men forårsager ikke afbrydelse af en kørsel og kræver ingen anden handling end bekræftelse.
- Fejl kræver handling, før en kørsel kan starte eller fortsætte.

## Minimering af kontrolsoftwaren

Minimer kontrolsoftwaren, når du vil gå til andre programmer. Det kan for eksempel være, når du vil gå til outputmappen via stifinderen eller finde et prøveark.

1. Vælg **Minimize Application** (Minimer program) i kontrolsoftwaremenuen. Kontrolsoftwaren bliver minimeret.
2. Du maksimerer kontrolsoftwaren ved at vælge **NextSeq 1000/2000 Control Software** (NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware) på værktøjslinjen.

## Processtyring

Skærmen Process Management (Processtyring) viser midlertidige kørsler, der er gemt i `/usr/local/illumina/runs`. Hver kørsel er identificeret med kørselsdato, navn og ID. Der vises desuden oplysninger såsom status for kørslen, den sekundære analyse, outputmappen og skyen for hver kørsel. Vælg kørslen for at se yderligere oplysninger, herunder arbejdsgang, gennemsnitlig Q30-%, PF-læsninger i alt og totalt udbytte. Du kan finde oplysninger om sletning af kørsler og frigørelse af plads under [Frigørelse af plads på harddisken på side 75](#). Se, hvordan du genindsætter analysen på instrumentet i køen, under [Genindsættelse af kørsel i kø på side 83](#).

## Status for kørslen

I dette afsnit vises statussen for sekventeringskørslen:

- **In Progress** (Igangværende) – Sekventeringskørslen er i gang.
- **Complete** (Fuldført) – Sekventeringskørslen er fuldført.
- **Stopped** (Stoppet) – Sekventeringskørslen er blevet stoppet.
- **Errored** (Fejl) – Sekventeringskørslen har en fejl.

## Status for den sekundære analyse

I dette afsnit vises statussen for den sekundære DRAGEN-analyse på instrumentet. Der står N/A, hvis analysen udføres på BaseSpace-sekventeringshub.

- **Not Started** (Ikke startet) – DRAGEN-analysen er ikke startet endnu.
- **In Progress** (Igangværende) – DRAGEN-analysen er i gang.
- **Stopped** (Stoppet) – DRAGEN-analysen er blevet stoppet.
- **Errored** (Fejl) – DRAGEN-analysen har en fejl.
- **Complete** (Fuldført) – DRAGEN-analysen er fuldført.

## Status for outputmappen

I dette afsnit vises statussen for de filer, der bliver kopieret til outputmappen:

- **In Progress** (Igangværende) – Kopieringen af filerne til outputmappen er i gang.
- **Complete** (Fuldført) – Filerne er blevet kopieret til outputmappen.

## Status for skyen (BaseSpace-sekventeringshub)

I dette afsnit vises statussen for de filer, der bliver overført til BaseSpace-sekventeringshub via skyen:

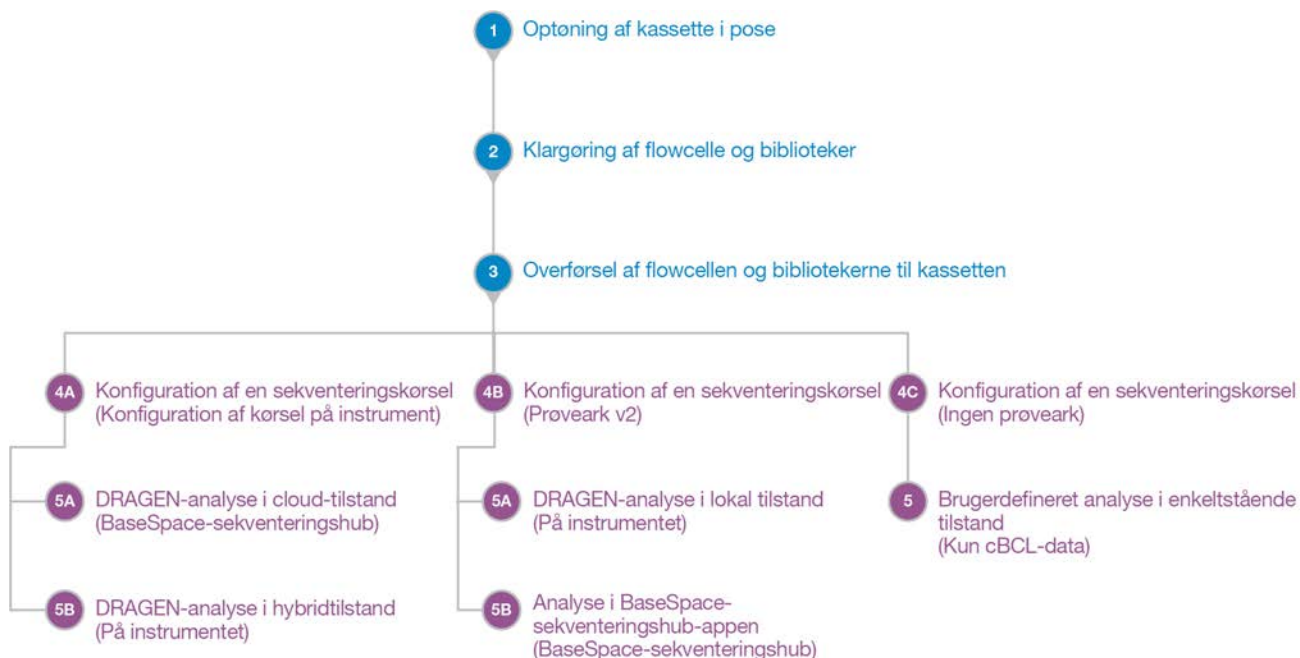
- **In Progress** (Igangværende) – Kontrolsoftwaren er i gang med at overføre filer til BaseSpace-sekventeringshub.
- **Complete** (Fuldført) – Filerne er blevet overført til BaseSpace-sekventeringshub.

## Fejlfinding i forbindelse med statusproblemer

- Hvis kørslen er i gang: Luk skærmen Process Management (Processtyring), vent cirka fem minutter, og åbn så skærmen igen.
- Hvis kørslen ikke er i gang: Genstart instrumentet, og åbn skærmen Process Management (Processtyring) igen. Se [Genstart af instrumentet på side 83](#).

## Diagram over sekventeringsprotokol

Nedenstående diagram illustrerer sekventeringsprotokollen ved brug af NextSeq 1000/2000.



## Sådan virker sekventering

Sekventering på NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemer omfatter clustergenerering, sekventering og analyse. Hvert trin gennemføres automatisk i løbet af en sekventeringskørsel. Afhængigt af systemkonfigurationen foretages der yderligere analysering uden for instrumentet efter kørslen.

### Clustergenerering

Biblioteket<sup>1</sup> bliver automatisk denatureret til enkeltstreng og yderligere fortyndet på instrumentet. I forbindelse med clustergenereringen bliver enkelte DNA-molekyler bundet til flowcellens overflade, hvor de bliver amplificeret for at danne clustre<sup>2</sup>. Clustergenerering tager ~4 timer.

<sup>1</sup>En DNA- eller RNA-prøve, der har adaptore tilknyttet til sekventering. Forberedelsesmetoderne varierer.

<sup>2</sup>En klongruppe af DNA-streng på en flowcelle, der frembringer én sekventeringslæsning. Hver DNA-streng i en flowcelle udgør kimen til en skabelon, der forstærkes, indtil clusteren består af hundred- eller tusindvis af kopier. En flowcelle med 10.000 klynger producerer for eksempel 10.000 enkeltlæsninger eller 20.000 paired end-læsninger.



## Sekventering

Clustrene bliver fotograferet ved hjælp af sekventeringskemi baseret på to kanaler, en grøn kanal og en blå kanal, med henblik på at indkode dataene til de fire nukleotider. Når der er blevet taget et billede af ét felt på flowcellen, bliver det næste felt fotograferet. Processen gentages for hver sekventeringscyklus (~5 minutter pr. cyklus). Efter billedanalysen udfører softwaren Real-Time Analysis basebestemmelse<sup>1</sup>, filtrering og kvalitetsscorebestemmelse.<sup>2</sup>

## Primær analyse

Under kørslen overfører kontrolsoftwaren automatisk basebestemmelsesfiler<sup>3</sup> (\*.cbcl) til den outputmappe, der er angivet for dataanalysen. Under sekventeringskørslen udfører softwaren Real Time Analysis (RTA3) billedanalyse, basebestemmelse og demultipleksering<sup>4</sup>. Når sekventeringen er fuldført, begynder den sekundære analyse. Metoden til den sekundære dataanalyse afhænger af dit program og din systemkonfiguration.

## Sekundær analyse

BaseSpace-sekventeringshub er Illuminas cloud-baserede miljø til kørselsmonitorering, dataanalyse, lagring og samarbejde. Her finder du DRAGEN- og BaseSpace-sekventeringshub-apps, der understøtter almindelige analysemetoder til sekventering.

Når den indledende sekventeringsanalyse er fuldført, udfører DRAGEN en sekundær analyse ved hjælp af en af de tilgængelige analyse-pipelines.

I cloud- eller hybridtilstand henter DRAGEN prøveark, referencegenom og inputfiler til kørslen fra Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) på BaseSpace-sekventeringshub. I cloud-tilstand bliver der automatisk overført cBCL-data til BaseSpace-sekventeringshub, og BaseSpace-sekventeringshub initierer den sekundære DRAGEN-analyse. I hybridtilstand udføres den sekundære DRAGEN-analyse på instrumentet, og outputfilerne kan gemmes i en valgt mappe eller i skyen.

I lokal tilstand henter DRAGEN de angivne prøveark, referencegenomet og inputfilerne til kørslen fra NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemet. Den sekundære DRAGEN-analyse udføres på instrumentet, og outputfilerne bliver gemt i den valgte outputmappe. Hvis der er valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring), kan analysen også startes via BaseSpace-sekventeringshub-apps efter fuldførelse af sekventeringen.

---

<sup>1</sup>Bestemmelse af en base (A, C, G eller T) for hver enkelt cluster i et felt ved en specifik cyklus.

<sup>2</sup>Beregner et sæt kvalitetsprædikatorer for hver enkelt basebestemmelse og anvender derefter prædiktionsværdien til at finde Q-scoren.

<sup>3</sup>Indeholder basebestemmelsen og den tilknyttede kvalitetsscore for hver enkelt cluster i hver enkelt sekventeringscyklus.

<sup>4</sup>En analyseproces, der differentierer læsninger for hvert enkelt bibliotek i en pulje.

I enkeltstående tilstand skal kørslen konfigureres uden prøveark. Denne arbejdsgang anbefales til brugerdefinerede analysearbejdsgange, der starter ud fra cBCL-data.

- Du kan finde yderligere oplysninger om BaseSpace-sekventeringshub på [BaseSpace Sequence Hub Online Help](#) (Onlinehjælp til BaseSpace-sekventeringshub).
- Du kan finde yderligere oplysninger om DRAGEN på [DRAGEN Bio-IT Platform support page](#) (Supportside til DRAGEN Bio-IT Platform).
- Du kan se en oversigt over alle apps på [BaseSpace Apps](#).

# Systemkonfiguration

I dette afsnit finder du en vejledning i konfiguration af systemet, herunder en beskrivelse af softwareindstillingerne.

Vejledningen indeholder primært en beskrivelse af kontrolsoftwaren, men også oplysninger om konfiguration af netværket og operativsystemet.

**i** | Hvis du bruger Google Chrome på instrumentet, bliver du bedt om at låse din login-nøglering op. Du kan trygt ignorere og annullere beskeden.

## Krav til brugerkonto

Operativsystemet Linux har tre konti:

- root (superadministrator)
- ilmnadmin (administrator)
- ilmnuser (bruger)

Administratorkontoen er kun beregnet til implementering af systemopdateringer, såsom opdateringer til NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren, og til brug for IT-personale med henblik på fast tilknytning af et netværksdrev.

Alle andre funktioner, herunder sekventering, skal udføres via brugerkontoen.

## Krav til adgangskoder

Servicemontøren initierer en ændring af adgangskoden til alle tre konti efter installationen af instrumentet. Begge adgangskoder skal ændres hvert halve år, når du får besked om det i instrukserne.

Tabel 1 Standardpolitikker for adgangskoder

Politik	Indstilling
Adgangskodehistorik	Husker fem adgangskoder
Spærringsgrænse	10 ugyldige logonforsøg
Minimal adgangskodelængde	10 tegn
Minimumskrav til forskellige tegn	Tre af hver: tal, store bogstaver, små bogstaver og symboler
Maksimalt gentagne tegn	Tre tegn

Politik	Indstilling
Adgangskoden skal opfylde kompleksitetskravene	Deaktiveret
Gem adgangskoder ved hjælp af reversibel kryptering	Deaktiveret

## Tilføjelse af ny bruger

1. Log ind på ilmnadmin.
2. Tryk på strømknappen, og åbn derefter rullelisten ilmnadmin.
3. Vælg **Account Settings** (Kontoindstillinger).
4. Vælg **Unlock** (Lås op), og indtast derefter adgangskoden til ilmnadmin.
5. Vælg **Add User** (Tilføj bruger).
6. Vælg kontotypen Standard, og indtast derefter et nyt brugernavn.
7. Vælg **Set password now** (Angiv adgangskode nu), og indtast derefter en adgangskode.
8. Vælg **Add** (Tilføj).  
Den nye bruger bliver føjet til brugerlisten.
9. Giv brugeren adgang til NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren som følger.
  - a. Åbn terminalen.
  - b. Indtast følgende:  

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <nyt brugernavn>
```
  - c. Indtast adgangskoden til ilmnadmin, hvis du bliver bedt om det.
10. Du kan kontrollere, at brugertilladelserne er blevet korrekt konfigureret, som følger.
  - a. Log ind på den nye brugerkonto.
  - b. Gå til NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren.
  - c. Vælg **Settings** (Indstillinger) i kontrolsoftwaremenuen.
  - d. Kontrollér, at du kan vælge og gemme outputmappestien under Default Output Folder (Standardoutputmappe).  
Hvis du kan vælge og gemme outputmappestien uden fejl, er tilladelserne blevet korrekt konfigureret.

## Nulstilling af adgangskode

I dette afsnit kan du se, hvordan du nulstiller adgangskoden til ilmnuser, ilmnadmin eller root. Adgangskoden kan ikke gendannes. Du kan ikke omgå en spærring af kontoen efter for mange forkerte indtastninger af adgangskoden ved at nulstille adgangskoden. Du skal vente i 10 minutter, før du kan nulstille din adgangskode eller prøve at logge på igen.

## Nulstilling af adgangskoden til ilmnuser

Du kan nulstille adgangskoden til ilmnuser, hvis du kender adgangskoden til ilmnadmin eller root.

1. Log ind på ilmnadmin.
2. Åbn terminalen.
3. Indtast `sudo passwd ilmnuser`.
4. Indtast adgangskoden til ilmnadmin, når du bliver bedt om det.
5. Indtast en ny adgangskode til ilmnuser, når du bliver bedt om det.
6. Indtast den nye adgangskode til ilmnuser igen, når du bliver bedt om det, for at bekræfte den nye adgangskode.

## Nulstilling af adgangskoden til ilmnadmin

Du kan nulstille adgangskoden til ilmnadmin, hvis du kender adgangskoden til root.

1. Log ind på root.
2. Åbn terminalen.
3. Indtast `passwd ilmnadmin` for at ændre adgangskoden til ilmnadmin, eller indtast `passwd ilmnuser` for at ændre adgangskoden til ilmnuser.
4. Indtast den nye adgangskode, når du bliver bedt om det.
5. Indtast den nye adgangskode igen, når du bliver bedt om det, for at bekræfte den nye adgangskode.

## Nulstilling af adgangskoden til root

Du kan nulstille adgangskoden til root på en af følgende måder:

- Hvis du kender adgangskoden fra tidspunktet for den seneste afbildning af operativsystemet, skal du gendanne i forhold til det gemte billede.
- Hvis du ikke kan huske adgangskoden, skal du kontakte Illuminas tekniske support.

# Konfiguration af BaseSpace-sekventeringshub og Proactive Support

Følg vejledningen nedenfor for at konfigurere BaseSpace-sekventeringshub og Proactive Support på dit system. Se [BaseSpace Sequence Hub Online Help](#) (Onlinehjælp til BaseSpace-sekventeringshub) vedrørende konfiguration af en BaseSpace-sekventeringshub-konto.

1. Vælg **Settings** (Indstillinger) i kontrolsoftwaremenuen.

2. Vælg en af følgende indstillinger for BaseSpace-sekventeringshub og Proactive Support:

Indstilling	Beskrivelse og krav
<b>Proactive Support Only* (Kun Proactive Support)</b>	Der bliver sendt instrumentydelsesdata til Illumina med henblik på hurtigere fejlfinding. Kræver en internetforbindelse.
<b>Proactive and Run Monitoring (Proactive og kørselsmonitorering)</b>	Der bliver sendt InterOp- og logfiler til BaseSpace-sekventeringshub med henblik på fjernmonitorering af kørsler. Dette er standardindstillingen. Kræver en BaseSpace-sekventeringshub-konto og en internetforbindelse.
<b>Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring)</b>	Der bliver sendt InterOp-filer, logfiler og kørselsdata til BaseSpace-sekventeringshub med henblik på fjernmonitorering og -analyse. Kræver en BaseSpace-sekventeringshub-konto, en internetforbindelse og et prøveark.
<b>None (Ingen)</b>	Kørsler bliver ikke forbundet til BaseSpace-sekventeringshub-konti, og der bliver ikke sendt nogen instrumentydelsesdata til Illumina Proactive Support.

\* Afhængigt af kontrolsoftwareversionen kan denne indstilling have et andet navn på softwaregrænsefladen end i denne vejledning.

Proactive Support aktiveres ved alle indstillinger, undtagen None (Ingen). Dette er en gratis tjeneste, som giver dig mulighed for at se dine ydelsesdata på MyIllumina-kundedashboardet, og som giver Illuminas serviceteam mulighed for hurtigere fejlfinding.

- i** | Proactive and Run Monitoring (Proactive og kørselsmonitorering) er aktiveret som standard. Vælg **None** (Ingen) for at slå denne funktion fra.

- Hvis du valgte None (Ingen) på trin 2, skal du vælge **Save** (Gem) for at afslutte. Ellers skal du fortsætte nedenstående trin til og med trin 6.
- Vælg placeringen af den BaseSpace-sekventeringshub-server, som dataene skal overføres til, på listen Hosting Location (Hostinglokation).  
Sørg for at vælge den nærmeste hostinglokation.
- Hvis du har et virksomhedsabonnement, skal du indtaste det domænenavn (URL), der anvendes til din BaseSpace-sekventeringshub-konto.  
For eksempel: <https://yourlab.basespace.illumina.com>.
- Vælg **Save** (Gem).

## Angivelse af standardplacering for outputmappen

Følg vejledningen i dette afsnit, når du skal vælge en standardplacering for outputmappen. Du kan ændre outputmappen for den enkelte kørsel i løbet af kørselskonfigurationen. Softwaren gemmer cBCL-filer<sup>1</sup> og andre kørselsdata i outputmappen.

Systemet kræver en outputmappe, medmindre BaseSpace-sekventeringshub er konfigureret til Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring). Brug kun et eksternt drev eller et netværksdrev som standardoutputmappe. Brug af en outputmappe på instrumentet har negativ indvirkning på din sekventeringskørsel.

### Angivelse af en outputmappe på eksternt drev

Følg nedenstående vejledning for at vælge et eksternt drev som standardoutputmappe. Det anbefales at anvende et drev med egen strømforsyning, der er formatteret til NFTS eller GPT/EXTA.

1. Sæt et eksternt drev i 3.0 USB-porten på siden eller bagsiden af instrumentet.  
Sørg for, at der er knyttet skrive tilladelse til det eksterne drev. Hvis det er skrivebeskyttet, kan softwaren ikke gemme data på det.
2. Opret en ny mappe på det eksterne drev. Denne mappe bliver standardplaceringen for outputmappen.  
NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren kræver mindst to niveauer af indlejrede mapper for at genkende placeringen som et eksternt drev.
3. Vælg **Settings** (Indstillinger) i kontrolsoftwaremenuen.
4. Under Default Output Folder (Standardoutputmappe) skal du vælge den eksisterende mappesti og gå til den nye mappe på det eksterne drev.
5. **[Valgfrit]** Hvis du har valgt **Online Run Setup** (Online kørselskonfiguration) under Run Mode (Kørselstilstand), skal du vælge en indstilling på rullemenuen Hosting Location (Hostinglokation).
6. Vælg **Save** (Gem).

### Angivelse af standardoutputmappe på netværksdrev

Følg nedenstående vejledning for at tilknytte et fast netværksdrev og angive standardplaceringen for outputmappen. Server Message Block (SMB)/Common Internet File System (CIFS) og Network File System (NFS) er de eneste understøttede metoder til fast tilknytning af et netværksdrev på NextSeq 1000/2000.

---

<sup>1</sup>Indeholder basebestemmelsen og den tilknyttede kvalitetsscore for hver enkelt cluster i hver enkelt sekventeringscyklus.

## Vejledning i tilknytning via SMB/CIFS

1. Tryk på **Minimize Application** (Minimer program), hvis NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren er åben.
2. Log ind på ilmnadmin.
3. Vælg **Applications** (Programmer).
4. Vælg **Terminal** under Favorites (Favoritter).
5. Indtast `sudo touch /root/.smbcreds`, og vælg derefter **Enter**.
6. Indtast adgangskoden til ilmnadmin, når du bliver bedt om det .  
Adgangskoden til ilmnadmin er påkrævet, hver gang du bruger kommandoen `sudo`.
7. Indtast `sudo gedit /root/.smbcreds`, og vælg derefter **Enter** for at åbne teksfilen med navnet `smbcreds`.
8. Når `.smbcreds`-tekstfilen bliver åbnet, skal du indtaste dine logonoplysninger til netværket i følgende format.
 

```
username=<brugernavn>
password=<adgangskode>
domain=<domænenavn>
```

Parenteser er ikke nødvendige ved brugernavn, adgangskode og legitimationsoplysninger for domænet. Legitimationsoplysninger for domænet er kun påkrævet, hvis fjernkontoen er del af et domæne.
9. Vælg **Save** (Gem) og gå ud af filen.
10. Identificer servernavnet og sharenavnet for din SMB/CIFS-server.  
Servernavnet og sharenavnet må ikke indeholde mellemrum. Eksempel:  
Servernavn: 192.168.500.100 eller Myserver-myinstitute-03  
Sharenavn: /share1
11. Indtast følgende på terminalen: `sudo chmod 400 /root/.smbcreds`, og vælg derefter **Enter** for at give læseadgang til `.smbcreds`-tekstfilen.
12. Indtast `sudo mkdir /mnt/<lokalt navn>`.  
<lokalt navn> er navnet på den nye mappe på dit netværksdrev, og det må gerne indeholde mellemrum. Det er denne mappe, der vises på instrumentet.
13. Vælg **Enter**.
14. Indtast `sudo gedit /etc/fstab`, og vælg derefter **Enter**.
15. Når `fstab`-filen bliver åbnet, skal du indtaste følgende i slutningen af filen og derefter vælge **Enter**.
 

```
//<Servernavn>/<Sharenavn> /mnt/<lokalt navn> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```
16. Vælg **Save** (Gem), og gå ud af filen.



17. Indtast følgende via terminalen: `sudo mount -a -vvv`, og vælg derefter **Enter**.  
Netværksdrevet er nu tilknyttet som `/mnt/<lokalt navn>`.
18. For at kontrollere, at netværksdrevet er blevet korrekt tilknyttet, kan du indtaste `<df | grep <lokalt navn>>` og derefter vælge **Enter**.  
Navnet på fildelingen bør komme frem.
19. Indtast `sudo mkdir /mnt/<lokalt navn>/<outputmappe>` for at oprette en undermappe i den lokale mappe. `<outputmappe>` er standardplaceringen for din outputmappe.  
NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren kræver mindst to niveauer af indlejrede mapper for at genkende placeringen som et tilknyttet netværksdrev.
20. Genstart instrumentet. Se [Genstart af instrumentet på side 83](#).
21. Konfigurer det tilknyttede faste netværksdrev som standardoutputmappe. Se [Angivelse af det faste netværksdrev som standardoutputmappe på side 18](#).

## Vejledning i tilknytning af NFS

1. Tryk på **Minimize Application** (Minimer program), hvis NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren er åben.
2. Log ind på ilmnadmin.
3. Identificer servernavnet for din NFS-server.  
Servernavnet må ikke indeholde mellemrum. Eksempel:  
Servernavn: `192.168.500.100` eller `Myserver-myinstitute-03`
4. Vælg **Applications** (Programmer).
5. Vælg **Terminal** under Favorites (Favoritter).
6. Indtast `sudo mkdir /mnt/<lokalt navn>`, og vælg derefter **Enter**.  
`<lokalt navn>` er navnet på den nye mappe på dit netværksdrev.
7. Indtast `sudo gedit /etc/fstab`, og vælg derefter **Enter**.
8. Når `fstab`-filen bliver åbnet, skal du indtaste følgende og derefter vælge **Enter**.  
`Server name:/share //mnt/<local name> nfs x-systemd.automount,defaults 0 0`
9. Vælg **Save** (Gem), og gå ud af filen.
10. Indtast følgende via terminalen: `sudo mount -a -vvv`, og vælg derefter **Enter**.  
Netværksdrevet er nu tilknyttet i `/mnt/directory` i mappen `<lokalt navn>`.
11. Opret en ny `<undermappe>` i mappen `<lokalt navn>`. Undermappen er standardplaceringen for din outputmappe.  
NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren kræver mindst to niveauer af indlejrede mapper for at genkende placeringen som et tilknyttet netværksdrev.
12. Genstart instrumentet. Se [Genstart af instrumentet på side 83](#).
13. Konfigurer det tilknyttede faste netværksdrev som standardoutputmappe. Se [Angivelse af det faste netværksdrev som standardoutputmappe på side 18](#).

## Angivelse af det faste netværksdrev som standardoutputmappe

1. Log på ilmnuser.
2. Vælg **Settings** (Indstillinger) i NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaremenuen.
3. Under Default Output Folder (Standardoutputmappe) skal du vælge det tilknyttede faste netværksdrev på placeringen /mnt/<lokalt navn>/<outputmappe>.
4. **[Valgfrit]** Hvis du har valgt **Online Run Setup** (Online kørselskonfiguration) under Run Mode (Kørselstilstand), skal du vælge en indstilling på rullemenuen Hosting Location (Hostinglokation).
5. Vælg **Save** (Gem).

## Import af brugerdefinerede referencegenomer

Nye brugerdefinerede referencegenomer kan kun importeres via administratorkontoen. Du finder en liste over alle kompatible referencegenomer på siden om produktkompatibilitet med NextSeq 1000/2000.

1. Opret et referencegenom via BaseSpace-sekventerings-hub-appen Reference Builder for Illumina Instruments. Du kan finde yderligere oplysninger i *Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help* (Onlinehjælp til appen Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0).
2. Vælg **Process Management** (Processtyring) i kontrolsoftwaren.
3. Kontrollér, at der ikke er nogen igangværende sekventeringskørsler eller sekundære analyser på instrumentet.
4. Vælg **Minimize Application** (Minimer program) i kontrolsoftwaremenuen.
5. Log ind på ilmnadmin.
6. Vælg **DRAGEN** i kontrolsoftwaremenuen.
7. Vælg **View Installed Genomes** (Vis installerede genomer) i afsnittet Genome (Genom) for at få vist en liste over alle de Illumina-genomer og brugerdefinerede genomer, der er installeret p.t.
8. Luk modalen.
9. Vælg **Choose** (Vælg) under Import New Reference Genomes (Import af nye referencegenomer), gå til referencegenomfilen (\*.tar.gz) på det eksterne drev eller det tilknyttede netværksdrev, og vælg derefter **Open** (Åbn).
10. Vælg **Import**.

## Import af baselinefiler for støj

Hvis du bruger DRAGEN Enrichment-arbejdsgangen i somatisk tilstand, kan du anvende en baselinefil for støj til at filtrere sekventeringsstøj eller systematisk støj fra. Du kan downloade brugerdefinerede standardstøjfiler på [Illuminas supporthjemmeside](#) eller oprette en brugerdefineret baselinefil for støj.

## Oprettelse af brugerdefineret baselinefil for støj

Hvis du anvender somatisk tilstand, kan du oprette en brugerdefineret baselinefil for støj. Baselinefilen for støj oprettes ved hjælp af normale prøver, der ikke stemmer overens med den person, som prøverne kommer fra. Det anbefalede antal normale prøver er 50.

Følg en af nedenstående metoder for at oprette en brugerdefineret baselinefil for støj:

- Brug DRAGEN Bio-IT Platform-serveren. Du finder en vejledning i *DRAGEN Bio-IT Platform Online Help* (Onlinehjælp til DRAGEN Bio-IT Platform).
- Brug appen DRAGEN Baseline Builder på BaseSpace-sekventeringshub. Brug BCL Convert-pipelinen under Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) på BaseSpace-sekventeringshub for at generere FASTQ-filer. Når sekventeringskørslen er gennemført, og der er 50 prøver til rådighed, indlæser du FASTQ-filerne i appen DRAGEN Baseline Builder.

## Import af baselinefiler via brugergrænsefladen

Når du har importeret baselinefilen, kan du konfigurere din sekventeringskørsel ved hjælp af DRAGEN Enrichment-arbejdsgangen i somatisk tilstand.

1. Download en standardbaselinefil på [Illuminas supporthjemmeside](#), eller download den brugerdefinerede baselinefil på DRAGEN-serveren eller via appen DRAGEN Baseline Builder.
2. Vælg **Minimize Application** (Minimer program) i kontrolsoftwaremenuen.
3. Log ind på ilmnadmin.
4. Vælg **Applications** (Programmer), og vælg derefter **Favorites** (Favoritter).
5. Vælg **+Other Locations** (+Andre placeringer), og vælg derefter **Computer**.
6. Dobbeltklik på **usr** og derefter på **local** (lokal).
7. Dobbeltklik på **illumina** og derefter på **aux\_files**.
8. Træk støjbaselinefilen til **aux\_files**.

## Import af baselinefiler via terminalen

Når du har importeret baselinefilen, kan du konfigurere din sekventeringskørsel ved hjælp af DRAGEN Enrichment-arbejdsgangen i somatisk tilstand.

1. Download en standardbaselinefil på [Illuminas supporthjemmeside](#), eller download den brugerdefinerede baselinefil på DRAGEN-serveren eller via appen DRAGEN Baseline Builder.
2. Vælg **Minimize Application** (Minimer program) i kontrolsoftwaremenuen.
3. Log ind på ilmnadmin.
4. Vælg **Applications** (Programmer).
5. Vælg **Terminal** under Favorites (Favoritter).
6. Indtast kommandoen nedenfor.

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

## Konfiguration af kørselstilstand

Kørselstilstanden gælder alle kørsler og afgør, hvor der skal indtastes kørselsparametre, og hvordan data skal analyseres.

### Cloud- eller hybridtilstand

1. Vælg **Settings** (Indstillinger) i kontrolsoftwaremenuen.
2. Vælg **Online Run Setup** (Online kørselskonfiguration) under BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support (BaseSpace-sekventeringshub-tjenester og Proactive Support).
3. Konfigurer yderligere indstillinger, som relevant, ved at vælge følgende:
  - a. **Proactive and Run Monitoring** (Proactive og kørselsmonitorering) eller **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive, kørselsmonitorering og lagring).
  - b. Rullemenu for **Hosting Location** (Hostinglokation).
  - c. **[Valgfrit]** Indtast **Private Domain Name** (Privat domænenavn).
4. Vælg **Save** (Gem).

### Lokal eller enkeltstående tilstand

1. Vælg **Settings** (Indstillinger) i kontrolsoftwaremenuen.
2. Vælg **Local Run Setup** (Lokal kørselskonfiguration) under BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support (BaseSpace-sekventeringshub-tjenester og Proactive Support).
3. Konfigurer yderligere indstillinger, som relevant, ved at vælge følgende:
  - a. **Proactive Support Only** (Kun Proactive Support), **Proactive and Run Monitoring** (Proactive og kørselsmonitorering), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive, kørselsmonitorering og lagring) eller **None** (Ingen).



BaseSpace-sekventeringshub tillader kun genindsættelse i køen, hvis der er valgt **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive, kørselsmonitorering og lagring). I tilfælde af et ugyldigt prøveark giver dette valg dig mulighed for at lave rettelser til prøvearket og genindsætte det i kø til demultiplexeringsanalyse. Du finder yderligere oplysninger om genindsættelsesfunktionen på instrumentet under [Genindsættelse af kørsel i kø på side 83](#).

- b. Rullemenu for **Hosting Location** (Hostinglokation).
  - c. **[Valgfrit]** Indtast **Private Domain Name** (Privat domænenavn).
4. Vælg **Save** (Gem).

### Overvejelser vedrørende prøveark til lokal eller enkeltstående tilstand

Du skal anvende prøvearket i filformat v2 for at gennemføre analyse med DRAGEN. Prøvearket i filformat v2 er også kompatibelt med BaseSpace-sekventeringshub-apps, som ikke understøtter

DRAGEN. Du kan finde yderligere oplysninger om oprettelse af et prøveark i filformat v2 under [Indstillinger for prøveark v2 på side 87](#).

## Brugertilpasning af instrumentet

Dette afsnit indeholder oplysninger om, hvordan du konfigurerer de tilgængelige indstillinger for brugertilpasning. Du kan se, hvordan du konfigurerer en standardoutputmappe under [Angivelse af standardplacering for outputmappen på side 15](#).

### Navngivning af instrumentet

1. Vælg **Settings** (Indstillinger) i kontrolsoftwaremenuen.
2. Vælg Instrument Nickname (Instrumentets kaldenavn), og indtast et navn efter eget valg. Navnet vises øverst på alle skærme.
3. Vælg **Save** (Gem).

### Konfiguration af indstillinger for denaturering og fortynding

1. Vælg **Settings** (Indstillinger) i kontrolsoftwaremenuen.
2. Vælg, om bibliotekerne skal denatureres og fortyndes automatisk på instrumentet. Indstillingen vil som standard være den samme som ved den foregående kørsel.
  - Hvis du vil denaturere og fortynde bibliotekerne automatisk på instrumentet, skal du markere afkrydsningsfeltet **Denature and Dilute On Board** (Denaturering og fortynding på instrumentet).
  - Hvis du vil denaturere og fortynde bibliotekerne manuelt, skal du fjerne markeringen i afkrydsningsfeltet **Denature and Dilute On Board** (Denaturering og fortynding på instrumentet).

Du kan finde en vejledning i manuel denaturering og fortynding af biblioteker i *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide* (Vejledning i denaturering og fortynding af biblioteker til NextSeq 1000 og 2000) (dokumentnr. 1000000139235).

### Konfiguration af indstillinger for automatisk tømning af reagenskassetten

1. Vælg **Settings** (Indstillinger) i kontrolsoftwaremenuen.
2. Vælg, om systemet automatisk skal overføre ubrugte reagenser til kammeret med brugte reagenser efter hver kørsel for at strømline bortskaffelsen af reagensaffald efter fuldførelse af en kørsel:
  - Hvis du ønsker automatisk tømning af reagenskassetten, skal du markere afkrydsningsfeltet **Purge Reagent Cartridge** (Tøm reagenskassette).
  - Hvis du vil springe automatisk tømning over, skal du fjerne markeringen i afkrydsningsfeltet **Purge Reagent Cartridge** (Tøm reagenskassette) (dette er standardindstillingen).

Tømningen for ubrugte reagenser forlænger arbejdsgangen med op til 2 timer.

3. Vælg **Save** (Gem).

## Konfiguration af softwareopdateringer

1. Vælg **Settings** (Indstillinger) i kontrolsoftwaremenuen.
2. Vælg, om systemet automatisk skal tjekke, om der er softwareopdateringer:
  - Hvis du ønsker automatisk tjek, skal du vælge afkrydsningsfeltet **Autocheck for software updates** (Tjek automatisk for softwareopdateringer).
  - Hvis du ønsker manuelt tjek, skal du fjerne markeringen i afkrydsningsfeltet **Autocheck for software updates** (Tjek automatisk for softwareopdateringer).

Automatisk tjek for softwareopdateringer kræver en internetforbindelse. Du finder yderligere oplysninger om installation af softwareopdateringer under [Softwareopdateringer på side 75](#).

3. Vælg **Save** (Gem).

## Ændring af LCD-lysstyrke

1. Vælg **Settings** (Indstillinger) i kontrolsoftwaremenuen.
2. Flyt skyderen for LCD-lysstyrke til den ønskede procent.
3. Vælg **Save** (Gem).

## Konfiguration af en proxyserver

Proxyserver-understøttelse er kun tilgængelig i NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware v1.3.

1. Vælg **Settings** (Indstillinger) i kontrolsoftwaremenuen.
2. Vælg de aktuelle proxyindstillinger for at åbne skærmen Proxy Settings (Proxyindstillinger).
3. Markér afkrydsningsfeltet **Enable Proxy** (Aktivér proxy), og indtast derefter serverens IP-adresse.
4. **[Valgfrit]** Hvis proxyserveren kræver godkendelse, skal du markere afkrydsningsfeltet **Requires Username and Password** (Kræver brugernavn og adgangskode) og derefter indtaste brugernavnet og adgangskoden.
5. Vælg **Save** (Gem) for at gemme og validere proxyoplysningerne.
6. Vælg en af følgende muligheder:
  - Vælg **Yes, I'm Finished** (Ja, jeg er færdig) for at genstarte systemet og anvende de nye proxyindstillinger.
  - Vælg **No, Take Me Back** (Nej, før mig tilbage) for at vende tilbage til skærmen Settings (Indstillinger). De nye proxyindstillinger bliver gemt, men de træder ikke i kraft, før du genstarter systemet.

# Materialer og udstyr

I dette afsnit kan du se, hvad der følger med i reagenssættet, og tilhørende opbevaringsbetingelser. Du kan også se, hvilke hjælpematerialer og hjælpeudstyr, du skal købe for at gennemføre protokollen og foretage vedligeholdelse og fejlfinding.


## Sekventeringsmaterialer

Sekventering på NextSeq 1000/2000 kræver et af følgende reagenssæt til engangsbrug: Illumina NextSeq 1000/2000 P2 eller Illumina NextSeq 1000/2000 P3. NextSeq 1000/2000 P2-reagenssættet fås i tre størrelser (100 cyklusser, 200 cyklusser, 300 cyklusser), og NextSeq 1000/2000 P3-reagenssættet fås i fire størrelser (50 cyklusser, 100 cyklusser, 200 cyklusser, 300 cyklusser).

NextSeq 1000-sekventeringssystemet er kun kompatibelt med NextSeq 1000/2000 P2-reagenssættet.

Reagenssættet indeholder kassetten og flowcellen til sekventering. Ved modtagelse af NextSeq 1000/2000 P2-reagenssættet eller Illumina NextSeq 1000/2000 P3-reagenssættet:

- Sæt omgående delene til opbevaring ved de anviste temperaturer for at sikre korrekt ydelse.
- Åbn ikke nogen af de sølvfarvede folieposer, før du får besked om at gøre det.
- Opbevar kassetterne i æsken for at undgå brud på folieposen.
- Opbevar kassetterne, så pilene vender opad.

 Hvis mærkaten på kassetten ikke vender opad, vil det have negativ indvirkning på sekventeringsdataene.

Tabel 2 Sættets dele

Materialer	Antal	Opbevaringstemperatur	Dimensioner
Kassette	1	-25 °C til -15 °C	29,2 cm x 17,8 cm x 12,7 cm (11,5 in x 7 in x 5 in)
Flowcelle	1	2 °C til 8 °C*	21,6 cm x 12,7 cm x 1,9 cm (8,5 in x 5 in x 0,75 in)
RSB with Tween 20	1	-25 °C til -15 °C	4 cm x 6,6 cm x 5 cm (1,6 in x 2,6 in x 2 in)

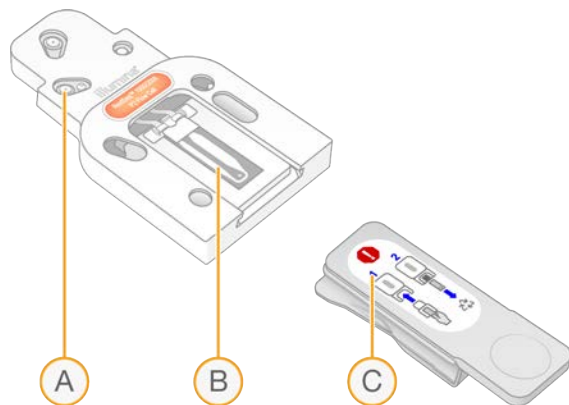
\* Transporteres ved stuetemperatur.

Begge materialer er udstyret med identifikatorer med henblik på sporing og sikring af kompatibilitet. Kassetten og flowcellen anvender RFID<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>radiofrekvensidentifikation

## Flowcelle

Flowcellen er en mønstret flowcelle med en enkelt bane. Den glasbaserede flowcelle er omsluttet af en plastkassette. Flowcellen er dækket af et gråt indføringsstykke, der stikker ud over flowcellens kant, med henblik på sikker håndtering.



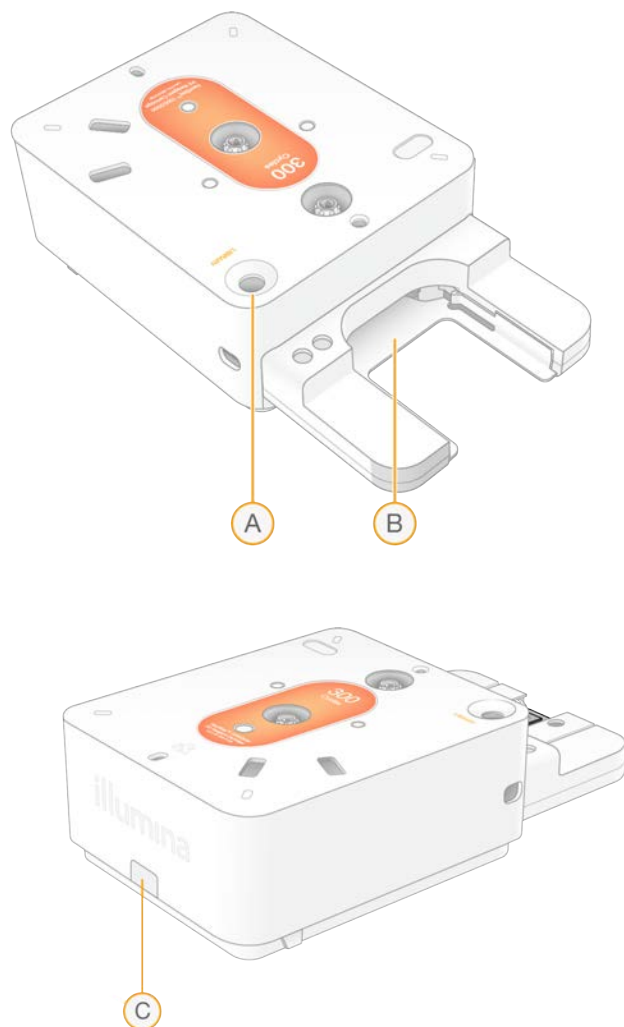
- A. Plastkassette
- B. Flowcelle
- C. Gråt indføringsstykke

Flowcellens indre overflade er dækket af millioner af nanobrønde. I nanobrøndene bliver der genereret clustre, som sekventeringsreaktionen bliver udført ud fra. Nanobrøndenes mønstreformede placering øger outputlæsninger og -data.



## Kassette

Sekventeringsreakvenskassetten leveres fyldt med cluster-, sekventerings-, paired end- og indeksreagenser. Det folieforseglede reservoir er beregnet til biblioteker, og sprækken på forsiden er beregnet til flowcellen.



- A. Biblioteksreservoir
- B. Sprække til flowcelle
- C. Drænprop

Kassetten indeholder alle materialer til en kørsel: reagenser, bibliotek og flowcelle. Biblioteket og flowcellen overføres til den optøede kassette, som så sættes i instrumentet. Efter igangsættelse af kørslen bliver reagenserne og bibliotekerne automatisk overført fra kassetten til flowcellen.

Kassetten indeholder pumper, ventiler og al fluidik til systemet, herunder et reservoir på undersiden til opsamling af brugte reagenser. Eftersom kassetten bliver bortskaffet efter en kørsel, er det ikke nødvendigt at vaske instrumentet.


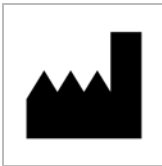



## Understøttet antal cyklusser



Mærkatene på kassetten viser, hvor mange cyklusser der bliver analyseret, ikke hvor mange cyklusser der bliver udført. Flowcellen er kompatibel med alle antal cyklusser og alle læsningstyper.

Alle 100-cyklus- og 200-cyklus-kassetter inkluderer 38 ekstra cyklusser. 300-cyklus-kassetten inkluderer 27 ekstra cyklusser. Eksempel: 300-cyklus-kassetten har tilstrækkelige reagenser til op til 327 sekventeringscyklusser. Du kan finde yderligere oplysninger om antallet af cyklusser, der skal sekventeres, under [Antal cyklusser i en læsning på side 31](#).

## Symbolforklaring

I tabellen nedenfor finder du en forklaring til symbolerne på materialerne og materialernes emballage.

Symbol	Beskrivelse
	Materialets udløbsdato. Brug materialet inden denne dato for at opnå de bedste resultater.
	Angiver fremstilleren (Illumina).
	Forkortelse for Research Use Only. Den tilsigtede brug er altså "Kun til forskningsformål (RUO)".
	Angiver delnummeret, så materialet kan identificeres. <sup>1</sup>
	Angiver batchkoden, der identificerer materialets produktionsbatch eller -parti. <sup>1</sup>

Symbol	Beskrivelse
	Angiver en sundhedsrisiko.
	Opbevaringstemperaturinterval i celsiusgrader. Opbevar materialet inden for det angivne interval. <sup>2</sup>

## Hjælpematerialer

Køb følgende materialer til sekventering og vedligeholdelse

### Materialer til sekventering

Tabel 3 Materialer til sekventering

Materialer	Leverandør	Formål
Engangshandsker, pulverfrie	Almen laboratorieleverandør	Universel brug.
NextSeq 1000/2000 P2 (v3)-reagenssæt	Illumina: katalognr. 20046811 (100 cyklusser) katalognr. 20046812 (200 cyklusser) katalognr. 20046813 (300 cyklusser)	Indeholder reagenskassetten, flowcellen og NextSeq 1000/2000 RSB with Tween 20 til en enkelt kørsel. Kompatibelt med NextSeq 1000 og NextSeq 2000.
NextSeq 2000 P3-reagenssæt	Illumina: katalognr. 20046810 (50 cyklusser) katalognr. 20040559 (100 cyklusser) katalognr. 20040560 (200 cyklusser) katalognr. 20040561 (300 cyklusser)	Indeholder reagenskassetten, flowcellen og NextSeq 1000/2000 RSB with Tween 20 til en enkelt kørsel. Kun kompatibelt med NextSeq 2000.

Materiale	Leverandør	Formål
Mikrorør, 1,5 ml	Fisher Scientific, katalognr. 14-222-158, eller tilsvarende rør med lav binding	Fortynding af biblioteker til overførselskoncentrationen.
Pipettespids, 10 µl	Almen laboratorieleverandør	Fortynding af biblioteker.
Pipettespids, 20 µl	Almen laboratorieleverandør	Fortynding og overførsel af biblioteker.
Pipettespids, 200 µl	Almen laboratorieleverandør	Fortynding af biblioteker.
Pipettespids, 1000 µl	Almen laboratorieleverandør	Gennemhulning af folien på biblioteksreservoiret.
[Valgfri] PhiX Control v3	Illumina, katalognr. FC-110-3001	Udførelse af PhiX-only kørsel eller spiking i en PhiX-kontrol.
[Valgfrit] Papirservietter	Almen laboratorieleverandør	Tørring af kassetten efter vandbad.

## Materialer til vedligeholdelse

Tabel 4 Materialer til vedligeholdelse

Materiale	Leverandør	Formål
Engangshandsker, pulverfrie	Almen laboratorieleverandør	Universel brug.
Udskiftning af luftfilter på NextSeq 1000/2000*	Illumina, katalognr. 20029759	Udskiftning af luftfiltret hver 6. måned.

\* Instrumentet leveres med et stk. monteret og et stk. i reserve. Når de ikke er omfattet af garantien, leveres udskiftninger af brugeren. Opbevares i emballagen indtil brug.

## Hjælpeudstyr

Køb følgende udstyr til sekventeringsformål.

Artikel	Kilde	Formål
Fryser, -25 °C til -15 °C	Almen laboratorieleverandør	Opbevaring af kassetten.
Isspand	Almen laboratorieleverandør	Opbevaring af biblioteker indtil sekventering.
Pipette, 10 µl	Almen laboratorieleverandør	Fortynding af biblioteker til overførselskoncentrationen.

Artikel	Kilde	Formål
Pipette, 20 µl	Almen laboratorieleverandør	Fortynding af biblioteker til overførselskoncentrationen og overførsel af biblioteker til kassetten.
Pipette, 200 µl	Almen laboratorieleverandør	Fortynding af biblioteker til overførselskoncentrationen.
Køleskab, 2 °C til 8 °C	Almen laboratorieleverandør	Opbevaring af flowcellen eller optøning af kassetten.
<p>[Valgfrit] Et af følgende temperaturkontrollerede vandbade eller tilsvarende, som kan holdes ved 25 °C:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermo Scientific Precision 35 l vandbad med cirkulation (kan anvendes til 5 kassetter på samme tid)</li> <li>• SHEL LAB 22 l digitalt vandbad med cirkulation (kan anvendes til 3 kassetter på samme tid)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermo Fisher Scientific, katalognr. TSCIR 35</li> <li>• Shel Lab, katalognr. SWBC22</li> </ul>	Optøning af kassetten.

# Protokol

I dette afsnit finder du en trinvis vejledning i klargøring af materialer, fortynding af biblioteker og konfiguration af en sekventeringskørsel i en af fire kørselstilstande (cloud-tilstand, hybridtilstand eller lokal tilstand ved brug af DRAGEN eller BaseSpace-sekventeringshub eller enkeltstående tilstand, som anvendes til enkeltstående kørsler, der udelukkende er beregnet til generering af cBCL-data i forbindelse med brugerdefinerede analysearbejdsgange).

Anvend sikkerhedsbriller, laboratoriekittel og pulverfrie handsker i forbindelse med håndtering af reagenser og andre kemikalier.

Sørg for, at du har de materialer og det udstyr, du skal bruge, før du starter en protokol. Se [Materialer og udstyr på side 23](#).

Følg protokollerne i den viste rækkefølge, og anvend de angivne voluminer, temperaturer og varigheder.

## Overvejelser i forbindelse med sekventering

Gennemse følgende oplysninger vedrørende fortynding af biblioteker og konfiguration af kørslen, før du starter protokollen. Opnåelse af den optimale overførselskoncentration er meget vigtigt for vellykket sekventering og analyse. Indtastning af det korrekte antal cyklusser i en læsning er med til at sikre optimalt dataoutput.

### Overførselsvolumen og -koncentrationer

Overførselsvoluminet er 20 µl. Overførselskoncentrationen afhænger af bibliotekstypen:

Bibliotekstype	Overførselskoncentration (pM)
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

Bibliotekstype	Overførselskoncentration (pM)
TruSeq DNA Nano 550	1500
TruSeq Stranded mRNA	1000

Den anbefalede indledende overførselskoncentration for andre bibliotekstyper er 650 pM. Denne koncentration skal optimeres i løbet af de efterfølgende kørsler for at fastlægge en overførselskoncentration, som konsekvent frembringer data, der overholder specifikationerne.

**i** | Anvend målingen % Loading Concentration (overførselskoncentrationsprocent) i outputfilen `PrimaryAnalysisMetrics.csv`, som er tilgængelig efter kørslen, til at optimere overførselskoncentrationen. Hvis overførselskoncentrationsprocenten er < 95 %, skal du øge overførselskoncentrationen i trin af 100 pM i løbet af de efterfølgende kørsler.

## Antal cyklusser i en læsning

Indtastning af minimum 26 cyklusser og maksimum 151 cyklusser for hver cyklus er med til at sikre datakvalitet. Det præcise antal cyklusser afhænger af det pågældende eksperiment.

NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren kræver mindst 1 cyklus for læsning 1, men viser en advarsel, hvis antallet af cyklusser i læsning 1 er under 26.

Det samlede antal cyklusser for læsning 1, indeks 1, indeks 2 og læsning 2 kan ikke være højere end antallet af understøttede cyklusser med det pågældende sæt plus 38 cyklusser for sæt med 100 cyklusser og 200 cyklusser og 27 cyklusser for P3-sæt med 300 cyklusser. NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren viser en advarsel, hvis indeks 1 og indeks 2 er mindre end 6 cyklusser.

Advarslen vises ikke, hvis indeks 1 eller indeks 2 er 0 cyklusser.

Det minimale og maksimale antal cyklusser inkluderer en ekstra cyklus. Føj altid en cyklus til den ønskede læsningslængde for at korrigere for virkningerne af faseopdeling og præ-faseopdeling. Læsningslængden er antallet af **sekventeringscyklusser** i læsning 1 og læsning 2, eksklusive ekstra cyklusser og indekscyklusser. Du kan finde yderligere oplysninger under Fasekorrektion i afsnittet [Arbejdsgang i Real-Time Analysis på side 58](#).

Eksempel på kørselskonfiguration:

- For en læsningslængde på 35 (enkeltlæsning): Indtast **36** i feltet Read 1 (Læsning 1).
- For en læsningslængde på 150 pr. læsning (paired-end): Indtast **151** i feltet Read 1 (Læsning 1) og **151** i feltet Read 2 (Læsning 2).

## Planlægning af en sekventeringskørsel på BaseSpace-sekventeringshub

Brug Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) på BaseSpace-sekventeringshub til at oprette og konfigurere dine kørselsindstillinger. Hvis du konfigurerer en kørsel i cloud- eller hybridtilstand, skal du sende kørselskonfigurationen til listen over planlagte kørsler på BaseSpace-sekventeringshub-konto under fanen Planned Runs (Planlagte kørsler). De kørsler, der er tilgængelige til sekventering på NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemer, vises under fanen Planned Runs (Planlagte kørsler). Hvis du konfigurerer en kørsel i lokal tilstand, skal du oprette og eksportere dit prøveark i filformat v2 via Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument). Alternativt kan du oprette et prøveark uden BaseSpace-sekventeringshub ved hjælp af en skabelon. Se [Indstillinger for prøveark v2 på side 87](#).

Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) på BaseSpace-sekventeringshub understøtter ikke mere end 1536 prøver.

### Konfiguration af en kørsel

1. Gå til BaseSpace-sekventeringshub.
2. Indtast din e-mailadresse og din adgangskode til BaseSpace-sekventeringshub, og vælg så **Sign In** (Log på).
3. Vælg fanen **Runs** (Kørsler), og vælg derefter rullelisten **New Run** (Ny kørsel).
4. Vælg **NextSeq 1000/2000**.
5. Indtast et unikt navn efter eget valg i feltet Run Name (Kørselsnavn) for at navngive den pågældende kørsel.  
Kørselsnavnet kan indeholde højst 225 alfanumeriske tegn, mellemrum, tankestreger og understregningstegn.
6. Vælg en af følgende analyseplaceringer.
  - **BaseSpace** – Analyse af sekventeringsdataene i skyen.
  - **Local** (Lokal) – Analyse af sekventeringsdataene på instrumentet eller generering af et prøveark v2 til lokal tilstand eller hybridtilstand.
7. Vælg analysetype og -version.

Du kan finde yderligere oplysninger om sekundære analyser under [Outputfiler til den sekundære DRAGEN-analyse på side 63](#) eller i dokumentationen til BaseSpace-sekventeringshub-appen. Hvis du har valgt analysen DRAGEN Single Cell RNA, kan du finde oplysninger om kompatibilitet med enkeltcelle-RNA-biblioteksklargørings sæt fra tredjeparter på siden om produktfiler til NextSeq 1000/2000.



Ved analyse på instrumentet skal den valgte version stemme overens med den installerede version af DRAGEN på instrumentet. Du kan se, hvilken version af DRAGEN der er installeret på instrumentet, under [DRAGEN-arbejdsgang og -licensopdateringer på side 77](#).



8. **[Valgfrit]** Konfigurer brugerdefinerede indekssæt, som følger.  
Hvis du anvender mere end ét bibliotek, skal bibliotekerne have samme indekxlæsningslængde.
  - a. Vælg **Add Custom Index Adapter Kit** (Tilføj brugerdefineret indeksadaptersæt) på rullelisten Index Adapter Kit (Indeksadaptersæt).
  - b. Vælg en skabelontype, og indtast sættets navn, adaptersekvenser, indeksstrategier og indekssekvenser.  
Sørg for, at adaptersekvenserne for det andet indeks (i5) er i fremadgående retning.
  - c. Vælg **Create New Kit** (Opret nyt sæt).
9. **[Valgfrit]** Konfigurer et brugerdefineret biblioteksklargøringssæt, som følger.
  - a. Vælg **Add Custom Library Prep Kit** (Tilføj brugerdefineret biblioteksklargøringssæt) på rullelisten Library Prep Kit (Biblioteksklargøringssæt).
  - b. Indtast navn, læsningstyper, standardlæsningscyklusser og kompatible indeksadaptersæt for dit brugerdefinerede biblioteksklargøringssæt.
  - c. Vælg **Create New Kit** (Opret nyt sæt).
10. Vælg følgende instrumentindstillinger. Afhængigt af biblioteksklargøringssættet bliver de anbefalede indstillinger automatisk valgt. Nogle biblioteksklargøringssæt har hårdkodet antal indekxlæsninger og læsningstyper, som ikke kan ændres.
  - Biblioteksklargøringssæt
  - Indeksadaptersæt
  - Antal indekxlæsninger
  - Læsningstype
  - Antal sekventeringscyklusser pr. læsning

**i** | Hvis du vælger Not Specified (Ikke specificeret) for biblioteksklargøringssættet, bliver antallet af indekxlæsninger ikke opdateret, før der bliver indtastet indekssekvenser i afsnittet Sample Data (Prøvedata).
11. Indtast prøveoplysninger i regnearket Sample Data (Prøvedata) ved hjælp af en af følgende valgmuligheder. Hvis du vil gruppere prøver til aggregering af data under nedstrømsanalysen, skal du give gruppen et navn i kolonnen Project (Projekt).
  - Vælg **Import Data** (Importér data), og vælg derefter dit prøveark. Sørg for, at dit prøveark opfylder formatkravene. Se [Indstillinger for prøveark v2 på side 87](#). Hvis du ændrer dit prøveark, efter at du har downloadet det, kan det medføre mislykket analyse.
  - Indsæt prøve-id'er og enten brøndplaceringer på indekspladen eller i7- og i5-indekser direkte fra en ekstern fil. Inden du indsætter disse oplysninger, skal du indtaste antallet af prøverækker i feltet Rows (Rækker) og derefter vælge +. Prøve-id'er kan indeholde op til 20 alfanumeriske tegn, bindestreger og understregningstegn.



Indeksplader med fast layout kræver indtastning af brøndplaceringer. Indekser uden fast layout kræver indtastning af i7- og i5-indekser. i5-indekser skal indtastes i fremadgående retning.

- Indtast prøve-id'er og tilsvarende brøndplaceringer eller indekser. Hvis du har valgt Not Specified (Ikke specificeret) for biblioteksklargøringssettet, skal du indtaste indeks 2 (i5)-sekvenser i fremadgående retning.

12. Vælg **Next** (Næste).

## Konfiguration af sekundær analyse

Konfigurer indstillingerne for den valgte analysetype til kørslen. Du kan finde yderligere oplysninger om DRAGEN-analysearbejdsgangene i [Outputfiler til den sekundære DRAGEN-analyse på side 63](#)

### Illumina DRAGEN BCL-konvertering

Følg nedenstående trin for at konfigurere Illumina DRAGEN BCL-konverteringsanalysen.

1. Indtast følgende valgfri indstillinger.

Indstilling	Beskrivelse
AdapterRead1	Adaptersekvens for læsning 1. Hvis du anvender et Illumina-biblioteksklargøringsset, skal du lade feltet AdapterRead1 være tomt.
AdapterRead2	Adaptersekvens for læsning 2. Hvis du anvender et Illumina-biblioteksklargøringsset, skal du lade feltet AdapterRead2 være tomt.
BarcodeMismatchesIndex1	Antallet af tilladte uoverensstemmelser mellem den første indekslæsning og indekssekvens. Standardværdien er 1. Hvis stregkoden er 6 bp, er den anbefalede værdi 0.
BarcodeMismatchesIndex2	Antallet af tilladte uoverensstemmelser mellem den anden indekslæsning og indekssekvens. Standardværdien er 1. Hvis stregkoden er 6 bp, er den anbefalede værdi 0.

Indstilling	Beskrivelse
OverrideCycles	<p>Streng, der anvendes til specificering af UMI-cykler og maskering af cykler i en læsning. Følgende værdier er tilladte:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• N – Angiver cykler, der skal ignoreres.</li> <li>• Y – Angiver sekventeringscykler.</li> <li>• I – Angiver indekscykler.</li> <li>• U – Angiver UMI-cyklusser, der skal trimmes.</li> </ul> <p>De enkelte elementer separeres med semikolonner.                      Eksempler på OverrideCycles-input:                      U8Y143;I8;I8;U8Y143                      N10Y66;I6;N10Y66</p>

2. Vælg, om du vil gemme en kopi af dine FASTQ-filer. Der bliver kun genereret FASTQ-filer, hvis du vælger at beholde FASTQ-filer.
3. Vælg en af følgende indstillinger for FASTQ-outputformat:
  - **gzip** – FASTQ-filer gemmes i gzip-format.
  - **DRAGEN** – FASTQ-filer gemmes i ora-format.
4. Fuldfør kørselskonfigurationen.
  - Hvis du vil sende kørselskonfigurationen til din BaseSpace-sekventeringshub-konto, skal du vælge **Submit Run** (Send kørsel). Kørsler, der bliver sendt til BaseSpace-sekventeringshub, bliver vist på listen over planlagte kørsler og er tilgængelige for systemer i cloud- eller hybridtilstand.
  - Hvis du vil gemme kørselskonfigurationen som et prøveark i filformat v2, skal du vælge **Export Sample Sheet** (Eksportér prøveark) på rullelisten **Submit Run** (Send kørsel). Prøvearket er nødvendigt for at starte kørsler på systemer i lokal tilstand. Denne indstilling er kun tilgængelig, hvis der er valgt Local (Lokal) for analyseplacering.

## Illumina DRAGEN Enrichment

Følg nedenstående trin for at konfigurere Illumina DRAGEN Enrichment-analysen.

1. Vælg et referencegenom.  
Brug om muligt et referencegenom med alt-aware.
2. Vælg en \*.bed-fil, der indeholder de ønskede målområder, eller overfør en ny brugerdefineret fil. Sørg for, at referencegenomet i BED-filen stemmer overens med det referencegenom, der er valgt på trin 1. Anvend følgende navngivningsformat til nye brugerdefinerede BED-filer: `panelnavn_versionsnummer.referencegenom.bed`.

- **Lokal tilstand** – Vælg **Select Custom File (Local)** (Vælg brugerdefineret fil (lokal)) for at overføre den til en enkelt kørsel, eller vælg **Upload Custom File (BaseSpace)** (Overfør brugerdefineret fil (BaseSpace)) for gentagen brug.
  - **Cloud- eller hybridtilstand** – Vælg **Upload Custom File (BaseSpace)** (Overfør brugerdefineret fil (BaseSpace)). Den brugerdefinerede BED-fil er kun tilgængelig i den arbejdsgruppe, som den er overført til.
3. Vælg variationbestemmelsesprogrammet til enten kimceller eller somatiske variationer.
  4. **[Valgfrit]** Hvis du bruger det somatiske variationbestemmelsesprogram, skal du vælge en baselinefil for støj. Se yderligere oplysninger under [Import af baselinefiler for støj på side 18](#).
  5. Vælg et kort/tilpas outputformat.
  6. Vælg, om du vil gemme en kopi af dine FASTQ-filer. Der bliver kun genereret FASTQ-filer, hvis du vælger at beholde FASTQ-filer.
  7. Vælg en af følgende indstillinger for FASTQ-outputformat:
    - **gzip** – FASTQ-filer gemmes i gzip-format.
    - **DRAGEN** – FASTQ-filer gemmes i ora-format.
  8. Fuldfør kørselskonfigurationen.
    - Hvis du vil sende kørselskonfigurationen til din BaseSpace-sekventeringshub-konto, skal du vælge **Submit Run** (Send kørsel). Kørsler, der bliver sendt til BaseSpace-sekventeringshub, bliver vist på listen over planlagte kørsler og er tilgængelige for systemer i cloud- eller hybridtilstand.
    - Hvis du vil gemme kørselskonfigurationen som et prøveark i filformat v2, skal du vælge **Export Sample Sheet** (Eksportér prøveark) på rullelisten **Submit Run** (Send kørsel). Prøvearket og de understøttende filer til sekundær analyse downloades i en \*.zip-mappe og er nødvendige for at starte kørsler på systemer i lokal tilstand. Denne indstilling er kun tilgængelig, hvis der er valgt Local (Lokal) for analyseplacering.

## ILLUMINA DRAGEN GERMLINE

Følg nedenstående trin for at konfigurere Illumina DRAGEN Germline-analysen.

1. Vælg dit referencegenom.  
Brug om muligt et referencegenom med alt-aware.
2. Vælg et kort/tilpas outputformat.
3. Vælg, om du vil gemme en kopi af dine FASTQ-filer. Der bliver kun genereret FASTQ-filer, hvis du vælger at beholde FASTQ-filer.
4. Vælg en af følgende indstillinger for FASTQ-outputformat:
  - **gzip** – FASTQ-filer gemmes i gzip-format.
  - **DRAGEN** – FASTQ-filer gemmes i ora-format.

5. Fuldfør kørselskonfigurationen.

- Hvis du vil sende kørselskonfigurationen til din BaseSpace-sekventeringshub-konto, skal du vælge **Submit Run** (Send kørsel). Kørsler, der bliver sendt til BaseSpace-sekventeringshub, bliver vist på listen over planlagte kørsler og er tilgængelige for systemer i cloud- eller hybridtilstand.
- Hvis du vil gemme kørselskonfigurationen som et prøveark i filformat v2, skal du vælge **Export Sample Sheet** (Eksportér prøveark) på rullelisten **Submit Run** (Send kørsel). Prøvearket og de understøttende filer til sekundær analyse downloades i en \*.zip-mappe og er nødvendige for at starte kørsler på systemer i lokal tilstand. Denne indstilling er kun tilgængelig, hvis der er valgt Local (Lokal) for analyseplacering.

## ILLUMINA DRAGEN RNA

Følg nedenstående trin for at konfigurere Illumina DRAGEN RNA-analysen.

1. Vælg dit referencegenom.  
Brug om muligt et referencegenom uden alt-aware.
2. Vælg dit kort/tilpas outputformat.
3. Vælg, om du vil gemme en kopi af dine FASTQ-filer. Der bliver kun genereret FASTQ-filer, hvis du vælger at beholde FASTQ-filer.
4. Vælg en af følgende indstillinger for FASTQ-outputformat:
  - **gzip** – FASTQ-filer gemmes i gzip-format.
  - **DRAGEN** – FASTQ-filer gemmes i ora-format.
5. **[Valgfrit]** Overfør en RNA-kommentarfil i formatet GTF (Gene Transfer Format).
  - **Lokal tilstand** – Vælg **Select Custom File (Local)** (Vælg brugerdefineret fil (lokal)) for at overføre den til en enkelt kørsel, eller vælg **Upload Custom File (BaseSpace)** (Overfør brugerdefineret fil (BaseSpace)) for gentagen brug.
  - **Cloud- eller hybridtilstand** – Vælg **Upload Custom File (BaseSpace)** (Overfør brugerdefineret fil (BaseSpace)). GTF-filen er kun tilgængelig i den arbejdsgruppe, som den er overført til.

Når der er blevet overført en GTF-fil til en BaseSpace-sekventeringshub-arbejdsgruppe, skal du vælge RNA-kommentarfilen på rullelisten.

6. Vælg, om differentielt udtryk skal aktiveres.
7. Hvis du har aktiveret differentielt udtryk, skal du vælge en kontrol- eller sammenligningsværdi for hver prøve.

I hver sammenligningsgruppe bliver en prøve, der er markeret som kontrol, sammenlignet med alle prøver, der er markeret som sammenligning. Hvis prøven ikke indeholder en kontrol- eller sammenligningsværdi, skal du vælge **na** som værdi.

## 8. Fuldfør kørselskonfigurationen.

- Hvis du vil sende kørselskonfigurationen til din BaseSpace-sekventeringshub-konto, skal du vælge **Submit Run** (Send kørsel). Kørsler, der bliver sendt til BaseSpace-sekventeringshub, bliver vist på listen over planlagte kørsler og er tilgængelige for systemer i cloud- eller hybridtilstand.
- Hvis du vil gemme kørselskonfigurationen som et prøveark i filformat v2, skal du vælge **Export Sample Sheet** (Eksportér prøveark) på rullelisten **Submit Run** (Send kørsel). Prøvearket og de understøttede filer til sekundær analyse downloades i en \*.zip-mappe, hvis der er angivet en valgfri GTF-fil, og er nødvendige for at starte kørsler på systemer i lokal tilstand. Denne indstilling er kun tilgængelig, hvis der er valgt Local (Lokal) for analyseplacering.

## Illumina DRAGEN Single Cell RNA

Følg nedenstående trin for at konfigurere Illumina DRAGEN Single Cell RNA-analysen.

1. Vælg dit referencegenom.  
Brug om muligt et referencegenom uden alt-aware.
2. **[Valgfrit]** Overfør en RNA-kommentarfil i formatet GTF (Gene Transfer Format).
  - **Lokal tilstand** – Vælg **Select Custom File (Local)** (Vælg brugerdefineret fil (lokal)) for at overføre den til en enkelt kørsel, eller vælg **Upload Custom File (BaseSpace)** (Overfør brugerdefineret fil (BaseSpace)) for gentagen brug.
  - **Cloud- eller hybridtilstand** – Vælg **Upload Custom File (BaseSpace)** (Overfør brugerdefineret fil (BaseSpace)). GTF-filen er kun tilgængelig i den arbejdsgruppe, som den er overført til.

Når der er blevet overført en GTF-fil til en BaseSpace-sekventeringshub-arbejdsgruppe, skal du vælge RNA-kommentarfilen på rullelisten.
3. Vælg dit kort/tilpas outputformat.
4. Vælg, om du vil gemme en kopi af dine FASTQ-filer. Der bliver kun genereret FASTQ-filer, hvis du vælger at beholde FASTQ-filer.
5. Vælg en af følgende indstillinger for FASTQ-outputformat:
  - **gzip** – FASTQ-filer gemmes i gzip-format.
  - **DRAGEN** – FASTQ-filer gemmes i ora-format.
6. Vælg den konfiguration, der stemmer overens med typen af biblioteksklargørings sæt.  
Eksempel: Hvis du har valgt biblioteksklargørings sættet Single Cell RNA Library Kit 1, skal du vælge konfigurationstype 1.
7. Vælg stregkodelæsning.
8. **[Valgfrit]** Rediger antallet af baser i stregkoderne og UMI'en. Værdierne bliver automatisk udfyldt på baggrund af biblioteksklargørings sættet og den konfigurationstype, du har valgt.

9. Vælg streng-orientering.
10. **[Valgfrit]** Vælg en fil, der indeholder dine stregkodesequenser, eller overfør en ny brugerdefineret fil.
11. Hvis du bruger en avanceret/brugerdefineret konfigurationstype, skal du indtaste værdierne for antallet af tilsidesættelsescykluser, stregkodeposition og UMI-position.
12. Fuldfør kørselskonfigurationen.
  - Hvis du vil sende kørselskonfigurationen til din BaseSpace-sekventeringshub-konto, skal du vælge **Submit Run** (Send kørsel). Kørsler, der bliver sendt til BaseSpace-sekventeringshub, bliver vist på listen over planlagte kørsler og er tilgængelige for systemer i cloud- eller hybridtilstand.
  - Hvis du vil gemme kørselskonfigurationen som et prøveark i filformat v2, skal du vælge **Export Sample Sheet** (Eksportér prøveark) på rullelisten **Submit Run** (Send kørsel). Prøvearket og de understøttende filer til sekundær analyse downloades i en \*.zip-mappe, hvis der er angivet en valgfri GTF-fil, og er nødvendige for at starte kørsler på systemer i lokal tilstand. Denne indstilling er kun tilgængelig, hvis der er valgt Local (Lokal) for analyseplacering.

## ILLUMINA DRAGEN AMPLICON

Følg nedenstående trin for at konfigurere Illumina DRAGEN Amplicon-analysen.

1. Vælg dit referencegenom.
2. Vælg en \*.bed-fil, der indeholder de ønskede målområder, eller overfør en ny brugerdefineret fil. Sørg for, at referencegenomet i BED-filen stemmer overens med det referencegenom, der er valgt på trin 1. Anvend følgende navngivningsformat til nye brugerdefinerede BED-filer: `panelnavn_versionsnummer.referencegenom.bed`.
  - **Cloud- eller hybridtilstand** – Vælg **Upload Custom File (BaseSpace)** (Overfør brugerdefineret fil (BaseSpace)). Den brugerdefinerede BED-fil er kun tilgængelig i den arbejdsgruppe, som den er overført til.
  - **Lokal tilstand** – Vælg **Select Custom File (Local)** (Vælg brugerdefineret fil (lokal)) for at overføre den til en enkelt kørsel, eller **Upload Custom File (BaseSpace)** (Overfør brugerdefineret fil (BaseSpace)) for gentagen brug.
3. Vælg variationbestemmelsesprogrammet til enten kimceller eller somatiske variationer.
4. Vælg dit kort/tilpas outputformat.
5. **[Lokal]** Vælg, om du vil gemme en kopi af dine FASTQ-filer. Der bliver kun genereret FASTQ-filer, hvis du vælger at beholde FASTQ-filer.
6. Vælg, om du vil gemme en kopi af dine FASTQ-filer. Der bliver kun genereret FASTQ-filer, hvis du vælger at beholde FASTQ-filer.
7. Vælg en af følgende indstillinger for FASTQ-outputformat:
  - **gzip** – FASTQ-filer gemmes i gzip-format.

- **DRAGEN** – FASTQ-filer gemmes i ora-format.

#### 8. Fuldfør kørselskonfigurationen.

- Hvis du vil sende kørselskonfigurationen til din BaseSpace-sekventeringshub-konto, skal du vælge **Submit Run** (Send kørsel). Kørsler, der bliver sendt til BaseSpace-sekventeringshub, bliver vist på listen over planlagte kørsler og er tilgængelige for systemer i cloud- eller hybridtilstand.
- **[Lokal]** Hvis du vil gemme kørselskonfigurationen som et prøveark i filformat v2, skal du vælge **Export Sample Sheet** (Eksportér prøveark) på rullelisten **Submit Run** (Send kørsel). Prøvearket og de understøttende filer til sekundær analyse downloades i en \*.zip-mappe og er nødvendige for at starte kørsler på systemer i lokal tilstand. Denne indstilling er kun tilgængelig, hvis der er valgt Local (Lokal) for analyseplacering.

## Optøning af kassette i pose og flowcelle

På dette trin optøs kassetten *i den uåbnede pose*, og flowcellen klargøres. Optø kassetten i posen på en af følgende tre måder: kontrolleret vandbad, køleskab eller efterladelse ved rumtemperatur. Anvend kassetten umiddelbart efter optøning. Må ikke nedfryses igen. Se [Tilbagesætning af materialer på køl på side 82](#), hvis du ikke kan bruge kassetten umiddelbart efter optøning.

Figur 4 Kasette i pose



### Optøning af kassetten i et kontrolleret vandbad

1. Tag et par nye pulverfrie handsker på, og tag kassetten ud af fryseren.
2. Tag kassetten ud af æsken, men **åbn ikke den sølvfarvede foliepose**.



❗ | Optøning af en brudt eller punkteret pose i vandbad kan medføre mislykket sekventering. Optø i stedet posen ved rumtemperatur eller i køleskabet.

3. Optø kassetten i posen i et kontrolleret vandbad ved 25 °C i 6 timer:

- Sørg for en vanddybde på minimum 9,5-10 cm, uanset hvor mange kassetter du tør op.
- Indstil et temperaturkontrolleret vandbad til 25 °C.
- Vend posen med mærkatsiden opad, og læg den i vandbadet uden at nedsænke den.

❗ | Læg ikke vægt ovenpå kassetten for at nedsænke den. Hvis mærkaten på posen ikke vender opad, eller hvis kassetten vender sig i løbet af optøningen, vil det have negativ indvirkning på sekventeringsdataene.

- Efterlad ikke kassetten i vandbadet i mere end 8 timer.
- Optø ikke flere kassetter samtidigt, end vandbadet er beregnet til. Se kompatible vandbade under [Hjælpeudstyr på side 28](#).
- Undlad at stable kassetterne.

4. Tag kassetten ud af vandbadet, og tør den med papirservietter.

### Optøning af kassetten i køleskabet

1. Tag et par nye pulverfrie handsker på.
2. Tag kassetten ud af fryseren (-25 °C til -15 °C) et døgn før den forventede kørsel.
3. Tag kassetten ud af æsken, men **åbn ikke den sølvfarvede foliepose**.
4. Anbring kassetten ved rumtemperatur, så mærkaten vender opad, og der kan cirkulere luft omkring siderne og toppen.

❗ | Hvis mærkaten på posen ikke vender opad, vil det have negativ indvirkning på sekventeringsdataene.

5. Optø ved rumtemperatur i 6 timer.
6. Anbring kassetten i køleskabet ved 2 °C til 8 °C, så mærkaten vender opad, og der kan cirkulere luft omkring siderne.

❗ | Hvis mærkaten på posen ikke vender opad, vil det have negativ indvirkning på sekventeringsdataene.

7. Optø i køleskabet i 12 timer. Overskrid ikke 72 timer.

### Optøning af kassetten ved rumtemperatur

1. Tag et par nye pulverfrie handsker på.
2. Tag kassetten ud af fryseren (-25 °C til -15 °C).

3. Tag kassetten ud af æsken, men *åbn ikke den sølvfarvede foliepose*.
4. Anbring kassetten, så mærkaten vender opad, og der kan cirkulere luft omkring siderne og toppen.
  - ! Hvis mærkaten på posen ikke vender opad, vil det have negativ indvirkning på sekventeringsdataene.
5. Optø ved rumtemperatur i 9 timer. Overskrid ikke 16 timer.

## Klargøring af flowcellen og kassetten

1. Klargør flowcellen som følger:
  - a. Tag en ny flowcelle ud af køleskabet (2 °C til 8 °C).
  - b. Lad den stå i uåbnet emballage i 10-15 minutter ved rumtemperatur for at forebygge kondensdannelse, når du tager flowcellen ud af emballagen. Ved at klargøre cellen nu er du sikker på, at den opnår rumtemperatur til tiden.
2. Ved optøning i køleskab:
  - a. Tag den optøede kassette ud af køleskabet (2 °C til 8 °C).
  - b. Lad kassetten i uåbnet emballage stå ved rumtemperatur i minimum 15 minutter før sekventering. Overskrid ikke 1 time.

## Fortynding af biblioteker

Ved denaturering og fortynding på instrumentet skal du følge dette trin for at fortynde bibliotekerne til den relevante overførselskoncentration. Valgfri 2 % PhiX<sup>1</sup> spike-in kan tilføjes for yderligere målinger, basediversitet eller positiv kontrol. PhiX spike-in-procenten bør øges til biblioteker med lav basediversitet.

Ved manuel denaturering og fortynding af biblioteker skal du følge *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide* (Vejledning i denaturering og fortynding af biblioteker til NextSeq 1000 og 2000) (dokumentnr. 1000000139235). Dette trin gælder kun denaturering og fortynding på instrumentet.

### Fortynding af bibliotek til 2 nM

1. [Valgfrit] Tag 10 nM PhiX ud af fryseren (-25 °C til -15 °C).  
PhiX er kun nødvendig i forbindelse med en valgfri spike-in eller en PhiX-only-kørsel.
2. [Valgfrit] Optø PhiX ved rumtemperatur i 5 minutter, og udfør derefter kvantificering ved hjælp af en fluorescens-baseret metode, såsom Qubit, for at kontrollere PhiX-koncentrationen.  
Hvis det ikke er muligt at udføre kvantificering, fortsættes der med koncentrationen på 10 nM.
3. Bland kortvarigt biblioteket eller PhiX på en vortexblander, og centrifuger derefter ved 280 × g i 1 minut.

---

<sup>1</sup>PhiX er et lille, brugsklart Illumina-bibliotek med balanceret nukleotidrepræsentation.

- Klargør minimum 24 µl 2 nM bibliotek i et mikrorør med lav binding ved hjælp af RSB with Tween 20 som fortyndingsmiddel.  
Du finder en vejledning til Phix spike-in under [Tilføjelse af en PhiX Control \(Valgfrit\) på side 44](#).
- Bland kortvarigt på vortexblander, og centrifuger så ved 280 × g i 1 minut.

### Fortynding af 2 Nm bibliotek til overførselskoncentration

- Bland følgende voluminer i et mikrorør med lav binding for at klargøre 24 µl bibliotek fortyndet til den relevante overførselskoncentration:

Bibliotekstype*	Overførsels- koncentration (pM)	2 nM bibliotek – volumen (µl)	RSB With Tween 20 – volumen (µl)
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
TruSeq Stranded mRNA	1000	12	12
100 % PhiX	650	7,8	16,2

\* Ved brug af bibliotekstyper, der ikke er nævnt her: Start med en overførselskoncentration på 650 pM, og optimer koncentrationen i forbindelse med de efterfølgende kørsler.

Denne tabel indeholder eksempler på overførselskoncentrationer. NextSeq 1000/2000 er kompatibelt med alle Illumina-biblioteksklargøringsæt, men den optimale overførselskoncentration kan variere.

- Bland kortvarigt på vortexblander, og centrifuger så ved 280 × g i 1 minut.
- Sæt det fortyndede bibliotek på is, indtil du er klar til sekventering.  
Biblioteker, der er blevet fortyndet til overførselskoncentrationen, skal sekventeres samme dag, som de blev fortyndet.

4. Fortsæt som følger.

- Ved tilføjelse af PhiX: Se [Tilføjelse af en PhiX Control \(Valgfrit\)](#) på side 44.
- Ved udeladelse af PhiX eller ved PhiX-only-kørsel: Se [Overførsel af materialer til kassetten](#) på side 44.

### Tilføjelse af en PhiX Control (Valgfrit)

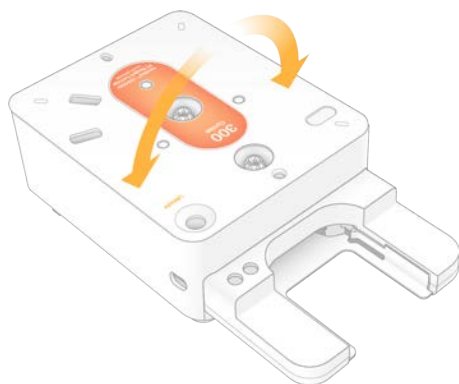
1. Bland følgende voluminer i et mikrorør med lav binding for at klargøre 20 µl 1 nM PhiX:
  - 10 nM PhiX (2 µl)
  - RSB with Tween 20 (18 µl)
2. Bland kortvarigt på vortexblander, og centrifuger så ved 280 × g i 1 minut.
3. Tilsæt 1 µl 1 nM PhiX til 24 µl bibliotek, der er fortyndet til den endelige overførselskoncentration. Disse voluminer resulterer i en PhiX-spike-in på ~2 %. Den reelle procent afhænger af bibliotekets kvalitet og kvantitet.
4. Sæt biblioteket med PhiX spike-in på is, indtil du er klar til sekventering. Biblioteker med PhiX spike-in skal sekventeres samme dag, som de bliver fortyndet.

## Overførsel af materialer til kassetten

På dette trin klargøres kassetten til sekventering ved at blande reagenserne og overføre de fortyndede biblioteker og flowcellen.

### Klargøring af kassetten

1. Åbn kassetteposen ved at trække eller klippe ved et af de indsnit, der findes øverst på posen i begge sider.
2. Tag kassetten ud af posen. Bortskaf posen og tørremidlet.
3. Vend op og ned på kassetten 10 gange for at blande reagenserne. De interne dele i kassetten kan rasle, når du vender op og ned på den. Det er helt normalt.



## Overførsel af flowcellen

1. Åbn den sølvfarvede folieemballage ved at trække eller klippe ved et af de indsnit, der findes øverst på emballagen i begge sider.

Se [Tilbagesætning af materialer på køl på side 82](#), hvis du ikke kan bruge flowcellen med det samme.

2. Træk flowcellen ud af emballagen.

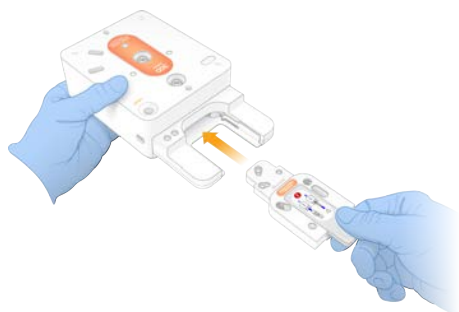
Læg folieemballagen og tørremidlet til side i tilfælde af, at det bliver nødvendigt at sætte flowcellen tilbage på køl. Tørremidlet ligger i en pose i bunden af folieemballagen. Bortskaf folieemballagen og tørremidlet, når sekventeringen går i gang.



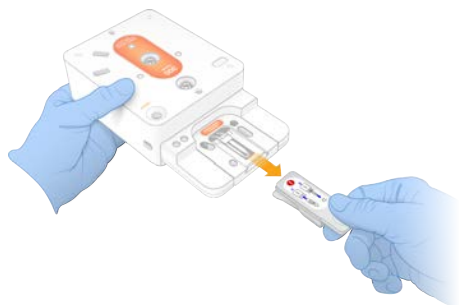
3. Hold flowcellen ved det grå indførsingsstykke med mærkaten pegende opad.

4. Skub flowcellen ind i sprækken på forsiden af kassetten.

Når du hører et klik, er flowcellen på plads. Ved korrekt overførsel stikker det grå indførsingsstykke ud fra kassetten.



5. Træk tilbage i det grå indførsingsstykke for at fjerne det og blotlægge flowcellen. Genbrug indførsingsstykket.



## Overførsel af biblioteker

1. Prik hul på biblioteksreservoiret med en ny P1000-pipettespids, og tryk folien ud til kanterne for at forstørre hullet.
2. Bortskaf pipettespiden for at undgå kontaminering.
3. Tilsæt 20 µl fortyndet bibliotek i *bunden* af reservoiret, idet du langsomt sænker pipettespiden til bunden af reservoiret, før du frigiver indholdet. Undgå kontakt med folien.



## Initiering af en sekventeringskørsel

Følg nedenstående trin for at initiere en sekventeringskørsel i én af fire tilstande:

- **Cloud-tilstand** – Kørslen vælges på en liste over planlagte kørsler i NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren. Under sekventeringen bliver der overført cBCL-data til BaseSpace-sekventeringshub. Efter sekventeringen starter DRAGEN på BaseSpace-sekventeringshub automatisk.
- **Hybridtilstand** – Kørslen vælges på en liste over planlagte kørsler i NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren. Efter sekventeringen starter analysen på instrumentet automatisk. cBCL-data og outputfiler fra den sekundære DRAGEN-analyse bliver gemt i den valgte outputmappe.
- **Lokal tilstand** – Der importeres manuelt et prøveark i filformat v2 til NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren. Efter sekventeringen starter analysen på instrumentet automatisk. cBCL-data og outputfiler fra den sekundære DRAGEN-analyse bliver gemt i den valgte outputmappe. Hvis der er valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring), kan analysen også startes via BaseSpace-sekventeringshub-apps efter fuldførelse af sekventeringen.
- **Enkeltstående tilstand** – Der konfigureres en kørsel i henhold til vejledningen i NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren for at generere cBCL-data.

⚠ | Åbning af afskærmningen under en prækørselskontrol eller kørsel kan forårsage kørselsfejl.

⚠ | Hold hænderne væk fra instrumentet, når afskærmningen åbner og lukker, for at undgå skader.

## Initiering af en cloud- eller hybridkørsel

1. Konfigurer kørselstilstanden, som beskrevet i [Konfiguration af kørselstilstand på side 20](#).

2. Vælg **Start**.

3. Indtast dine brugeroplysninger til BaseSpace-sekventeringshub, og vælg så **Sign In** (Log på).

4. Hvis du har valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring), skal du vælge den arbejdsgruppe, der indeholder den kørsel, som du har oprettet under Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) på BaseSpace-sekventeringshub.

⚠ | Der skal vælges en arbejdsgruppe for at undgå fejl. Kontrollér, at du har valgt en arbejdsgruppe, før du fortsætter.

5. Vælg **Next** (Næste).

6. Vælg din kørsel.

7. Bekræft, at analysen, kørselslængden og den sekundære analyseversion stemmer overens med den korrekte kørsel.

Analysen viser Cloud\_ for at vise, at analysen finder sted på BaseSpace-sekventeringshub.

8. Vælg **Review** (Gennemse).

9. **[Valgfrit]** Indtast placeringer for brugerdefineret læsningsprimer og brugerdefineret indeksprimer. Du kan finde oplysninger om klargøring og tilføjelse af brugerdefinerede primere i *NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide* (Vejledning i brugerdefinerede primere til NextSeq 1000 og 2000) (dokumentnr. 1000000139569). Husk at besøge siden om kompatible produkter vedrørende dit biblioteksklargøringsæt for at tjekke, om det er nødvendigt med brugerdefinerede Illumina-primere.

10. **[Valgfrit]** Vælg en brugerdefineret opskrift. Du kan finde yderligere oplysninger under [Mørkecyklus-sekventering på side 102](#)

Hvis du bruger NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware v1.3 og sættet Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus eller sættet Illumina Stranded mRNA Prep, bliver den brugerdefinerede opskrift automatisk valgt.

11. **[Valgfrit]** Hvis du vil denaturere og fortynde bibliotekerne manuelt, skal du fjerne markeringen i afkrydsningsfeltet **Denature and Dilute On Board** (Denaturering af fortynding på instrumentet).

Se *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide* (Vejledning i denaturering og fortynding af biblioteker til NextSeq 1000 og 2000) (dokumentnr. 1000000139235).

Standardvalget konfigureres i NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwareindstillingerne.

12. **[Valgfrit]** Hvis du vil ændre outputmappen, skal du vælge feltet Output Folder (Outputmappe) og indtaste en ny placering.

Feltet Output Folder (Outputmappe) bliver automatisk udfyldt ud fra dine standardindstillinger og er påkrævet, medmindre du har valgt **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive, kørselsmonitorering og lagring).


Hvis du har valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring), er Save to BaseSpace Sequence Hub (Gem på BaseSpace-sekventeringshub) aktiveret.

Hvis du har valgt Proactive and Run Monitoring (Proactive og kørselsmonitorering), er Save to BaseSpace Sequence Hub (Gem på BaseSpace-sekventeringshub) deaktiveret.

13. Gennemse dine kørselsoplysninger, og vælg derefter **Prep** (Klargør).

## Initiering af en lokal kørsel

1. Konfigurer kørselstilstanden, som beskrevet i [Konfiguration af kørselstilstand på side 20](#).
2. Vælg **Start**.
3. Hvis du har valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring) eller Proactive and Run Monitoring (Proactive og kørselsmonitorering), skal du indtaste dine brugeroplysninger til BaseSpace-sekventeringshub og derefter vælge **Sign In** (Log på).
4. Hvis du har valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring), skal du vælge den BaseSpace-sekventeringshub-arbejdsgruppe, hvor kørslen skal gemmes, og derefter vælge **Next** (Næste).

 Der skal vælges en arbejdsgruppe for at undgå fejl. Kontrollér, at du har valgt en arbejdsgruppe, før du fortsætter.

5. Vælg **Choose...** (Vælg...) under Start With Sample Sheet (Start med prøveark), og gå til prøvearket i v2-format på NextSeq 1000/2000-instrumentet, et eksternt drev eller et tilknyttet netværksdrev. Prøvearkets filnavn må ikke indeholde specialtegn. NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware v1.3 finder automatisk DRAGEN-versionen i prøvearket og beder dig om at skifte version, hvis det er nødvendigt. DRAGEN-versionen skal være installeret på systemet. Du kan finde installationsoplysninger under [Softwareopdateringer på side 75](#).
  - **Instrument Run Setup Used** (Konfiguration af kørsel på instrument anvendt) – Vælg den .zip-mappe, der inderholder v2-prøvearket, og de understøttende filer, hvis relevant. Ellers vælger du v2-prøvearket.
  - **Instrument Run Setup Not Used** (Konfiguration af kørsel på instrument ikke anvendt) – Sørg for, at den understøttende fil til den sekundære analyse er placeret i samme mappe som v2-prøvearket.



- i** | Det valgte prøveark skal være i v2-format. For at oprette et v2-prøveark skal du downloade det prøveark, der blev konfigureret under Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) på BaseSpace-sekventeringshub, eller redigere skabelonen til v2-prøvearket, som du finder på supporthjemmesiden til NextSeq 1000/2000. Du kan finde yderligere oplysninger om prøvearket i v2-format og de tilhørende krav under [Indstillinger for prøveark v2 på side 87](#). Sørg for, at alle de filer, der refereres til i prøvearket, er placeret i den samme mappe som prøvearket.
6. Vælg **Review** (Gennemse).
  7. **[Valgfrit]** Indtast placeringer for brugerdefineret læsningsprimer og brugerdefineret indeksprimer. Du kan finde oplysninger om klargøring og tilføjelse af brugerdefinerede primere i *NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide* (Vejledning i brugerdefinerede primere til NextSeq 1000 og 2000) (dokumentnr. 1000000139569). Husk at besøge siden om kompatible produkter vedrørende dit biblioteksklargøringsæt for at tjekke, om det er nødvendigt med brugerdefinerede Illumina-primere.
  8. **[Valgfrit]** Vælg en brugerdefineret opskrift. Du kan finde yderligere oplysninger under [Mørkecyklus-sekventering på side 102](#). Hvis du bruger NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware v1.3 og sættet Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus eller sættet Illumina Stranded mRNA Prep, bliver den brugerdefinerede opskrift automatisk valgt.
  9. **[Valgfrit]** Hvis du vil denaturere og fortynde bibliotekerne manuelt, skal du fjerne markeringen i afkrydsningsfeltet **Denature and Dilute On Board** (Denaturering og fortynding på instrumentet). Se *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide* (Vejledning i denaturering og fortynding af biblioteker til NextSeq 1000 og 2000) (dokumentnr. 1000000139235). Standardvalget konfigureres i NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwareindstillingerne.
  10. **[Valgfrit]** Hvis du vil ændre outputmappen, skal du vælge feltet Output Folder (Outputmappe) og indtaste en ny placering. Feltet Output Folder (Outputmappe) bliver automatisk udfyldt ud fra dine standardindstillinger og er påkrævet, medmindre du har valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring). Hvis du har valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring), er Save to BaseSpace Sequence Hub (Gem på BaseSpace-sekventeringshub) aktiveret. Hvis du har valgt Proactive and Run Monitoring (Proactive og kørselsmonitorering), er Save to BaseSpace Sequence Hub (Gem på BaseSpace-sekventeringshub) deaktiveret.
  11. Gennemse dine kørselsoplysninger, og vælg derefter **Prep** (Klargør).

## Initiering af en enkeltstående kørsel

1. Konfigurer kørselstilstanden, som beskrevet i [Konfiguration af kørselstilstand på side 20](#).
2. Vælg **Start**.

3. Hvis du har valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring) eller Proactive and Run Monitoring (Proactive og kørselsmonitorering), skal du indtaste dine brugeroplysninger til BaseSpace-sekventeringshub og derefter vælge **Sign In** (Log på).
4. Hvis du har valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring), skal du vælge den BaseSpace-sekventeringshub-arbejdsgruppe, hvor kørslen skal gemmes, og derefter vælge **Next** (Næste).
5. Vælg **Set Up New Run** (Konfigurer en ny kørsel).
6. Indtast et unikt navn efter eget valg i feltet Run Name (Kørselsnavn) for at navngive den pågældende kørsel.  
Kørselsnavnet kan indeholde alfanumeriske tegn, tankestreger, bindestreger og understregningstegn.
7. Vælg hvor mange sekventeringslæsninger, der skal udføres, under Read Type (Læsningstype):
  - **Single Read** (Enkeltlæsning) – Der udføres én læsning, hvilket er den simpleste og hurtigste mulighed.
  - **Paired End** – Der udføres to læsninger, hvilket genererer data af højere kvalitet og mere præcis sammenligning.
8. Indtast antallet af cyklusser, der skal gennemføres i hver læsning:  
Der er ikke noget maksimum for antallet af indekscyklusser, men summen af læsningscyklusser og indekscyklusser skal være lavere end det antal cyklusser, der er angivet på kassetens mærkat, plus 27.

**Read 1** (Læsning 1) – Indtast **1–151** cyklusser.

**Index 1** (Indeks 1) – Indtast antallet af cyklusser for indeks 1 (i7)-primeren. PhiX-only-kørsel: Indtast **0** i begge indeksfelter.

**Index 2** (Indeks 2) – Indtast antallet af cyklusser for indeks 2 (i5)-primeren.

**Read 2** (Læsning 2) – Indtast en værdi op til **151** cyklusser. Denne værdi er typisk identisk med værdien for læsning 1.

9. Hvis du har valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring), skal du vælge **Choose...** (Vælg...) for at importere et prøveark.  
NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware v1.3 finder automatisk DRAGEN-versionen i prøvearket og beder dig om at skifte version, hvis det er nødvendigt. DRAGEN-versionen skal være installeret på systemet. Du kan finde installationsoplysninger under [Softwareopdateringer på side 75](#).

**i** | Det valgte prøveark skal være i v2-format. For at oprette et v2-prøveark skal du downloade det prøveark, der blev konfigureret under Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) på BaseSpace-sekventeringshub, eller redigere skabelonen til v2-prøvearket, som du finder på supporthjemmesiden til NextSeq 1000/2000. Du kan finde yderligere oplysninger om prøvearket i v2-format og de tilhørende krav under [Indstillinger for prøveark v2 på side 87](#). Sørg for, at alle de filer, der refereres til i prøvearket, er placeret i den samme mappe som prøvearket.

10. **[Valgfrit]** Indtast placeringer for brugerdefineret læsningsprimer og brugerdefineret indeksprimer. Du kan finde oplysninger om klargøring og tilføjelse af brugerdefinerede primere i *NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide* (Vejledning i brugerdefinerede primere til NextSeq 1000 og 2000) (dokumentnr. 1000000139569). Husk at besøge siden om kompatible produkter vedrørende dit biblioteksklargørings sæt for at tjekke, om det er nødvendigt med brugerdefinerede Illumina-primere.
11. **[Valgfrit]** Vælg en brugerdefineret opskrift. Du kan finde yderligere oplysninger under [Mørkecyklus-sekventering på side 102](#)
12. **[Valgfrit]** Hvis du vil denaturere og fortynde bibliotekerne manuelt, skal du fjerne markeringen i afkrydsningsfeltet **Denature and Dilute On Board** (Denaturering og fortynding på instrumentet). Se *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide* (Vejledning i denaturering og fortynding af biblioteker til NextSeq 1000 og 2000) (dokumentnr. 1000000139235). Standardvalget konfigureres i NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwareindstillingerne.
13. **[Valgfrit]** Hvis du vil ændre outputmappen, skal du vælge feltet Output Folder (Outputmappe) og indtaste en ny placering.  
Feltet Output Folder (Outputmappe) bliver automatisk udfyldt ud fra dine standardindstillinger og er påkrævet, medmindre du har valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring).
14. Vælg **Prep** (Klargør).

## Overførsel af materialerne til instrumentet


1. Sørg for, at kassetten forinden er blevet optøet og vendt op og ned 10 gange for at blande indholdet, før du overfører flowcellen (det grå indføringsstykke skal fjernes) og det fortyndede bibliotek.
2. Vælg **Load** (Overfør).  
NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren åbner afskærmningen og skubber bakken ud.
3. Anbring kassetten på bakken med mærkaten opad og flowcellen inden i instrumentet. Skub kassetten ind, indtil den låses på plads.



4. Vælg **Close** (Luk). Herefter bliver kassetten trukket på plads, og afskærmningen bliver lukket. NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren viser oplysninger om de scannede materialer efter ~3 minutter.
5. [Valgfrit] Vælg **Eject Cartridge** (Skub kassette ud) for at fjerne kassetten. Afskærmningen åbner efter 1 minut, og kassetten bliver skubbet ud.
6. Vælg **Sequence** (Sekventer).

## Prækørselskontroller

Prækørselskontrollerne omfatter en instrumentkontrol efterfulgt af en fluidikkontrol. I forbindelse med fluidikkontrollen bliver der prikket hul på kassetteforseglingerne, hvilket kan høres som 3-4 knaldende lyde fra instrumentet. Dette er forventeligt. Herefter passerer reagenset igennem flowcellen.

 | Så snart fluidikkontrollen starter, kan materialerne ikke genanvendes.


1. Vent på, at prækørselskontrollen bliver fuldført. Den varer cirka 15 minutter. Kørslen starter automatisk efter vellykket udførelse.
2. Hvis der opstår en fejl i løbet af instrumentkontrollen, skal du vælge **Retry** (Prøv igen) for at gentage kontrollen. Under en igangværende kontrol er cirklen for den pågældende kontrol animeret.
3. Du finder oplysninger om fejlfinding i tilfælde af gentagne fejl under [Løsninger på fejlbeskeder på side 81](#) (Løsninger på fejlbeskeder).

## Overvågning af kørselsstatus

1. Du kan overvåge kørselsstatus og målinger løbende på skærmen Sequencing (Sekventering).
  - **Estimated run completion** (Forventet afslutning af kørsel) – Anslået dato og tidspunkt for kørselens afslutning. Det kræver 10 tidligere kørsler at beregne det forventede tidspunkt for afslutning af kørslen præcist.
  - **Average %Q30** (Gennemsnitlig Q30-%) – Den gennemsnitlige procentdel af basebestemmelser med en Q-score  $\geq 30$ .
  - **Projected Yield** (Forventet udbytte) – Det forventede antal basebestemmelser for kørslen.
  - **Total Reads PF** (PF-læsninger i alt) – Antallet af paired end-clustre (om relevant), der passerer filteret (i millioner).
  - **Real Time Demux** (Demultipleksering i realtid) – Status for demultipleksering, når denne startes i begyndelsen af læsning 2 efter afslutning af læsning 1-, indeks 1- og indeks 2-cykluserne. Statussen vises som Complete (Fuldført), selvom indekscyklusser ikke er udført. Ikke tilgængelig for kørsler i cloud-tilstand.

- **Real Time Alignment** (Alignment i realtid) – Status for alignment med læsning 1, når denne startes i begyndelsen af læsning 2 efter afslutning af læsning 1-, indeks 1- og indeks 2-cyklerne. Ikke tilgængelig for kørsler i cloud-tilstand. Q30- og udbyttemålinger fremkommer efter cyklus 26. (~6 timer efter opstart af kørslen).
2. Du kan overvåge kørselsprocesserne ved at gå til kontrolsoftwaremenuen og vælge **Process Management** (Processtyring).
  3. Vælg **End Run** (Stop kørslen), hvis du vil annullere en kørsel. Du kan finde yderligere oplysninger om annullering af kørsler under [Annullering af en kørsel på side 82](#).
  4. Fjern materialerne fra instrumentet. Fjern kassetten fra instrumentet inden for 3 dage.

## Fjernelse af materialer

1. Vælg **Eject Cartridge** (Skub kassette ud), når sekventeringen er fuldført. Softwaren skubber den brugte kassette ud af instrumentet.
2. Fjern kassetten fra bakken.
3. Tag flowcellen ud af kassetten.
4. Flowcellen indeholder elektroniske dele og skal bortskaffes i henhold til gældende lokale retningslinjer.
5. [Valgfrit] Fjern drænproppen under Illumina-logoet på siden af kassetten, idet du holder kassetten over et passende område (dvs. en vask eller affaldsbeholder) med proppen pegende vandret eller nedad og væk fra dit ansigt. Tømningen af de brugte reagenser skal ske i henhold til gældende lokale retningslinjer. Tømningstiden afhænger af kassetens størrelse, hvis automatisk tømning ikke er aktiveret.  
  
 **Dette reagenssæt indeholder potentielt farlige kemikalier. Inhalation, indtagelse, hudkontakt og øjenkontakt kan resultere i personskader. Anvend beskyttelsesudstyr, herunder briller, handsker og laboratoriekittel, der giver tilstrækkelig beskyttelse mod eksponeringsfaren. Anvendte reagenser skal håndteres som kemisk affald og bortskaffes i overensstemmelse med gældende nationale love og forordninger. Du kan finde yderligere miljø-, sundheds- og sikkerhedsrelaterede oplysninger i sikkerhedsdatabladet (SDS) på [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).**
6. Bortskaf reagenskassetten.  
Eftersom fluidikken bliver bortskaffet sammen med kassetten, er det ikke nødvendigt at vaske instrumentet efter kørslen.
7. Vælg **Close Door** (Luk dør) for at skubbe bakken ind igen og vende tilbage til startskærmen. Softwaren skubber automatisk bakken på plads, og sensorerne kontrollerer, at kassetten er blevet fjernet.

## Rengør kassettebakken

Det er kun nødvendigt at rengøre kassettebakken, hvis der er løbet reagens ud på kassettebakken.

1. Tag kassetten ud af instrumentet.
2. Tag et par nye pulverfri handsker og andet relevant beskyttelsesudstyr på.
3. Spray 10 % blegemiddelopløsning på en klud.
4. Tør kassettebakken over med kluden og straks derefter med en kraftig renseserviet for at fjerne blegemiddelopløsningen.  
Blegemidlet pletter kassettebakken, hvis det ikke bliver fjernet med det samme.
5. Spray 70 % ethanolopløsning på kassettebakken, og tør straks efter med en kraftig renseserviet for at fjerne opløsningen.
6. Sæt kassettebakken tilbage til overførselspositionen.

# Sekventeringsoutput

I dette afsnit finder du en beskrivelse af softwaren Real-Time Analysis, som udfører basebestemmelse, tildeler kvalitetsscorer og udlæser data. Du kan også læse om de forskellige typer af outputfiler, og hvor du finder dem efter en kørsel.

## Oversigt over Real-Time Analysis

NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemer kører RTA3, en implementering af Real-Time Analysis-softwaren, på instrumentets Compute Engine (CE). RTA3 ekstraherer intensiteter fra de billeder, den modtager fra kameraet, udfører basebestemmelse, tildeler kvalitetsscore til basebestemmelserne, sammenligner med PhiX og rapporterer data i InterOp-filer, der kan ses i instrumentets kontrolsoftware.

For at optimere behandlingstiden lagrer RTA3 oplysningerne i hukommelsen. Hvis RTA3 bliver afbrudt, bliver behandlingen ikke genoptaget, og kørselsdata under behandling i hukommelsen går tabt.

### RTA3-input

RTA3 kræver, at der er feltbilleder i den lokale systemhukommelse til behandling. RTA3 modtager kørselsoplysninger og kommandoer fra kontrolsoftwaren.

### RTA3-output

Billeder af hver farvekanal bliver gemt til RTA3 som felter. Ud fra disse billeder frembringer RTA3 et sæt basebestemmelsesfiler med kvalitetsscore og filterfiler. Alle andre output er understøttende outputfiler.

Filtype	Beskrivelse
Basebestemmelsesfiler	Hvert analyseret felt inkluderes i en basebestemmelsesfil (*.cbcl). Felter fra samme bane og overflade bliver aggregeret i 1 *.cbcl-fil for hver bane og overflade.
Filterfiler	Hvert felt frembringer en filterfil (*.filter), som angiver om en cluster passerer filtrene.
Clusterplaceringsfiler	Clusterplaceringsfiler (*.locs) indeholder X- og Y-koordinaterne for hver cluster på et felt. Der bliver genereret en clusterplaceringsfil for hver kørsel.

Outputfiler bruges til nedstrømsanalyse i DRAGEN og BaseSpace-sekventeringshub.

## Fejlhåndtering

RTA3 opretter logfiler og gemmer dem i mappen Logs. Fejl bliver registreret i en tekstfil i filformatet \*.log.

Følgende logfiler bliver overført til den endelige outputplacering efter endt behandling:

info\_00000.log opsummerer vigtige kørselshændelser.

error\_00000.log indeholder en liste over de fejl, der opstod under en kørsel.

warning\_00000.log indeholder en liste over advarsler, der opstod under en kørsel.

## Flowcellefelter

Felter er små billedoptagelsesområder på flowcellen. Kameraet tager ét billede pr. felt.

NextSeq 1000/2000 P2-flowcellen har 132 felter i alt. NextSeq 1000/2000 P3-flowcellen har 264 felter i alt.

Tabel 5 Flowcellefelter

Flowcellekomponent	NextSeq 1000/2000 P2- flowcelle	NextSeq 1000/2000 P3- flowcelle	Beskrivelse
Baner	1	2	Banerne er optisk distinkte kanaler, men de er ikke adskilte med hensyn til fluidik.
Overflader	2	2	P2- og P3-flowcellerne bliver fotograferet på to overflader: toppen og bunden. Den øverste overflade af et felt bliver fotograferet først.
Udsnit pr. bane	6	6	Et udsnit er en kolonne i en flowcellebane.
Felter pr. udsnit	11	11	Et felt er en del af et udsnit og viser et billedområde på flowcellen.
Genererede felter i alt	132	264	Baner × overflader × udsnit × felter pr. udsnit = antal felter i alt.



## Navngivning af felter

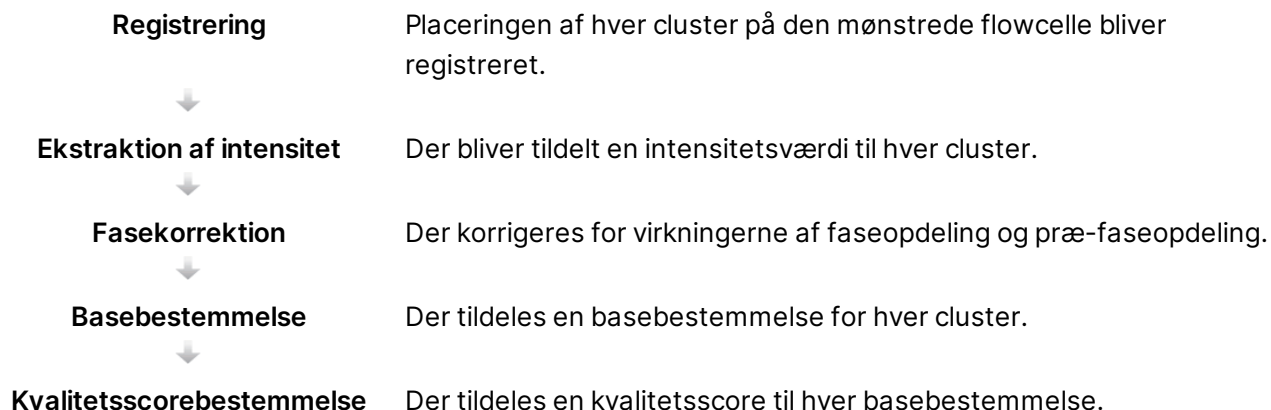
Feltnavnet er et firecifret tal, der afspejler feltets placering på flowcellen. Eksempel: Feltnavn 1205 angiver øverste overflade, udsnit 2, felt 05.

Det første ciffer afspejler overfladen: 1 for toppen eller 2 for bunden.

Det andet ciffer afspejler udsnitsnummeret: 1, 2, 3, 4, 5 eller 6.

De sidste to cifre afspejler feltnummeret. For udsnit nummer 1-4 starter nummereringen med 01 i flowcellens udgangsende til og med 11 i indgangsenden. For udsnit nummer 5-6 starter nummereringen med 01 i indgangsenden og 11 ved udgangsenden.

## Arbejdsgang i Real-Time Analysis



### Registrering

I forbindelse med registreringen bliver et billede sammenlignet med den roterede kvadratiske matrix af nanobrønde på den mønstrede flowcelle. Som følge af nanobrøndenes ordning er X- og Y-koordinaterne for hver cluster på et felt forudbestemt. Clusterplaceringerne gemmes i en clusterplaceringsfil (s.locs) for hver kørsel.

Hvis registreringen mislykkes for et eller flere billeder i en cyklus, bliver der ikke genereret nogen basebestemmelse for det pågældende felt i den pågældende cyklus. Brug Sequencing Analysis Viewer til at identificere, hvilke billeder der ikke er blevet registreret.

### Ekstraktion af intensitet

Efter registreringen bliver der ved ekstraktion af intensitet beregnet en intensitetsværdi for hver nanobrønd på et givet billede. Hvis registreringen mislykkedes, kan der ikke ekstraheres intensitet for det pågældende felt.

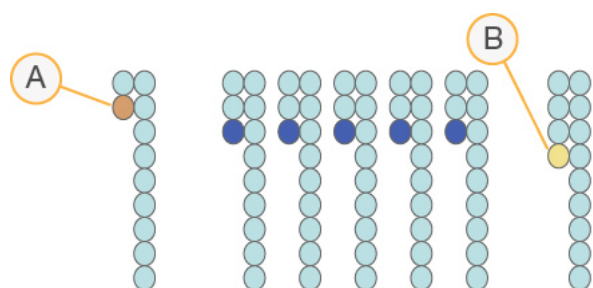
### Fasekorrektion

I løbet af sekventeringsreaktionen udvides hver DNA-streng i en cluster med én base pr. cyklus. Faseopdeling og præ-faseopdeling opstår, når en streng kommer ud af fase med den aktuelle inkorporeringscyklus.

Faseopdeling opstår, når en base kommer bagud.

Præ-faseopdeling opstår, når en base hopper fremad.

Figur 5 Faseopdeling og præ-faseopdeling



- A. Læsning med en faseopdelende base.
- B. Læsning med en præ-faseopdelende base.

RTA3 korrigerer for virkningerne af faseopdeling og præ-faseopdeling, hvilket maksimerer datakvaliteten i hver kørselscyklus.

### Basebestemmelse

Basebestemmelsen bestemmer en base (A, C, G eller T) for hver cluster på et givet felt ved en specifik cyklus. NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemer bruger tokanalssekventering, der kun kræver to billeder til at kode dataene for fire DNA-baser, ét fra den grønne kanal og ét fra den blå kanal.

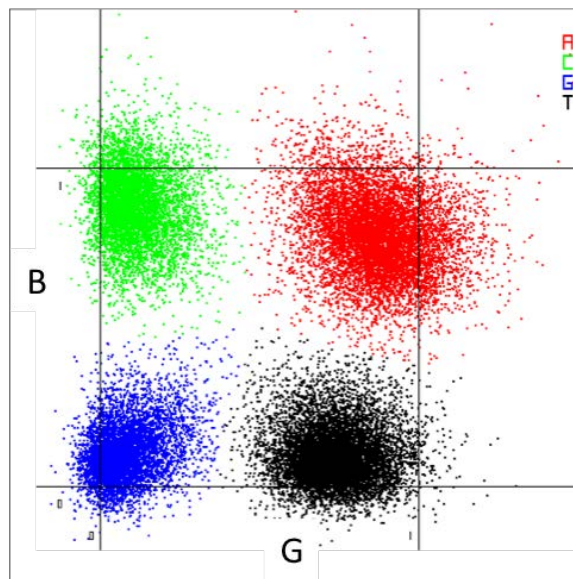
Manglende bestemmelse angives som N. Manglende bestemmelse forekommer, hvis en cluster ikke passerer filteret, hvis registreringen mislykkes, eller hvis en cluster flyttes ud af billedet.

Der bliver ekstraheret intensiteter for hver cluster ud fra det grønne og blå billede, som bliver sammenlignet med hinanden, hvilket resulterer i fire særskilte populationer. Hver population svarer til en base. Basebestemmelsesprocessen afgør, hvilken population den enkelte cluster hører til.

Tabel 6 Basebestemmelser ved sekventering baseret på to kanaler

Base	Grøn kanal	Blå kanal	Resultat
A	1 (til stede)	1 (til stede)	Clustre, som viser intensitet i både den grønne og den blå kanal.
C	0 (ikke til stede)	1 (til stede)	Clustre, som kun viser intensitet i den blå kanal.
G	0 (ikke til stede)	0 (ikke til stede)	Clustre, som ikke viser nogen intensitet på en kendt clusterplacering.
T	1 (til stede)	0 (ikke til stede)	Clustre, som kun viser intensitet i den grønne kanal.

Figur 6 Visualisering af clusterintensiteter



**i** | Farven for hver cluster korrelerer med %Base plots (Baseplot-%) i Sequence Analysis Viewer (SAV) og Data by Cycle (Data efter cyklus) i BaseSpace-sekventeringshub, og det er ikke meningen, at de skal korrelere med den grønne og blå kanal.

## Clustre, der passerer filtret

Under kørslen filtrerer RTA3 rådata og fjerner læsninger, som ikke opfylder kvalitetstærsklen for data. Overlappende clustre og clustre af lav kvalitet bliver fjernet.

I forbindelse med tokanalsanalyse anvender RTA3 et populationsbaseret system til at bestemme renheden (måling af intensitetsrenhed) af basebestemmelserne. Clustre passerer filtret (PF), når der ikke er mere end én basebestemmelse i de første 25 cyklusser, der har en renhed under den fastsatte tærskel. Hvis PhiX-sammenligning er inkluderet, udføres den ved cyklus 26 på et undersæt af felter med clustre, som passerede filteret. Der bliver ikke gennemført basebestemmelse og sammenligning for clustre, som ikke passerer filtret.

## Kvalitetsscorer

En kvalitetsscore (Q-score) er en prognose for sandsynligheden for en ukorrekt basebestemmelse. En høj Q-score betyder, at basebestemmelsen er af høj kvalitet og har højere sandsynlighed for at være korrekt. Når Q-scoren er blevet bestemt, bliver resultaterne registreret i basebestemmelsesfilerne (\*.cbcl).

Q-scoren viser kortfattet små fejlsandsynligheder. Kvalitetsscorer angives som  $Q(X)$ , hvor X er scoren. I nedenstående tabel vises forholdet mellem kvalitetsscoren og fejlsandsynligheden.

Q-Score Q(X)	Fejlsandsynlighed
Q40	0,0001 (1 ud af 10.000)
Q30	0,001 (1 ud af 1.000)
Q20	0,01 (1 ud af 100)
Q10	0,1 (1 ud af 10)

## Kvalitetsscorebestemmelse og -rapportering

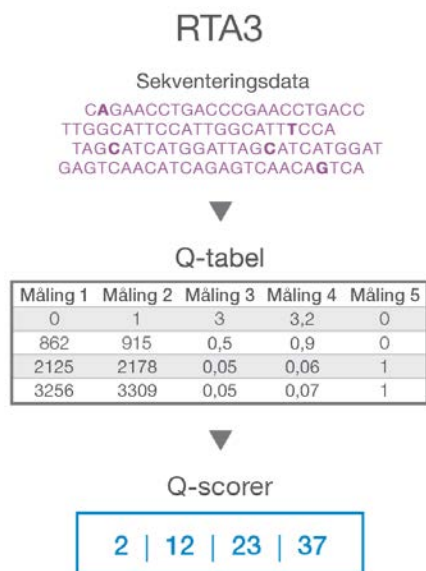
Ved kvalitetsscorebestemmelsen bliver der beregnet et sæt prædiktorer for hver basebestemmelse. Disse prædiktorværdier bliver så anvendt til at finde Q-scoren i en kvalitetstabel. Kvalitetstabellerne har til formål at give kvalitetsprognoser af optimal præcision for kørsler, der er genereret ved en specifik konfiguration af sekventeringsplatformen og kemiversionen.



Kvalitetsscorebestemmelsen er baseret på en modificeret version af Phred-algoritmen.

For at generere Q-tabellen for NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemer blev der fastlagt tre basebestemmelsesgrupper på baggrund af clusterdannelsen med disse specifikke prædiktive funktioner. Efter grupperingen af basebestemmelser blev den gennemsnitlige fejlrate beregnet empirisk for hver af de tre grupper, og de tilhørende Q-scorer blev registreret i Q-tabellen sammen med de prædiktive funktioner, der er forbundet med den pågældende gruppe. Således er der kun tre mulige Q-scorer med RTA3, og disse Q-scorer afspejler den gennemsnitlige fejlrate for den pågældende gruppe ([Simpel Q-scorebestemmelse med RTA3 på side 62](#)). Dette resulterer i en simpel, men samtidig meget præcis kvalitetsscorebestemmelse. De tre grupper i kvalitetstabellen svarer til basebestemmelser af marginal (< Q15), mellem (~Q20) og høj kvalitet (> Q30) og bliver tildelt de specifikke scorere på henholdsvis 12, 23 og 37. Derudover bliver der tildelt en nulscore på 2 til eventuelle manglende bestemmelser. Denne model til rapportering af Q-scorer medfører mindre krav til lagerplads og båndbredde uden at påvirke nøjagtigheden eller ydeevnen.

Figur 7 Sempel Q-scorebestemmelse med RTA3



## Sekventeringsoutputfiler

Filtype	Filbeskrivelse, -placering og -navn
Sammenkædede basebestemmelsesfiler.	<p>Hver analyseret cluster inkluderes i en sammenkædet basebestemmelsesfil, aggregeret i én fil pr. cyklus, bane og overflade. Den aggregerede fil indeholder den sammenkædede basebestemmelse og kodede kvalitetsscore for hver cluster. De sammenkædede basebestemmelsesfiler anvendes af BaseSpace-sekventeringshub eller bcl2fastq2.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1                      L[bane]_[overflade].cbcl, for eksempel: L001_1.cbcl</p>
Clusterplaceringsfiler	<p>En binær clusterplaceringsfil for hver flowcelle inderholder X- og Y-kordinaterne for clustrene i et felt. Koordinaterne er foruddefinerede ud fra et sekskantet layout, der matcher layoutet af nanobrønde i flowcellen.</p> <p>Data/Intensities                      s_[bane].locs</p>
Filterfiler	<p>Filterfilen indeholder oplysninger om, hvorvidt en cluster passerede filterne. Filterfilerne bliver genereret ved cyklus 26 på baggrund af data fra 25 cyklusser. Der genereres én filterfil for hvert felt</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001                      s_[bane]_[felt].filter</p>

Filtype	Filbeskrivelse, -placering og -navn
InterOp-filer	Binære rapporteringsfiler kan ses på instrumentet med instrumentets kontrolsoftware eller uden for instrumentet i SAV eller BaseSpace-sekventeringshub. InterOp-filerne opdateres i løbet af kørslen. InterOp-mappen
Kørselsoplysningsfil	Indeholder kørselsnavnet, antallet af cyklusser i hver læsning, oplysninger om, hvorvidt læsningen er en indeksslæsning, samt antallet af udsnit og felter på flowcellen. Kørselsoplysningsfilen oprettes i starten af kørslen. [Rodmappe], RunInfo.xml

## Outputfiler til den sekundære DRAGEN-analyse

DRAGEN Bio-IT Platform analyserer dit sekventeringsoutput på instrumentet yderligere ved hjælp af en af følgende analyse-pipelines.

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

Dette afsnit indeholder oplysninger om de enkelte DRAGEN-pipelines, herunder oplysninger om outputfiler. Udover at generere filer, der er specifikke for hver pipeline, frembringer DRAGEN målinger fra analysen i filen `<prøvenavn>.metrics.json` og de rapporter, der er beskrevet i [DRAGEN BCL Convert-pipeline på side 68](#). Du kan finde yderligere oplysninger om DRAGEN på [DRAGEN Bio-IT Platform support page](#) (Supportside til DRAGEN Bio-IT Platform).

Alle DRAGEN-pipelines understøtter dekomprimering af BCL-inputfiler og komprimering af BAM/CRAM-outputfiler.

Overvejelser vedrørende outputfiler:

- Når Germline-, RNA-, Enrichment- eller DNA Amplicon-pipeline kører analyse på instrumentet, bliver der ikke overført BAM-filer til BaseSpace-sekventeringshub, hvis der er valgt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, kørselsmonitorering og lagring).

### DRAGEN Enrichment-pipeline

DRAGEN Enrichment-pipeline understøtter følgende funktioner. DRAGEN 3.7 og senere versioner understøtter både kimcelletilstand og somatisk tilstand (kun tumor).

- Demultiplexing af prøver
- Kortlægning og alignment, herunder sortering og markering af dubletter

- Bestemmelse af små variationer
- Bestemmelse af strukturelle variationer

For at udføre variationbestemmelse skal der inkluderes en \*.bed-fil i prøvearket, eller angives en \*.bed-fil under Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) på BaseSpace-sekventeringshub. Der bliver kun genereret bestemmelse af strukturelle variationer for paired-end-læsninger og kimcelletilstand.

Ved brug af DRAGEN Enrichment version 3.8 eller senere skal du indlæse en baselinefil for støj for at forbedre ydeevnen i somatisk tilstand. Se [Import af baselinefiler for støj på side 18](#).

Pipeline genererer følgende outputfiler.

Komponent	Type	Outputfilens navn
Kortlægning/alignment	BAM eller CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.bam eller</li> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.cram</li> </ul>
Bestemmelse af små variationer	VCF og gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>
Bestemmelse af strukturelle variationer	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.sv.vcf.gz</li> </ul>

\* gVCF-outputfiler er kun tilgængelige for kimcelletilstand.

## DRAGEN Germline-pipeline

DRAGEN Germline-pipeline understøtter følgende funktioner:

- Demultiplexing af prøver
- Kortlægning og alignment, herunder sortering og markering af dubletter
- Bestemmelse af små variationer
- Bestemmelse af strukturelle variationer for paired end-læsninger
- Bestemmelse af variationer i kopiantal for humane genomer
- Repeat-ekspansioner for humane genomer
- Homozygositetsområder for humane genomer
- **[DRAGEN v3.8 eller senere]** CYP2D6-detektion

Der bliver kun genereret bestemmelse af strukturelle variationer for paired-end-læsninger.

Pipeline genererer følgende outputfiler.



Komponent	Type	Outputfilens navn
Kortlægning/alignment	BAM eller CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.bam eller</li> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.cram</li> </ul>
Bestemmelse af små variationer	VCF og gVCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>
Bestemmelse af strukturelle variationer	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.sv.vcf.gz</li> </ul>
Variationer i kopianstal	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.cnv.vcf.gz</li> </ul>
Repeat-ekspansion	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.repeats.vcf.gz</li> </ul>
Homozygositetsområder	CSV og BED	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.roh_metrics.csv</li> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.roh.bed</li> </ul>
CYP2D6-detektion	TSV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.cyp2d6.tsv</li> </ul>

## DRAGEN DNA Amplicon-pipeline

DRAGEN-pipelinen understøtter følgende funktioner:

- Demultiplexering af prøver
- Kortlægning og alignment, herunder sortering og markering af dubletter
- Bestemmelse af små variationer i kimcelletilstand eller somatisk tilstand.

For at udføre variationsbestemmelse skal der inkluderes en \*.bed-fil i prøvearket, eller angives en \*.bed-fil under Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) på BaseSpace-sekventeringshub.

Pipelinen genererer følgende outputfiler.

Komponent	Type	Outputfilens navn
Kortlægning/alignment	BAM eller CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.bam eller</li> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.cram</li> </ul>
Bestemmelse af små variationer	VCF og gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>

\* gVCF-outputfiler er kun tilgængelige i kimcelletilstand.

## DRAGEN RNA-pipeline

DRAGEN RNA-pipelinen understøtter følgende funktioner

- Demultiplexering af prøver
- Kortlægning og alignment, herunder sortering og markering af dubletter

- Detektion af genfusioner
- Transkriptkvantificering
- [DRAGEN v3.8 eller senere] Differentiel genekspression

Hvis der skal genereres outputfiler, skal du angive en GTF-fil i prøvearket eller sørge for, at standardfilen `genes.gtf.gz` findes med referencegenomet.

Pipeline genererer følgende outputfiler.

Komponent	Type	Outputfilens navn	Beskrivelse
Kortlægning/alignment	BAM eller CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.bam eller</li> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.cram</li> </ul>	Alignment-output, der opfylder SAM-specifikationerne.
Detektion af genfusioner	almindelig tekst	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.fusion_candidates.preliminary</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fusionskandidater før anvendelse af filtre.</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.fusion_candidates.final</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fusionskandidater efter anvendelse af filtre.</li> </ul>
Transkriptkvantificering	Almindelig tekst	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prøvenavn.quant.genes.sf</li> <li>• prøvenavn.quant.sf</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transkriptkvantificeringsresultater på genniveau.</li> <li>• Alle transkriptkvantificeringsresultater.</li> </ul>
Differentiel ekspression	PNG	Se nedenstående tabel over outputfiler for differentiel ekspression.	For at generere outputfiler skal der konfigureres en sammenligning i prøvearket.

Der bliver genereret følgende filer, når differentiel ekspression er aktiveret.

Filnavn	Beskrivelse
Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv	Indeholder analysemålinger for differentiel ekspression.
Control_vs_Comparison.genes.counts.csv	Beskriver antallet af læsninger, der er knyttet til hvert gen, for hver prøve i kontrol- og sammenligningsgruppen.

Filnavn	Beskrivelse
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Et varmekort over ekspresionen af de differentielt udtrykte gener for prøver i kontrol- og sammenligningsgruppen. Varmekortet viser kun differentielt udtrykte gener med en justeret p-værdi $< -0,05$ . Hvis der er mere end 30 differentielt udtrykte gener, er det kun de 30 højest rangerende, der bliver anvendt. Hvis DESeq1-konvergeringen mislykkes, eller hvis der ikke er nogen differentielt udtrykte gener, bliver filen ikke genereret.
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Indeholder variationen af genekspressionsratioer som en funktion af gennemsnitlig signalintensitet. For at vise forskellene mellem målinger taget i to prøver omsættes dataene til M-skalaen (logratio) og A-skalaen (gennemsnit) på diagrammet, hvorefter værdierne bliver indtegnet. MA-diagrammet viser de $\log_2$ -foldændringer, der kan tilskrives en given variabel over gennemsnittet af normaliserede tællinger for alle prøverne. Hvis den justerede p-værdi er under 0,1, er punkterne røde. Punkter, der falder uden for vinduet, indtegnes som åbne trekanter. Opad pegende trekanter repræsenterer en positiv $\log$ -foldændring. Nedad pegende trekanter repræsenterer en negativ $\log$ -foldændring.
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	Diagrammet viser de første to hovedkomponenter, der forklarer den meste varians.
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Indeholder DESeq2-resultater, som beskriver den gennemsnitlige ekspresion, $\log_2$ (foldændring), standardfejl af $\log_2$ , p-værdi, justeret p-værdi og ekspresionsstatus for hvert gen.
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Indeholder normaliserede $\log$ -transformerede tællinger, der er beregnet af DESeq2.

## DRAGEN Single Cell RNA-pipeline

DRAGEN understøtter følgende funktioner:

- Demultiplexing af prøver
- Kortlægning og alignment, herunder sortering og markering af dubletter
- Celle- og genklassificering

Hvis der skal genereres outputfiler, skal du angive en GTF-fil i prøvearket eller sørge for, at standardfilen `genes.gtf.gz` findes med referencegenomet.

Pipelinen genererer følgende outputfiler.

Komponent	Type	Outputfilens navn
Kortlægning/alignment	BAM eller CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.bam eller</li> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.cram</li> </ul>
Celle-/genklassificering	TSV, CSV og MTX	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.scRNA.barcodeSummary.tsv</li> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.scRNA.genes.tsv</li> <li>• &lt;prøvenavn&gt;.scRNA.matrix.mtx</li> </ul>
Analyserapporter	HTML	<prøvenavn>.dragen.scrna-report.*.html

## DRAGEN BCL Convert-pipeline

DRAGEN BCL Convert-pipelinen genererer en FASTQ-outputfil for hver prøve på baggrund af de BCL-data, der bliver genereret i forbindelse med sekventeringskørslen, og oplysningerne på prøvearket. FASTQ-filens navn er <prøvenavn>.fastq.gz.

Pipelinen genererer følgende rapporter.

Komponent	Type	Outputfilens navn
Demultiplexering	CSV	• Demultiplex_Stats.csv
Adaptermålinger	CSV	• Adapter_Metrics.csv
Ukorrekt indekstildeling	CSV	• Index_Hopping_Counts.csv
Rangliste over ukendte stregkoder	CSV	• Top_Unknown_Barcodes.csv

## Rapport om demultiplexeringsstatistik

Rapporten om demultiplexeringsstatistik indeholder oplysninger om antallet af læsninger, der passerede filteret, for hver prøve i henhold til prøvearket. Læsninger uden tydelig forbindelse med en prøve bliver klassificeret som uafklarede. Rapporten indeholder også oplysninger om kvalitetsscoren for baser i læsninger, der passerede filteret, for hver prøve.

Følgende oplysninger er inkluderet.

Måling	Beskrivelse
Lane	Den bane på flowcellen, hvor prøven blev sekventeret.

Måling	Beskrivelse
SampleID	Prøve-id'et fra prøvearket. Hvis en læsning ikke stemmer overens med en prøve, står der <code>undetermined</code> (uafklaret) i feltet.
Index	Sammenkædning af indeksslæsning 1 og indeksslæsning 2 fra prøvearket, separeret med en bindestreg. Hvis en læsning ikke stemmer overens med en prøve, står der <code>undetermined</code> (uafklaret) i feltet.
# Reads	Antallet af PF-læsninger, der blev demultiplekseret for prøven i den angivne bane.
# Perfect Index Reads	Antallet af læsninger med perfekt overensstemmelse med de kombinerede indekssekvenser, der er angivet i prøvearket.
# One Mismatch Index Reads	Antallet af læsninger med én fejl i de kombinerede indekssekvenser, der er angivet i prøvearket.
# of $\geq$ Q30 Bases (PF)	Antallet af baser, herunder adaptore, der stemmer overens med læsninger, der passerer en kvalitetstærskel på Q30.
Mean Quality Score (PF)	Den gennemsnitlige kvalitetsscore for læsninger, der stemmer overens med prøven i den angivne bane. Værdien inkluderer adapterbaser.

## Rapporter om adaptermålinger

Adaptermålingsfilen indeholder antallet af adapter- og prøvebaser, der er forbundet med hver læsning. Følgende oplysninger er inkluderet.

Måling	Beskrivelse
Lane	Den bane på flowcellen, hvor prøven blev sekventeret.
Sample_ID	Prøve-id'et fra prøvearket. Hvis en læsning ikke stemmer overens med en prøve, står der <code>undetermined</code> (uafklaret) i feltet.
index	Indeks 1-sekvensen fra prøvearket. Feltet er tomt, hvis indekset ikke blev angivet i prøvearket, eller hvis prøve-id-værdien er <code>undetermined</code> (uafklaret).
index2	Indeks 2-sekvensen fra prøvearket. Feltet er tomt, hvis indeks 2 ikke blev angivet i prøvearket, eller hvis prøve-id-værdien er <code>undetermined</code> (uafklaret).
R1_AdapterBases	Antallet af baser i overensstemmelse med adapterlæsning 1 i prøvearket.
R1_SampleBases	Antallet af trimmedede eller maskerede baser fra læsning 1 for den tilsvarende bane og prøve.

Måling	Beskrivelse
R2_ AdapterBases	Antallet af baser i overensstemmelse med adapterlæsning 2 i prøvearket.
R2_ SampleBases	Antallet af trimmedede eller maskerede baser fra læsning 2 for den tilsvarende bane og prøve.
# Reads	Antallet af læsninger for prøven i den angivne bane.

## Rapport om antallet af ukorrekte indekstildelinger

Rapporten om antallet af ukorrekte indekstildelinger indeholder antallet af læsninger for hvert forventet og ukorrekt tildelt indeks for kørsler med dobbelt indeksering. Rapporten inkluderer kun unikke dobbeltindekser pr. bane, hvor der ikke bliver fundet sammenfaldende stregkoder. For at generere målinger af ukorrekte indekstildelinger for en bane skal hvert element-par inden for hvert indeks have en hamming-afstand på mindst  $2N + 1$ , hvor  $N$  er den angivne tolerance for stregkodeuoverensstemmelse for indekset.

Følgende oplysninger er inkluderet.

For kørsler uden indeks, kørsler med enkelt indeks eller baner, der ikke indeholder unikke dobbeltindekser, indeholder filen kun overskrifterne.

Måling	Beskrivelse
Lane	Den bane på flowcellen, hvor prøven blev sekventeret.
# Reads	Antallet af læsninger for prøven i den angivne bane.
SampleID	Prøve-id'et fra prøvearket. Hvis en læsning ikke stemmer overens med en prøve, står der <code>undetermined</code> (uafklaret) i feltet.
index	Indeks 1-sekvensen fra prøvearket. Feltet er tomt, hvis det er en single-end-læsning, eller hvis prøve-id-værdien er <code>undetermined</code> (uafklaret).
index2	Indeks 2-sekvensen fra prøvearket. Feltet er tomt, hvis det er en single-end-læsning, eller hvis prøve-id-værdien er <code>undetermined</code> (uafklaret).

## Rapport med rangliste over ukendte stregkoder

Rapporten med ranglisten over ukendte stregkoder indeholder en top-100 over indekser eller indekspar pr. bane, som ikke blev identificeret i prøvearket i henhold til antallet af tilladte uoverensstemmelser. Hvis der er flere indeksværdier, der bliver rangeret på plads nummer 100, bliver de alle rapporteret på post nr. 100.

Følgende oplysninger er inkluderet:

Måling	Beskrivelse
Lane	Den bane på flowcellen, hvor prøven blev sekventeret.
index	Sekvensen for hvert ukendt indeks i indeksslæsning 1. Feltet er tomt, hvis der ikke bliver fundet nogen ukendte indekser.
index2	Sekvensen for hvert ukendt indeks i indeksslæsning 2. Feltet er tomt, hvis kørslen var med enkeltlæsning, eller hvis der ikke blev fundet nogen ukendte indekser.
# Reads	Antallet af læsninger for prøven i den angivne bane.

## Illumina DRAGEN QC-rapporter

DRAGEN FastQC genererer som standard QC-diagrammer for alle pipelines. Aggregerede QC-resultater gemmes i mappen `AggregatedFastqcMetrics`, og resultaterne pr. prøve gemmes i mappen `<prøvenavn>`.

Der bliver ikke genereret QC-rapporter, hvis antallet af prøver er højere end 512.

Der bliver genereret følgende QC-diagrammer.

QC-diagram	Beskrivelse
<code>adapter_content</code>	Procentdelen af sekvenser for hvert basepar.
<code>positional_mean_quality</code>	Gennemsnitlig basekvalitetsscore for hver læsningsposition på Phred-skala.
<code>gc_content</code>	GC-indhold i procent for hver sekventeringslæsning.
<code>positional_quality.read_1</code>	Gennemsnitlig kvalitetsværdi på Phred-skala for baser med et specifikt nukleotid og på en given placering i læsning 1.
<code>gc_quality</code>	
<code>positional_quality.read_2</code>	Gennemsnitlig kvalitetsværdi på Phred-skala for baser med et specifikt nukleotid og på en given placering i læsning 2.
<code>n_content</code>	
<code>read_length</code>	Sekventeringslængden for hver læsning.
<code>positional_base_content.read_1</code>	Antallet af baser for hvert specifikt nukleotid på givne placeringer i læsning 1.
<code>read_quality</code>	Gennemsnitlig kvalitetsscore på Phred-skala for hver sekventeringslæsning.
<code>positional_base_content.read_2</code>	Antallet af baser for hvert specifikt nukleotid på givne placeringer i læsning 2.

## Outputmappestruktur for sekundær DRAGEN-analyse

DRAGEN genererer som standard outputfiler i den outputmappe, der er valgt under fanen Settings (Indstillinger). DRAGEN genererer en oversigtsrapport for hver arbejdsgang i filen `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`

📄 Inputfiler til kørslen (f.eks. BED- og GTF-filer)

### 📁 sample\_name

#### 📁 enrich\_caller , germline\_seq, dna\_amplicon\_seq, rna\_seq eller scrna\_seq

#### 📁 sample\_name

📄 `*.png`

📄 `dragen_*.log`

📄 `sample_name.*.metrics.csv`

📄 `[DNA] prøvenavn.*.vcf.gz`

📄 `[DNA] prøvenavn.*.gvcf.gz` – Ikke tilgængelig for DRAGEN Bio-IT Platform Amplicon-pipelinen (somatisk).

📄 `prøvenavn.*.bam` eller `prøvenavn.*.cram`

📄 `Logs`

📄 `[RNA] prøvenavn.fusion_candidates.filter_info`

📄 `[RNA] prøvenavn.fusion_candidates.final`

📄 `[RNA] prøvenavn.quant.genes.sf`

📄 `[RNA] prøvenavn.quant.sf`

📄 `prøvenavn.metrics.json`



- 📄 [scRNA] prøve\_dragen-scrna-report.\*.html
- 📄 [scRNA] prøvenavn.scRNA.barcodeSummary.tsv
- 📄 [Germline] prøvenavn.roh\_metrics.csv
- 📄 [Germline] prøvenavn.roh.bed
- 📄 [Germline] prøvenavn.cyp2d6.tsv
- 📄 prøvenavn.fastqc\_metrics.csv
- 📄 prøvenavn.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**– Kun tilgængelig, hvis KeepFastq er indstillet til 'true' (sandt).

- 📄 \*.fastq.gz

📁 **ora\_fastq**– Kun tilgængelig, hvis FastqCompressionFormat er indstillet til 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 – Kun for paired end-læsninger.

##### 0001

dataset.json

##### 0002

dataset.json

Adapter\_Metrics.csv

Demultiplex\_Stats.csv

Index\_Hopping\_Counts.csv

#### Read1Metrics – Kun for paired end-læsninger.

Adapter\_Metrics.csv


Index\_Hopping\_Counts.csv

# Vedligeholdelse

I dette afsnit finder du en beskrivelse af de nødvendige procedurer til vedligeholdelse af et sundt system. Du kan lære, hvordan du installerer softwareopdateringer, skifter luftfilter og udfører anden regelmæssig vedligeholdelse. Ved at holde kontrolsoftwaren opdateret sikrer du, at de seneste rettelser og funktioner er installeret på systemet, så det kan yde optimalt.

## Frigørelse af plads på harddisken

En sekventeringskørsel kræver omkring 200 GB ledig plads på den lokale harddisk. Der bliver vist en advarselsbesked, når der kun er lidt ledig diskplads. Følg nedenstående trin for at frigøre plads ved at slette fuldførte kørsler og installerede referencegenomer fra en midlertidig kørselsmappe.

 Du bør kun slette kørsler ved hjælp af NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren og ikke manuelt via operativsystemet. Manuel sletning af kørsler kan have negativ indvirkning på kontrolsoftwaren.

1. Vælg **Disk Management** (Diskadministration) i kontrolsoftwaremenuen.  
Skærmen Disk Management (Diskadministration) med en liste over gemte kørsler og referencegenomer på harddisken bliver åbnet.
2. Vælg **Delete Run** (Slet kørsel) for den kørsel, du ønsker at slette.  
Når du sletter en kørsel, bliver den lokale kørselsmappe slettet. Outputmappen, som er en kopi af kørselsmappen, bliver bevaret.
3. Vælg **Yes, Delete Run** (Ja, slet kørsel) for at bekræfte, at du vil slette kørslen.
4. Gentag trin 2 og 3 for hver kørsel, som du ønsker at slette.
5. Vælg **Delete Genome** (Slet genom) for det genom, du ønsker at slette.
6. Vælg **Yes, Delete Genome** (Ja, slet genom) i dialogboksen.
7. Gentag trin 5 og 6 for hvert genom, som du ønsker at slette.
8. Luk Disk Management (Diskadministration), når du er færdig, for at vende tilbage til startside.

## Softwareopdateringer

Softwareopdatering sikrer, at systemet har de sidste nye egenskaber og fejlrettelser. Softwareopdateringer samles i en systempakke, som indeholder følgende software:

- NextSeq 1000-/2000-kontrolsoftware
- NextSeq 1000/2000-opskrifter
- Universal Copy Service
- Realtidsanalyse

**i** | DRAGEN-modulerne er ikke inkluderet i systempakken. De skal om nødvendigt installeres separat. Du finder DRAGEN-modulsoftwaren på supportsiderne.

Systemet kan konfigureres til at downloade softwareopdateringer automatisk eller manuelt:

- **Automatic updates** (Automatiske opdateringer) – Opdateringer bliver automatisk downloadet fra BaseSpace-sekventeringshub så du kan installere dem. Denne indstilling kræver en internetforbindelse, men ikke en BaseSpace-sekventeringshub-konto.
- **Manual updates** (Manuelle opdateringer) – Opdateringer downloades manuelt på nettet, gemmes lokalt eller på et eksternt drev, hvorfra de installeres. Denne indstilling kræver ingen internetforbindelse for instrumentet.

### Installation af en automatisk softwareopdatering


1. Kontrollér, at der ikke er nogen igangværende sekventeringskørsler eller sekundære analyser på instrumentet.
2. Log ind på ilmnadmin.
3. Vælg **Software Update** (Softwareopdatering) i kontrolsoftwaremenuen. Systemer, der er konfigureret til automatiske opdateringer, viser en meddelelse, når der er en tilgængelig softwareopdatering.
4. Vælg **Check Online for Software Update** (Tjek for opdateringer online) for at se, om der er en opdatering.
5. Vælg **Update Now** (Opdater nu) for at downloade den nye version af softwaren. Når versionen er blevet downloadet, bliver kontrolsoftwaren lukket, og installationsguiden kommer frem. Kontrolsoftwaren genstartes automatisk. Eventuelle firmwareopdateringer sker automatisk efter genstarten.

**i** | Det er ikke muligt at annullere en opdatering, når installationen er gået i gang. Du kan kun annullere en opdatering i løbet af downloadingen.

### Installation af en manuel softwareopdatering

1. Log ind på ilmnadmin.
2. Kontrollér, at der ikke er nogen igangværende sekventeringskørsler eller sekundære analyser på instrumentet.
3. Når der er en tilgængelig softwareopdatering, skal du downloade installationsprogrammet til pakken (\*.tar.gz) på [supportsiden til NextSeq1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemer](#). Gem installationsprogrammet på et lokalt eller eksternt drev.
4. Hvis du har gemt installationsprogrammet på et eksternt drev, skal du sætte det i en USB 3.0-port på siden eller bagsiden af instrumentet.
5. Gå til kontrolsoftwaren, og vælg **Software Update** (Softwareopdatering) i kontrolsoftwaremenuen.

6. Vælg **Choose...** (Vælg) for at gå til installationsprogrammet.
7. Vælg **Update Now** (Opdater nu) for at starte installationen.  
Kontrolsoftwaren viser en indikator for, at systemet er optaget, under installationen.  
Kontrolsoftwaren genstartes automatisk. Eventuelle firmwareopdateringer sker automatisk efter genstarten.

 | Det er ikke muligt at annullere en opdatering, når installationen er gået i gang. Du kan kun annullere en opdatering i løbet af downloadingen.

## DRAGEN-arbejdsgang og -licensopdateringer

Det er kun administratorer, der kan installere DRAGEN-arbejds gange og forny en DRAGEN-licens.

### Fornyelse af DRAGEN-licens online

Hvis NextSeq 1000/2000 er forbundet til internettet, kan du opdatere din licens til DRAGEN Bio-IT Platform, som følger.

1. Kontakt Illuminas tekniske support for at få en ny licensnøgle.
2. Vent 24 timer på, at licensen bliver opdateret automatisk, eller opdater licensen med det samme, som følger.
  - a. Vælg **DRAGEN** i kontrolsoftwaremenuen.
  - b. Vælg **Check Online** (Tjek online) for at tjekke, om der er en ny licensnøgle til DRAGEN.
  - c. Hvis der er det, skal du vælge **Update** (Opdater).

### Fornyelse af DRAGEN-licens offline

Hvis NextSeq 1000/2000 ikke er forbundet til internettet, kan du opdatere din licens til DRAGEN Bio-IT Platform, som følger.

1. Kontakt Illuminas tekniske support for at få en ny licensnøgle. Gem filen `license.zip` på et lokalt eller eksternt drev.
2. Hvis du har gemt \*.zip-filen på et eksternt drev, skal du sætte det i en USB 3.0-port på siden eller bagsiden af instrumentet. Flyt om nødvendigt instrumentet forsigtigt for at få adgang til bagsiden.
3. Vælg **DRAGEN** i kontrolsoftwaremenuen.
4. Vælg **Choose** (Vælg) for at gå til \*.zip-filen, og vælg derefter **Open** (Åbn).

## Installation af DRAGEN-arbejdsgange online

Hvis NextSeq 1000/2000 er forbundet til internettet, kan du installere DRAGEN-arbejdsgange direkte via NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren. Installation af DRAGEN-arbejdsgange online er kun muligt med NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware v1.3.

1. Vælg **Process Management** (Processtyring) i kontrolsoftwaren.
2. Kontrollér, at der ikke er nogen igangværende sekventeringskørsler eller sekundære analyser på instrumentet.
3. Vælg **DRAGEN** i kontrolsoftwaremenuen.  
Under Version finder du afsnittet Available Workflows (Tilgængelige arbejdsgange), som viser en liste over de arbejdsgange, der er installeret på systemet p.t.
4. For at installere DRAGEN-arbejdsgange via NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren skal du vælge **Check Online** (Tjek online).  
Ikke alle DRAGEN-versioner og -arbejdsgange er kompatible med online installation. Brug offline installation til yderligere arbejdsgange.
5. Markér afkrydsningsfeltet for de arbejdsgange, du vil installere. Hvis den seneste version af BCL Convert ikke allerede er installeret, skal du gøre det først.  
Du kan se oplysninger om den seneste version af en arbejdsgang i produktbemærkningerne.
6. Vælg **Install** (Installer) for at starte installationen.
7. Indtast ilmnadmin for systemets adgangskode, og vælg derefter **Authenticate** (Godkend).

## Installation af DRAGEN-arbejdsgange offline

1. Når der er en tilgængelig opdatering til en DRAGEN-arbejdsgang, skal du downloade installationsprogrammet (\*.tar.gz) fra [supportsidens til DRAGEN](#). Gem installationsprogrammet på et lokalt eller eksternt drev.
2. Hvis du har gemt installationsprogrammet på et eksternt drev, skal du sætte det i en USB 3.0-port på siden eller bagsiden af instrumentet. Flyt om nødvendigt instrumentet forsigtigt for at få adgang til bagsiden.
3. Vælg **Process Management** (Processtyring) i kontrolsoftwaren.
4. Kontrollér, at der ikke er nogen igangværende sekventeringskørsler eller sekundære analyser på instrumentet.
5. Vælg **DRAGEN** i kontrolsoftwaremenuen.
6. Under Version skal du vælge **Browse for New Version** (Søg efter ny version) for at gå til installationsprogrammet.
7. Vælg **Install** (Installer) for at starte installationen.
8. Indtast ilmnadmin for systemets adgangskode, og vælg derefter **Authenticate** (Godkend).

## Udskiftning af luftfilter

Følg nedenstående vejledning for at udskifte et udløbet luftfilter hver 6. måned.

Luftfilteret er en rektangulær kassette til engangsbrug, som dækker ventilatoren på instrumentets højre side. Det sikrer korrekt afkøling og forhindrer indtrængen af snavs i systemet. Instrumentet leveres med ét installeret luftfilter og et ekstra luftfilter. Yderligere ekstrarfiltre er inkluderet i servicekontrakten (hvis en sådan er indgået og aktiv) eller kan købes hos Illumina.

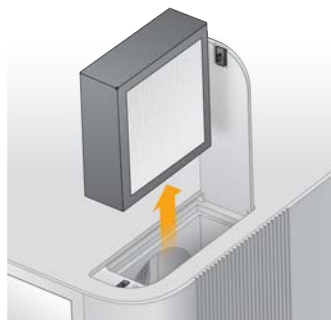
1. Tryk på højre side af toppanelet ovenpå instrumentet for at løsne filteret, som vist nedenfor.



2. Åbn panelet.



3. Tryk på luftfilterkassetten for at frigive den, tag den ud fra midten af panelet, og bortskaf den.



4. Indsæt et nyt filter i kammeret, og tryk på det for at fastgøre det.

5. Luk toppanelet, og tryk det på plads.



6. Sæt instrumentet på plads igen.



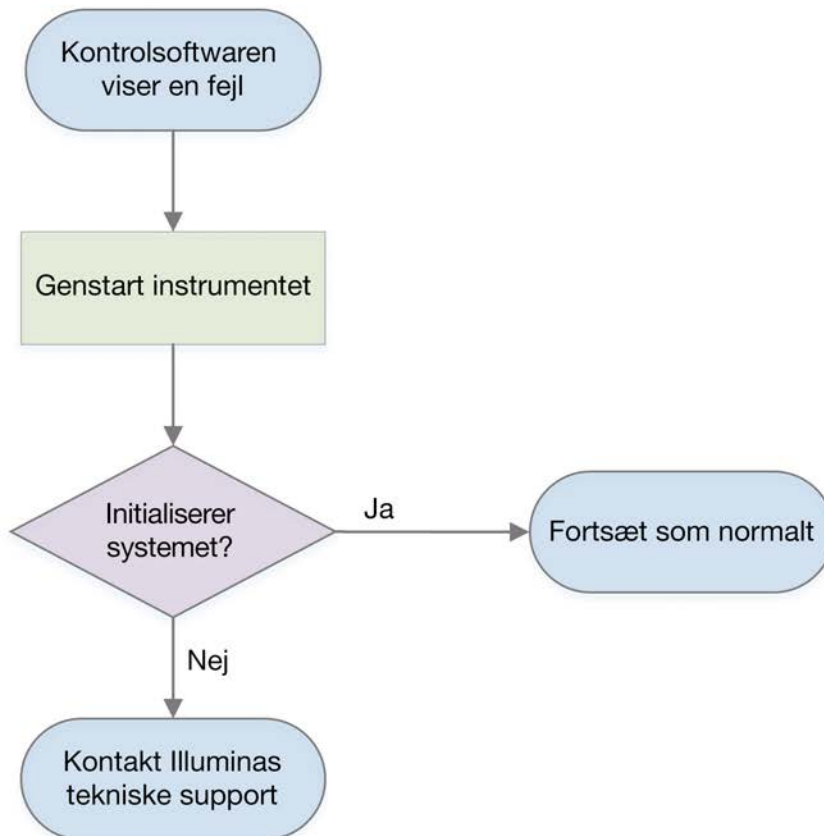
# Fejlfinding

I dette afsnit finder du trinvisse instruktioner i annullering af en kørsel, genstart af instrumentet og andre fejlfindingsprocedurer.

## Løsninger på fejlbeskeder


I dette bilag finder du en detaljeret beskrivelse af diverse trin i forbindelse med fejlfinding. I nedenstående rutediagram finder du en oversigt til fejlfinding i forbindelse med fejlbeskeder, der vises i løbet af initialisering, kørselskonfiguration eller sekventering, og som ikke bliver løst ved at prøve igen.

Mange fejl kan løses med en genstart: Sluk instrumentet, og start det op igen. Se [Genstart af instrumentet på side 83](#) vedrørende yderligere oplysninger om genstart.



## Tilbagesætning af materialer på køl

Følg nedenstående vejledning for at sætte en optøet kassette og flowcelle tilbage på køl i tilfælde af en instrumentfejl under prækørselskontrollen inden fluidikkontrollen.

1. Frigør flowcellen fra kassetten.
2. Fjern og bortskaf fortyndet bibliotek fra reservoiret (op til ~18 µl).
-  | Klargør en frisk fortynding af samme bibliotek til den næste kørsel for at undgå krydskontaminering af prøver på grund af tilbageværende bibliotek i reservoiret.
3. Anbring kassetten i køleskabet ved 2 °C til 8 °C, så mærkaten vender opad, og der kan cirkulere luft omkring alle siderne.  
Overskrid ikke 72 timer. Overskrid ikke 60 timer, hvis kassetten blev tøet op i køleskab i 12 timer natten over.
4. Læg flowcellen tilbage i den originale sølvfarvede folieemballage med tørremidlet.
5. Luk folieemballagen med tape, og anbring den ved 2 °C til 8 °C.  
Overskrid ikke 72 timer.

## annullering af en kørsel

1. Vælg **End Run** (Stop kørslen).
2. Hvis du ønsker automatisk tømning af reagenskassetten, skal du markere afkrydsningsfeltet **Purge Reagent Cartridge** (Tøm reagenskassette).  
Standardvalget konfigureres i NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwareindstillingerne.
3. Vælg **Yes, end the sequencing run** (Ja, stop sekventeringskørslen).  
Hvis en kørsel bliver annulleret, kan den ikke genoptages. Softwaren kan ikke genoptage kørslen, og materialerne kan ikke genanvendes efter instrumentkontrollen i forbindelse med prækørselskontrollen.
4. Vælg **Eject Cartridge** (Skub kassette ud) for at åbne afskærmningen og skubbe bakken ud.
5. Fjern kassetten fra bakken.
6. Læg kassetten til opbevaring, eller kassér den, alt efter hvornår du gennemførte annulleringen:

Omstændighed	Forekomst
Du annullerede før eller under prækørselskontrollen af instrumentet og ønsker at genbruge materialerne.	Se <a href="#">Tilbagesætning af materialer på køl på side 82</a> .
Alle andre omstændigheder.	Se <a href="#">Fjernelse af materialer på side 53</a>

7. Vælg **Close Door** (Luk dør) for at skubbe bakken ind igen og vende tilbage til startskærmen.  
Sensorerne registrerer, at kassetten er blevet fjernet.

## Genindsættelse af kørsel i kø

Hvis der vises en fejl for statussen for den sekundære analyse under Process Management (Processtyring), kan du sætte kørslen i kø igen for at gennemføre DRAGEN-analysen af de genererede cBCL-filer på instrumentet igen. Den oprindelige kørselsmappe skal stadig være på instrumentet for at genindsætte kørslen i køen. Brug af denne genindsættelsesfunktion genindsætter ikke kørsler i køen på BaseSpace-sekventeringshub. Se Fix Sample Sheet (Ret prøveark) i BaseSpace-sekventeringshub-hjælpecenteret for yderligere oplysninger om genindsættelse i køen på BaseSpace-sekventeringshub.

1. Opdater dit prøveark v2, og gem derefter prøvearket på et eksternt drev eller et tilknyttet netværksdrev.
2. Hvis du har gemt prøvearket på et eksternt drev, skal du sætte det i en USB 3.0-port på siden eller bagsiden af instrumentet. Flyt om nødvendigt instrumentet forsigtigt for at få adgang til bagsiden.
3. Vælg **Process Management** (Processtyring) i kontrolsoftwaren.
4. Kontrollér, at der ikke er nogen igangværende sekventeringskørsler eller sekundære analyser på instrumentet.
5. Vælg **Requeue** (Genindsæt i kø) ud for den fuldførte kørsel, der skal genindsættes i køen.
6. Vælg **Choose** (Vælg) for at gå til det opdaterede prøveark, og vælg derefter **Open** (Åbn).
7. Vælg **Start Requeue** (Start genindsættelse i kø).

## Genstart af instrumentet

Ved genstart af instrumentet bliver systemet lukket sikkert ned og genstartet for at genoprette en afbrudt forbindelse, justere en specifikation eller løse et initialiseringsproblem. Softwaren giver besked, hvis systemet skal genstartes for at afhjælpe en fejl eller advarselsstatus.

1. Vælg **Shut Down Instrument** (Luk instrument ned) i kontrolsoftwaremenuen.
2. Hvis systemet ikke lukkes ned, skal du holde strømknappen på højre side af instrumentet nede, indtil lyset forsvinder.
3. Når strømknappen begynder at blinke, skal du trykke på til/fra-knappen på bagsidepanelet, så den står på "slukket" (O).  
Strømknappen bliver muligvis ved med at blinke, efter strømmen er slået fra.

Figur 8 Til/fra-knappens placering.



4. Vent 30 sekunder.
5. Tryk på til/fra-knappen, så den står på "tændt" (I).
6. Når strømknappen begynder at blinke, skal du vente i 30 sekunder og derefter trykke på den.

Figur 9 Strømknappens placering



7. Vent på, at operativsystemet bliver indlæst. Det tager cirka 5 minutter. Log på systemet, når operativsystemet er blevet indlæst.  
Kontrolsoftwaren starter og initialiserer systemet. Vent på, at systemet initialiserer. Det tager cirka 5 minutter. Efter initialiseringen vises startside.

## Gennemførelse af en systemkontrol

Det er ikke nødvendigt at gennemføre systemkontroller i forbindelse med almindelig drift eller vedligeholdelse af instrumentet. Illuminas tekniske support kan imidlertid bede dig om at udføre en systemkontrol i forbindelse med fejlfinding.

Det tager cirka 58 minutter at gennemføre fire subsystemkontroller med henblik på at lokalisere fejl i forbindelse med prækørselskontroller og andre problemer. Testene kontrollerer, om komponenterne er korrekt justeret og funktionelle.

Testresultaterne overføres til mappen `system-check` på placeringen `/usr/local/illumina/system-check`.

Sørg for at fjerne kassetten, før du kører en systemkontrol.

## Kørsel af systemkontrol

1. Vælg **System Checks** (Systemkontroller) i kontrolsoftwaremenuen.
2. Markér afkrydsningsfeltet for de systemkontroller, du vil gennemføre.
  - **Network Connectivity** (Netværksforbindelse) – Kontrollerer netværkets forbindelsesstatus og ydeevne.
  - **Enclosure** (Omslutning) – Kontrollerer ydeevnen af varmesystemet og afskærmningens løftmekanisme.
  - **Motion** (Bevægelse) – Kontrollerer bevægelsesgrænserne for og ydeevnen af Z-plattformen og XY-plattformen.
  - **Optics** (Optik) – Kontrollerer billedoptagelsesmodulets ydeevne.
3. Vælg **Start**.

## Gendannelse til fabriksindstillinger


Gendan systemet til fabriksindstillingerne for at ændre softwaren til en tidligere version eller genoprette systemet efter en uønsket konfiguration. Denne funktion bør kun anvendes af en Illumina-repræsentant.

## Afbildning af installation

Gem en systemafbildning med henblik på sikkerhedskopiering af en funktionel softwareinstallation. Systemafbildningen kan gendannes på et senere tidspunkt. Det anbefales, at du foretager systemafbildningen umiddelbart efter den indledende installation og ændring af din adgangskode sammen med en Illumina-repræsentant.


1. Gentart Linux.
2. Når du bliver bedt om at vælge operativsystem, skal du vælge **Capture Installed Image** (Optag afbildning af installation).

Operativsystemets indstillinger vises kortvarigt, før der automatisk fortsættes til NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren.

 | Eftersom der kun gemmes én afbildning i hukommelsen, bliver den foregående afbildning overskrevet.
3. Vent på, at systemet optager afbildningen af den aktuelle installation. Det tager cirka 30 minutter. Systemet kan genstarte flere gange i løbet af optagelsen. Når systemet er færdig med optagelsen, bliver afbildningen af den aktuelle installation gemt i hukommelsen, og systemet genstarter.

## Gendannelse til optaget billede

Gendan systemet til det senest optagede billede for at gendanne systemet efter en uønsket konfiguration.

1. Gøtart Linux.
2. Når du bliver bedt om at vælge operativsystem, skal du vælge **Restore Installed Image** (Gendannelse til installationsafbildning).  
Operativsystemets indstillinger vises kortvarigt, før der automatisk fortsættes til NextSeq 1000/2000-kontrolsoftwaren.  
 Der er knyttet adgangskoder til systemafbildningen. Efter gendannelsen skal du bruge adgangskoden fra den gendannede afbildning til at logge på systemet.
3. Vent på, at gendannelsen bliver fuldført. Det tager cirka 30 minutter.  
Gendannelsen kan omfatte adskillige genstarter. Når gendannelsen er færdig, genstarter systemet med den gendannede afbildning.

# Ressourcer og referencer

## Indstillinger for prøveark v2

I lokal tilstand kan du bruge prøvearket i filformat v2 til at konfigurere dine kørselsindstillinger. Opret prøvearket via Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument) eller ved at redigere *NextSeq 1000 and NextSeq 2000 Sequencing Systems Sample Sheet v2 Template* (Skabelon til prøveark v2 til NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemer). Når du redigerer prøvearket, skal du sørge for, at følgende afsnit og felter inkluderes i den nævnte rækkefølge og opfylder kravene. Når du har redigeret prøvearket, skal du overføre det til NextSeq 1000- eller NextSeq 2000-sekventeringssystemet ved hjælp af et eksternt drev eller tilknyttet netværksdrev. Når du går til prøvearket i kontrolsoftwaren, bliver det kopieret til en prækørselsmappe på instrumentet, så det eksterne drev kan fjernes.

Sørg for, at indstillingerne for prøveark v2 opfylder følgende krav:

- De indekssekvenser, der er angivet i prøvearksafsnittet BCLConvert\_Data skal stemme overens med det valgte indekssæt i NextSeq 1000/2000.
- Hvis du bruger NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware v1.2, skal den DRAGEN-version, der er angivet i prøvearket, være installeret og aktiv på systemet. Du kan finde installationsoplysninger under [Softwareopdateringer på side 75](#).
- Hvis du bruger NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware v1.3, skal den DRAGEN-version, der er angivet i prøvearket, være installeret på systemet. Kontrolsoftwaren finder automatisk DRAGEN-versionen i prøvearket og beder dig om at skifte den aktive version, hvis det er nødvendigt. Du kan finde installationsoplysninger under [Softwareopdateringer på side 75](#).

Hvis du bruger DRAGEN, er der nogle yderligere indstillinger, du skal konfigurere. Du kan finde yderligere oplysninger under [Indstillinger for DRAGEN-prøveark på side 91](#)

Download skabelonen til prøveark v2 under Product Files (Produktfiler) på supportsiden til NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekventeringssystemer. Hvis du har oprettet et prøveark via Instrument Run Setup (Konfiguration af kørsel på instrument), kan det resultere i analysefejl, hvis du ændrer prøvearket, efter at du har downloadet det.

Filnavne må ikke indeholde specialtegn.

## Krav til [Header]

Afsnittet [Header] indeholder de overordnede oplysninger om din kørsel. Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [Header].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
FileFormatVersion	Ja	Prøvearkets version. Indtast værdien 2.
RunName	Nej	Unikt kørselsnavn efter eget valg. Kørselsnavnet kan indeholde alfanumeriske tegn, understregningstegn, bindestreger og punktummer. Hvis kørselsnavnet indeholder mellemrum eller specialtegn, vil analysen mislykkes.
RunDescription	Nej	Beskrivelse af kørslen.
InstrumentPlatform	Nej	NextSeq 1000/2000
InstrumentType	Nej	NextSeq 1000/2000

## Krav til [Reads]

Afsnittet [Reads] beskriver antallet af anvendte sekventeringscykluser for genom- og indeksslæsning 1 og 2. Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [Reads].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
Read1Cycles	Ja	Antallet af cykluser i den første læsning. Værdien skal være et heltal, der er større end nul.
Read2Cycles	Nej	Antallet af cykluser i den anden læsning.
Index1Cycles	Nej	Antallet af cykluser i den første indeksslæsning. Påkrævet ved sekventering af mere end én prøve. Maksimum er 10 cykluser.
Index2Cycles	Nej	Antallet af cykluser i den anden indeksslæsning. Maksimum er 10 cykluser.



## Krav til [Sequencing\_Settings]

Brug afsnittet [Sequencing\_Settings] til at angive det biblioteksklargørings sæt, du anvender.

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
LibraryPrepKits	Nej	<p>Dit biblioteksklargørings sæt Kun ét biblioteksklargørings sæt er tilladt.</p> <p>I NextSeq 1000/2000-kontrolsoftware v1.3 bliver den påkrævede brugerdefinerede opskrift automatisk valgt, hvis du angiver biblioteksklargørings sæt Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus eller Illumina Stranded mRNA Prep.</p> <p>Angiv en af følgende værdier</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus-sæt: <code>ILMNStrandedTotalRNA</code></li> <li>Illumina Stranded mRNA Prep-sæt: <code>ILMNStrandedmRNA</code></li> </ul>

## Krav til BCL-konvertering

BCL-konverteringsafsnittene indeholder oplysninger om konvertering af dine data fra BCL til FASTQ. BCL-konverteringsfunktionerne har to separate afsnit: [BCLConvert\_Settings] og [BCLConvert\_Data]. BCL-konverteringsafsnittene kræver oplysninger om indeksadaptersekvenser. Se kompatible adaptersekvenser for hver læsning og hvert indeks i *Illumina Adapter Sequences* (Illumina-adaptersekvenser) (dokumentnr. 1000000002694).

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [BCLConvert\_Settings].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Den version af DRAGEN-softwaren, der er installeret på systemet p.t. Anvend alle tre heltal i versionsnavnet. For eksempel 3.5.7.
BarcodeMismatchesIndex1	Nej	Antallet af tilladte uoverensstemmelser mellem den første indeksslæsning og indekssækvens. Værdien kan være 0,1 eller 2. Standardværdien er 1.
BarcodeMismatchesIndex2	Nej	Antallet af tilladte uoverensstemmelser mellem den anden indeksslæsning og indekssækvens. Værdien kan være 0,1 eller 2. Standardværdien er 1.

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
FastqCompressionFormat	Nej	Indtast <code>gzip</code> for at udlæse FASTQ-filer som en *.gz-fil. Indtast <code>dragen</code> for at gemme FASTQ-filer som *.ora-fil og anvende DRAGEN-dekomprimering.
AdapterRead1	Nej	Den sekvens, der skal trimmes eller maskeres fra slutningen af læsning 1. Læsning 1-adaptersekvensen indeholder A, C, G eller T. AdapterRead1 trimmer cyklusser som standard.
AdapterRead2	Nej	Den sekvens, der skal trimmes eller maskeres fra slutningen af læsning 2. Læsning 2-adaptersekvensen indeholder A, C, G eller T. AdapterRead2 trimmer cyklusser som standard.
OverrideCycles	Nej	Streng, der anvendes til specificering af UMI-cyklusser og maskering af cyklusser i en læsning. Følgende værdier er tilladte: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N – Angiver cyklusser, der skal ignoreres.</li> <li>• Y – Angiver sekventeringscyklusser.</li> <li>• I – Angiver indekscyklusser.</li> <li>• U – Angiver UMI-cyklusser, der skal trimmes.</li> </ul> De enkelte elementer separeres med semikolonner. Eksempler på OverrideCycles-input: U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [BCLConvert\_Data].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens id. Prøve-id'et kan indeholde op til 20 alfanumeriske tegn, bindestreger og understregningstegn. Der skelnes mellem store og små bogstaver i prøve-id'et. Adskil de enkelte identifikatorer med bindestreger eller understregningstegn. Eksempel: Prøve1-DQB1-022515.
Index	Nej	Den indekssekvens, der knyttes til prøven. Kun A, C, T, G er tilladt. Påkrævet ved sekventering af mere end én prøve.
Index2	Nej	Den anden indekssekvens, der knyttes til prøven. Kun A, C, T, G er tilladt. Sørg for, at adaptersekvenserne for det andet indeks (i5) er i fremadgående retning. DRAGEN vender automatisk komplement i5-indekser i den sekundære analyse.
Lane	Nej	Flowcellens bane. Banerne angives med et heltal.

## Indstillinger for DRAGEN-prøveark

I dette afsnit finder du en beskrivelse af prøvearkskraverne til hver DRAGEN-pipeline. Tilføj dine indstillinger for DRAGEN-pipelinen som det sidste afsnit på dit prøveark. Du kan kun bruge én DRAGEN-pipeline.

Hver DRAGEN-pipeline har separate afsnit til indstillinger og data.

## Krav til DRAGEN Germline-pipelinen

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [DragenGermline\_Settings].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Den version af DRAGEN-softwaren, der er installeret på systemet p.t. Anvend alle tre heltal i versionsnavnet. For eksempel 3.5.7. Softwareversionen skal stemme overens med den version, der er angivet i afsnittet BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Ja	Referencegenomets navn. For eksempel hg19_alt_aware. Brug navnet på det referencegenom, der findes i <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Du finder oplysninger om brug af et brugerdefineret referencegenom i <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Onlinehjælp til appen Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0).
MapAlignOutFormat	Nej	Outputfilens format. De tilladte værdier er bam og cram. Hvis der ikke angives nogen værdi, er standardværdien 'none' (ingen).
KeepFastq	Nej	Hvis du ønsker at gemme FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>true</code> (sandt). Hvis du ønsker at fjerne FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>false</code> (falsk).

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [DragenGermline\_Data].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens id. Prøve-id'et kan indeholde op til 20 alfanumeriske tegn. Der skelnes mellem store og små bogstaver i prøve-id'et. Adskil de enkelte identifikatorer med binstreger. Eksempel: Prøve1-DQB1-022515. Prøve-id'erne skal stemme overens med de id'er, der er angivet i afsnittet BCLConvert_Data.

## Krav til DRAGEN RNA-pipelinen

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [DragenRNA\_Settings].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Den version af DRAGEN-softwaren, der er installeret på systemet p.t. Anvend alle tre heltal i versionsnavnet. For eksempel 3.5.7. Softwareversionen skal stemme overens med den version, der er angivet i afsnittet BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Ja	Referencegenomets navn. For eksempel hg38_noalt_with_decoy. Brug navnet på det referencegenom, der findes i <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Du finder oplysninger om brug af et brugerdefineret referencegenom i <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Onlinehjælp til appen Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0).
RnaGeneAnnotationFile	Nej	Den fil, der indeholder RNA-gen-kommentarer. Kun alfanumeriske tegn er tilladte. Hvis der ikke angives nogen fil, bliver standardkommentarfilen i det angivne referencegenom anvendt.
MapAlignOutFormat	Nej	Outputfilens format. De tilladte værdier er bam og cram. Hvis der ikke angives nogen værdi, er standardværdien 'none' (ingen).
KeepFastq	Nej	Hvis du ønsker at gemme FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>true</code> (sandt). Hvis du ønsker at fjerne FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>false</code> (falsk).
DifferentialExpressionEnable	Nej	Hvis du ønsker at aktivere differentiell genekspression, skal du indtaste <code>true</code> (sandt). Indtast <code>false</code> (falsk) for at udelukke differentiell genekspression fra analysen.

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [DragenRna\_Data].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens id. Prøve-id'et kan indeholde op til 20 alfanumeriske tegn. Der skelnes mellem store og små bogstaver i prøve-id'et. Adskil de enkelte identifikatorer med bindestreger. Eksempel: Prøve1-DQB1-022515. Prøve-id'erne skal stemme overens med de id'er, der er angivet i afsnittet BCLConvert_Data.
Comparison<N>	Nej	Værdien for kontrol eller sammenligning for hver prøve. Hvis der ikke er nogen kontrol- eller sammenligningsværdi for prøven, får prøven tildelt na. Alle prøver, der er markeret med kontrol, bliver sammenlignet med alle prøver, der er markeret med sammenligning. Værdien N afspejler prøvernes sammenligningsgruppe.

### Krav til DRAGEN Enrichment-pipelinen

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [DragenEnrichment\_Settings].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Den version af DRAGEN-softwaren, der er installeret på systemet p.t. Anvend alle tre heltal i versionsnavnet. For eksempel 3.5.7. Softwareversionen skal stemme overens med den version, der er angivet i afsnittet BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Ja	Referencegenomets navn. For eksempel hg38_alt_aware. Referencegenomerne findes i /usr/local/illumina/genomes. Du finder oplysninger om brug af et brugerdefineret referencegenom i <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Onlinehjælp til appen Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0).
BedFile	Ja	Bed-filen indeholder målområderne.

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
GermlineOrSomatic	Ja	Hvis du ønsker at udføre kimcelle-berigelsesanalyse, skal du indtaste <code>germline</code> (kimcelle). Hvis du ønsker at udføre somatisk berigelsesanalyse, skal du indtaste <code>somatic</code> (somatisk).
KeepFastq	Nej	Hvis du ønsker at gemme FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>true</code> (sandt). Hvis du ønsker at fjerne FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>false</code> (falsk).
MapAlignOutFormat	Nej	Outputfilens format. De tilladte værdier er <code>bam</code> og <code>cram</code> . Hvis der ikke angives nogen værdi, er standardværdien 'none' (ingen).
AuxNoiseBaselineFile	Nej	Navnet på baselinefilen for støj. Du kan bruge filformat <code>*.txt</code> eller <code>*.gz</code> . Baselinefiler for støj er kun tilgængelige i somatisk tilstand. Se yderligere oplysninger under <a href="#">Import af baselinefiler for støj på side 18</a> .

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [DragenEnrichment\_Data].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens id. Prøve-id'et kan indeholde op til 20 alfanumeriske tegn. Der skelnes mellem store og små bogstaver i prøve-id'et. Adskil de enkelte identifikatorer med bindestreger. Eksempel: Prøve1-DQB1-022515. Prøve-id'erne skal stemme overens med de id'er, der er angivet i afsnittet BCLConvert_Data.

## Krav til DRAGEN DNA Amplicon-pipelinen

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [DragenAmplicon\_Settings].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Den version af DRAGEN-softwaren, der er installeret på systemet p.t. Anvend alle tre heltal i versionsnavnet. For eksempel 3.5.7. Softwareversionen skal stemme overens med den version, der er angivet i afsnittet BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Ja	Referencegenomets navn. For eksempel hg38_alt_aware. Referencegenomerne findes i /usr/local/illumina/genomes. Du finder oplysninger om brug af et brugerdefineret referencegenom i <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Onlinehjælp til appen Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0).
DnaBedFile	Ja	Bed-filen indeholder målområderne. Bed-filen kan indlæses i filformat *.txt eller *.gz.
DnaGermlineOrSomatic	Ja	Hvis du ønsker at udføre kimcelle-DNA-amplikonanalyse, skal du indtaste <code>germline</code> (kimcelle). Hvis du ønsker at udføre somatisk DNA-amplikonanalyse, skal du indtaste <code>somatic</code> (somatic).
KeepFastq	Nej	Hvis du ønsker at gemme FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>true</code> (sandt). Hvis du ønsker at fjerne FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>false</code> (falsk).
MapAlignOutFormat	Nej	Outputfilens format. De tilladte værdier er bam og cram. Hvis der ikke angives nogen værdi, er standardværdien 'none' (ingen).



Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [DragenAmplicon\_Data].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens id. Prøve-id'et kan indeholde op til 20 alfanumeriske tegn. Der skelnes mellem store og små bogstaver i prøve-id'et. Adskil de enkelte identifikatorer med bindestreger. Eksempel: Prøve1-DQB1-022515. Prøve-id'erne skal stemme overens med de id'er, der er angivet i afsnittet BCLConvert_Data.
DnaOrRna	Ja	Typen af ampliconanalyse, der skal udføres. DRAGEN v3.8 understøtter kun DNA-analyse. Indtast dna.

### Krav til DRAGEN Single Cell RNA-pipelinen

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [DragenSingleCellRNA\_Settings]. Du kan finde oplysninger om kompatibilitet med tredjepartssæt på supportsiden om produktkompatibilitet på DRAGEN Bio-IT Platform.

#### Single Cell-bibliotekssæt 1—5

Følgende indstillinger for prøveark gør sig gældende for biblioteksklargøringssæt med samme genetiske struktur som DRAGEN Single Cell-bibliotekssæt 1—5. Se supportsiden om produktkompatibilitet på DRAGEN Bio-IT Platform for at kontrollere den genetiske struktur af dit sæt.

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Den version af DRAGEN-softwaren, der er installeret på systemet p.t. Anvend alle tre heltal i versionsnavnet. For eksempel 3.5.7. Softwareversionen skal stemme overens med den version, der er angivet i afsnittet BCLConvert_Settings.

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
ReferenceGenomeDir	Ja	Referencegenomets navn. For eksempel hg38_alt_aware. Referencegenomerne findes i <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Du finder oplysninger om brug af et brugerdefineret referencegenom i <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Onlinehjælp til appen Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0).
RnaLibraryType	Nej	Indtast en af følgende værdier: <ul style="list-style-type: none"> <li>• SF – Stranded forward (Fremadgående strenge). SF er standardværdien.</li> <li>• SR – Stranded reverse (Omvendte strenge).</li> <li>• U – Unstranded (Ikke retningsbestemt).</li> </ul>
RnaGeneAnnotationFile	Nej	Den fil, der indeholder RNA-gen-kommentarer. Kun alfanumeriske tegn er tilladte. Hvis der ikke angives nogen fil, bliver standardkommentarfilen i det angivne referencegenom anvendt.
BarcodeRead	Nej	Placeringen af stregkodelæsningen (både stregkode og UMI) i sekventeringskørslen. Værdierne kan bestå af Read1 (Læsning 1) eller Read2 (Læsning 2). Standardværdien er Read1 (Læsning 1).
BarcodePosition	Ja	Placeringen af baserne, svarende til stregkoden inden for den indtastede værdi under BarcodeRead. Basepositionerne er indekseret, startende ved nul-positionen. Indtast værdien for BarcodePosition i følgende format: <code>0_&lt;stregkodens slutposition&gt;</code> Hvis stregkoden indeholder 16 baser, er værdien <code>0_15</code> .

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
UmiPosition	Ja	Placeringen af baserne, svarende til UMI'en inden for den indtastede værdi under BarcodeRead. Indtast værdien for UmiPosition i følgende format: <UMI'ens startposition>_<UMI'ens slutposition>  Eksempel: Hvis UMI'en indeholder 10 baser, og strekkoden indeholder 16, er værdien 16_25.
BarcodeSequenceWhitelist	Nej	Navnet på den fil, der indeholder de strekkodesekvenser, der skal inkluderes. Filnavnet må kun indeholde alfanumeriske tegn, bindestreger, understregningstegn og punktummer.
KeepFastq	Nej	Hvis du ønsker at gemme FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>true</code> (sandt). Hvis du ønsker at fjerne FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>false</code> (falsk).
MapAlignOutFormat	Nej	Outputfilens format. De tilladte værdier er bam og cram. Hvis der ikke angives nogen værdi, er standardværdien 'none' (ingen).

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [DragenSingleCellRNA\_Data].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens id. Prøve-id'et kan indeholde op til 20 alfanumeriske tegn. Der skelnes mellem store og små bogstaver i prøve-id'et. Adskil de enkelte identifikatorer med bindestreger. Eksempel: Prøve1-DQB1-022515. Prøve-id'erne skal stemme overens med de id'er, der er angivet i afsnittet BCLConvert_Data.

## Single Cell-bibliotekssæt 6

Følgende indstillinger for prøveark gør sig gældende for biblioteksklargøringsæt med samme genetiske struktur som DRAGEN Single Cell-bibliotekssæt 6. Se supportsiden om produktkompatibilitet på DRAGEN Bio-IT Platform for at kontrollere den genetiske struktur af dit sæt.

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Den version af DRAGEN-softwaren, der er installeret på systemet p.t. Anvend alle tre heltal i versionsnavnet. For eksempel 3.5.7. Softwareversionen skal stemme overens med den version, der er angivet i afsnittet BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Ja	Referencegenomets navn. For eksempel hg38_alt_aware. Referencegenomerne findes i /usr/local/illumina/genomes. Du finder oplysninger om brug af et brugerdefineret referencegenom i <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> (Onlinehjælp til appen Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0).
RnaLibraryType	Nej	Indtast en af følgende værdier: <ul style="list-style-type: none"> <li>• SF – Stranded forward (Fremadgående strenge).</li> <li>• SR – Stranded reverse (Omvendte strenge).</li> <li>• U – Unstranded (Ikke retningsbestemt).</li> </ul>
RnaGeneAnnotationFile	Nej	Den fil, der indeholder RNA-gen-kommentarer. Kun alfanumeriske tegn er tilladte. Hvis der ikke angives nogen fil, bliver standardkommentarfilen i det angivne referencegenom anvendt.

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
BarcodeRead	Nej	Placeringen af stregkodelæsningen (både stregkode og UMI) i sekventeringskørslen. Værdierne kan bestå af Read1 (Læsning 1) eller Read2 (Læsning 2). Standardværdien er Read1 (Læsning 1).
BarcodePosition	Ja	<p>Placeringen af baserne, svarende til stregkoderne inden for den indtastede værdi under BarcodeRead. Basepositionerne er indekseret, startende ved nul-positionen. Indtast værdien for BarcodePosition i følgende format:</p> <pre>0_&lt;første stregkodes slutposition&gt;+&lt;anden stregkodes startposition&gt;_&lt;anden stregkodes slutposition&gt;+&lt;tredje stregkodes startposition&gt;_&lt;tredje stregkodes slutposition&gt;</pre> <p>Eksempel: Nedenstående struktur ville resultere i værdien 0_8+21_29+43_51:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 9 baser i den første stregkode (0_8).</li> <li>• 12 baser mellem første og anden stregkode.</li> <li>• 9 baser i anden stregkode (21_29).</li> <li>• 13 baser mellem anden og tredje stregkode.</li> <li>• 9 baser i tredje stregkode (43_51).</li> </ul>
UmiPosition	Ja	<p>Placeringen af baserne, svarende til UMI'en inden for den angivne BarcodeRead. Indtast strengen i følgende format:</p> <pre>&lt;UMI'ens startposition&gt;_&lt;UMI'ens slutposition&gt;</pre> <p>Eksempel: Hvis UMI'en indeholder 8 baser, og antallet af baser før UMI'en er 51, er værdien 52_59.</p>
BarcodeSequenceWhitelist	Nej	Navnet på den fil, der indeholder den stregkodesekvens, der skal hvidlistes. Filnavnet må kun indeholde alfanumeriske tegn, bindestreger, understregningstegn og punktummer.

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
KeepFastq	Nej	Hvis du ønsker at gemme FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>true</code> (sandt). Hvis du ønsker at fjerne FASTQ-outputfiler, skal du indtaste <code>false</code> (falsk).
MapAlignOutFormat	Nej	Outputfilens format. De tilladte værdier er <code>bam</code> og <code>cram</code> . Hvis der ikke angives nogen værdi, er standardværdien <code>'none'</code> (ingen).

Der er følgende tilgængelige felter og beskrivelser i [DragenSingleCellRNA\_Data].

Felt	Påkrævet	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens id. Prøve-id'et kan indeholde op til 20 alfanumeriske tegn. Der skelnes mellem store og små bogstaver i prøve-id'et. Adskil de enkelte identifikatorer med bindestreger. Eksempel: Prøve1-DQB1-022515. Prøve-id'erne skal stemme overens med de id'er, der er angivet i afsnittet <code>BCLConvert_Data</code> .

## Mørkecyklus-sekventering

I dette afsnit kan du læse, hvordan du anvender mørkecyklus-sekventering i opskriften.

Mørkecyklus-sekventering anvendes kun til at gennemføre kemitrinnene i en sekventeringscyklus. Tjek siden med kompatible produkter på [Illuminas supporthjemmeside](#) for at se, om mørkecyklus-sekventering er påkrævet for dit biblioteksklargøringsæt.

Følg nedenstående trin til mørkecyklus-sekventering.

### Redigering af opskriftsfilen

1. Download opskriftsfilen i XML-format på [Illuminas supporthjemmeside](#).
2. Rediger opskriftsfilen i XML-format.
  - a. Find det relevante protokolafsnit ud fra konfigurationen af din læsning og indeksssekventering. Der er seks forskellige mulige protokoller pr. brugerdefineret opskrift, der kan redigeres. Eksempel: Protokollen for en enkelt læsning 1 uden konfiguration af indeksssekventering ville være `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
  - b. Før `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` og `<ReadRef ReadName="Read 2"/>` skal du indtaste følgende mørkecyklus-trin på en ny linje.

```
<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />
```
  - c. Indtast mørkecyklus-trinnet på en ny linje for hver påkrævede mørkecyklus.

### 3. Gem opskriftsfilen i XML-format.

Nedenstående er en prøveopskrift med mørkecyklus:

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

#### Tilknytning af opskriften til kørslen

- 1 I kontrolsoftwaren skal du gå til Run Setup (Kørselskonfiguration) og vælge **Choose** (Vælg) under Custom Recipe (Brugerdefineret opskrift).
- 2 Gå til den opdaterede opskriftsfil i XML-format.
- 3 Vælg **Open** (Åbn).
- 4 Gå tilbage til [Initiering af en sekventeringskørsel på side 46](#).

# Indeks

## %

%PF 60

## A

advarsler 6, 83  
afbrudte forbindelser 83  
alkoholservietter 28  
amplificering 8  
analyse  
    metoder 5, 9  
automatiske opdateringer 75

## B

baner 56  
base call-filer 9  
basebestemmelse 5  
basebestemmelsesfiler 55, 62  
BaseSpace-sekventeringshub 1  
    dokumentation 14  
    indstillinger 14  
BCL-filer 6  
bcl2fastq2 55  
biblioteker  
    denaturering 8  
billedanalyse 5  
billeder 55  
billedoptagelse 55-56  
blegemiddelservietter 28

## C

CBCL-filer 60  
CE 55  
cloud-baseret analyse 1  
clusterfiltrering 60  
clusterintensiteter 58  
clusterplaceringer 55, 62  
Compute Engine 55  
computernavn 6

cyklusantal 31

## D

D-drev 75  
datakvalitet 60  
denaturering 8  
diskplads 6, 75  
dokumentation 108  
domæner 14  
drypbakke  
    indlæg 28  
døre  
    lukning 51

## E

ekstra 79  
ekstracyklusser 31  
enkeltlæsning 50  
ethernetkabel 4  
ethernetport 4

## F

fabriksindstillinger 85-86  
faseopdeling og præ-faseopdeling 58  
FASTQ-konvertering 55  
fejl 6, 83  
    beskeder 81  
    sandsynlighed 60-61  
fejllogs 56  
felter 55  
feltnummerering 57  
filterfiler 55, 62  
flytning 4  
fortynding af biblioteker 8  
frysspecifikationer 28  
funktionsdata 14  
første konfiguration 79, 85-86



## G

garanti 28  
generering af skabelon 58  
genstart 81, 85-86  
grøn kanal 59

## H

harddisk 6, 75  
hjælp, teknisk 108  
hostingplacering 14  
hvidbøger 61

## I

ikoner 6  
Illumina Proactive Support 14  
indeks  
    cyklusser 31  
indlæg 28  
indstillinger for lyd 21  
ingen bestemmelser 58  
initialisering 84  
Initialisering  
    mislykket 83  
installation af software 75  
installationsprogram til systempakke 75  
instrumentfunktionsdata 14  
intensitetsværdier 58  
internetforbindelse 14  
InterOp-filer 55, 62  
IP-adresse 6

## K

kaldenavn 21  
kameraer 56  
kassette  
    indsætningsretning 51  
katalognumre 27  
kundesupport 108  
kvalitetstabeller 61

køleskabsspecifikationer 28  
kørselskonfiguration  
    eksempler 31  
kørselsmappe 75  
kørselsparametre  
    redigering 50  
kørselsstatus 6  
kørselsstørrelse 75  
kørselstal 6  
kørsler  
    målinger 55

## L

Local Run Manager 5  
logfiler 56  
lokal analyse 1  
luftfiltre  
    ekstra 28  
    placering 79  
lydindstillinger 21  
lyslinje 3  
læsningscyklusser 31  
læsningslængder 31

## M

manglende bestemmelser 59  
manuelle softwareopdateringer 75  
materialekammer 3  
materialer  
    scanning 51  
    sporing 1  
materialesporing 1  
miniaturer 62  
mus 4

## N

nanobrønde 58  
navngivning  
    computernavn 6  
    instrumentnavn 21

nedlukning 83  
NextSeq 1000-/2000-reagenser 27  
nukleotider 59

## O

operativsystem 84  
opskrifter 75  
opskriftsfragmenter 6  
outputmappe 50, 75  
overfladenummerering 57

## P

paired-end 50  
passerer filter (PF) 60  
PhiX 28  
    alignment 55  
PhiX Control v3 27  
Phred-algoritme 61  
privat domæne 14  
processtyring 75

## Q

Q-scorer 60-61

## R

redigering af kørselsparametre 50  
registreringsfejl 58  
renhedsfilter 60  
Resuspension Buffer 27  
RSB-erstatning 27  
RunInfo.xml 62  
rød kanal 59

## S

Sequencing Analysis Viewer 55, 58  
serienummer 6  
serverplacering 14  
skærm 3  
sletning af kørsler 6, 75

software  
    installation 75  
    opdateringspåmindelser 22  
    ændring til tidligere version 85-86  
softwarepakke 1, 5  
specifikationsjustering 83  
standardoutputmappe 50  
statuslinje 3  
strøm  
    indgang 4  
strømkabel 4  
strømknop 3, 83  
supportsider 75  
systemkontroller 81  
sæt 27  
    katalognumre 28

## T

tastaturer 4  
teknisk assistance 108  
testsæt 28  
til/fra-knop 4, 83  
tilknyttede drev 50  
tokanalssekventering 59

## U

udløbsdatoer 79  
udsnit 56-57  
UNC-stier 50  
Universal Copy Service 5, 75  
USB-porte 4

## V

ventilatorer 79  
vigtige meddelelser 75  
virksomhedsabonnement 14

## W

Windows  
    logon 84

## **Æ**

ændring til tidligere softwareversion 85-86

# Teknisk hjælp

Kontakt Illuminas tekniske support for at få teknisk hjælp.

**Websted:** [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
**E-mail:** [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Telefonnumre til Illuminas tekniske support

Område	Gratis	Internationalt
Australien	+61 1800 775 688	
Belgien	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
Canada	+1 800 809 4566	
Danmark	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
Filippinerne	+63 180016510798	
Finland	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
Frankrig	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Holland	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Hongkong, Kina	+852 800 960 230	
Indien	+91 8006500375	
Indonesien		0078036510048
Irland	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Italien	+39 800 985513	+39 236003759
Japan	+81 0800 111 5011	
Kina		+86 400 066 5835
Malaysia	+60 1800 80 6789	
New Zealand	+64 800 451 650	
Norge	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Schweiz	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Singapore	1 800 5792 745	
Spanien	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Storbritannien	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197

Område	Gratis	Internationalt
Sverige	+46 2 00883979	+46 8 50619671
Sydkorea	+82 80 234 5300	
Taiwan, Kina	+886 8 06651752	
Thailand	+66 1800 011 304	
Tyskland	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
USA	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Vietnam	+84 1206 5263	
Østrig	+43 800 006249	+43 1 9286540

**Sikkerhedsdatablade (SDS'er)** – kan findes på Illuminas websted på [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

**Produktdokumentation** – Kan downloades på [support.illumina.com](http://support.illumina.com).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (uden for Nordamerika)

[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

**Kun til forskningsformål. Må ikke bruges til diagnostiske procedurer.**

© 2021 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

**illumina**<sup>®</sup>