

NextSeq 1000 ja 2000

Sekveneerimissüsteemi juhend

See dokument ja selle sisu kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. ja selle tütarettevõtetele („Illumina“) ning on mõeldud kasutamiseks ainult ettevõtte lepingulistele klientidele seoses selles dokumendis kirjeldatud toote (toodete) kasutamisega ega ole mõeldud mitte mingiks muuks otstarbeks. Seda dokumenti ega selle sisu ei tohi mis tahes viisil kasutada ega muul eesmärgil levitada ja/või edastada, avaldada või reprodutseerida ilma Illumina eelneva kirjaliku nõusolekuta. Illumina ei anna selle dokumendiga kolmandale isikule oma patendi-, kaubamärgi-, autori-, tava- või muu sarnase õiguse alusel mitte ühtegi litsentsi.

Kvalifitseeritud ja asjakohase koolituse saanud töötajad peavad selles dokumendis kirjeldatud juhiseid järgima rangelt ja üksikasjaliselt, et tagada siin kirjeldatud toote (toodete) õige ja ohutu kasutusviis. Siinse dokumendi sisu tuleb enne nimetatud toote (toodete) kasutamist täies ulatuses läbi lugeda ja endale selgeks teha.

SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD JUHISTE MITTE LUGEMINE JA ÜKSIKASJALIK JÄRGIMINE VÕIB KAHJUSTADA TOODET (TOOTEID), VIGASTADA INIMESI (SH KASUTAJAID VÕI TEISI) JA KAHJUSTADA MUUD VARA NING NIMETATUD JUHUL EI KEHTI ÜKSKI TOOTELE (TOODETELE) ANTUD GARANTII.

ILLUMINA EI VASTUTA SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD TOOTE (TOODETE) (SEALHULGAS TOOTE OSAD VÕI TARKVARA) VÄÄRKASUTUSE EEST.

© 2021 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

Kõik kaubamärgid kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. või nende vastavatele omanikele. Kaubamärgi kohta lisateabe saamiseks vt www.illumina.com/company/legal.html.

Muudatuste ajalugu

Dokumendi nr	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
1000000109376 v04	Aprill 2021	Lisatud juhised alusjoone failide importimiseks. Lisatud DRAGEN-i DNA amplikoni töövoog. Lisatud funktsioonid NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvarale v1.3. Lisatud teave puhverserveri valimise kohta. Uuendatud RSB koos Tween 20 tarnimis- ja hoiustamistemperatuuriga. Uuendatud DRAGEN-i RNA töövoog diferentsiaalse geeniekspressiooni hõlmamiseks. Uuendatud sekveneerimise väljundkausta struktuur. Uuendatud proovilehe v2 vormistamise soovitusel.
1000000109376 v03	November 2020	Parandatud katalooginumbrid. Lisatud teave uute kasutajate lisamise kohta.

Dokumendi nr	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
1000000109376 v02	Oktoober 2020	<p>Lisatud NextSeq 1000/2000 P3 reaktiivikomplektid.</p> <p>Lisatud DRAGEN-i üksikraku RNA töövoog.</p> <p>Lisatud DRAGEN-i rikastamise töövoog.</p> <p>Lisatud FASTQ kokkusurutavuse valikud.</p> <p>Lisatud juhised DRAGEN-i konveieri installimise ja litsentsi uuendamise kohta.</p> <p>Lisatud juhised kohandatud referentsgenoomi importimiseks.</p> <p>Uuendatud laadimismahud ja kontsentratsioonid vastavalt teegitüüpidele.</p> <p>Uuendatud teegi lahjendamise juhised.</p> <p>Lisatud juhised reaktiivikassetti automaatseks puhastamiseks.</p> <p>Uuendatud teave toetatud tsükli arvu kohta.</p> <p>Uuendatud seadme kohandamise juhised.</p> <p>Uuendatud seadme käituse häälestamise juhised.</p> <p>Uuendatud DRAGEN-i sekvenerimise väljundi struktuur.</p> <p>Lisatud teave DRAGEN-i QC-aruanete kohta.</p> <p>Lisatud teave kohandatud referentsgenoomide eemaldamise kohta kõvakettalt.</p> <p>Lisatud teave süsteemikontrollide tegemise kohta.</p> <p>Uuendatud proovilehe v2 sätted.</p>

Dokumendi nr	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
1000000109376 v01	Juuni 2020	<p>Uuendatud juhtimistarkvara NextSeq 1000/2000 versiooni tarkvarakirjeldusi.</p> <p>Selgitatud eristus pilve-, hübriid-, kohaliku ja eraldiseisva režiimi vahel kogu juhise ulatuses.</p> <p>Uuendatud kasseti hoiustamise ja sulatamise juhiseid.</p> <p>Uuendatud teave toetatud tsüklite arvu kohta.</p> <p>Uuendatud juhised sekundaarse analüüsi häälestamiseks.</p> <p>Uuendatud reaktiivikomplekti katalooginumbrid.</p> <p>Uuendatud sekvenerimisprotokolli diagramm.</p> <p>Uuendatud juhised võrgudraivi täpsustamiseks vaikimisi väljundkaustana.</p> <p>Uuendatud toetatud teekide tüüpide tabel.</p> <p>Lisatud juhised kohandatud referentsgenoomi importimise kohta.</p> <p>Lisatud juhised käituse häälestamiseks, kasutades kohandatud indeksikomplekti ja kohandatud teegi ettevalmistuskomplekti.</p> <p>Uuendatud kasutajakonto ja parooli nõudeid.</p> <p>Lisatud üksikasjad DRAGEN-i väljundkausta struktuuri kohta.</p> <p>Selgitatud juhised kasutatud reaktiivide kassetist väljalaskmise kohta.</p> <p>Lisatud taustteave Q-tabeli kohta.</p> <p>Uuendatud juhised juhtimistarkvara värskenduste installimise kohta.</p> <p>Lisatud juhised käituse uuesti järjestamise kohta.</p> <p>Lisatud juhised DRAGEN-i konveierite ja litsentsi uuendamise kohta.</p> <p>Lisatud seadme kohandamise juhised.</p> <p>Uuendatud joonised uue märgistuse peegeldamiseks.</p> <p>Muudetud kogu juhendis üks visiiriks.</p> <p>Lisatud kahe Etherneti-pordi kirjeldus.</p>

Dokumendi nr	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
1000000109376 v00	Märts 2020	Esialgne väljalase.

Sisukord

Süsteemi ülevaade	1
Lisamaterjalid	1
Seadme riistvara	2
Integreeritud tarkvara	5
Toiminguhaldus	6
Sekvenerimise protokollid	7
Kuidas sekvenerimine töötab	7
Süsteemi konfiguratsioon	10
Kasutajakonto nõuded	10
Teenuse BaseSpace Sequence Hub ja proaktiivse toe konfigureerimine	12
Vaikimisi väljundkausta asukoha määramine	14
Kohandatud referentsgenoomide importimine	17
Müra alusjoone failide importimine	17
Käitusrežiimi konfigureerimine	18
Seadme kohandamine	19
Kulutarvikud ja vahendid	22
Sekvenerimise kulutarvikud	22
Täiendavad kulutarvikud	25
Täiendavad vahendid	27
Protokoll	29
Sekvenerimise kaalutlused	29
BaseSpace Sequence Hubi sekvenerimiskäituse planeerimine	30
Kotti pakitud kasseti ja läbivooluküveti sulatamine	39
Teekide lahjendamine	41
Kulutarvikute kasseti laadimine	43
Sekvenerimiskäituse alustamine	45
Sekvenerimisväljund	53
Reaalajas analüüsi ülevaade	53
Reaalajas analüüsi töövoog	55
Sekvenerimise väljundfailid	59
DRAGEN-i sekundaarse analüüsi väljundfailid	60
DRAGEN-i sekundaarse analüüsi väljundkausta struktuur	69
Hooldus	72
Kõvakettaruumi vabastamine	72
Tarkvaravärskendused	72
DRAGEN-i töövoog ja litsentsi uuendused	74

Õhufiltri asendamine	76
Tõrkeotsing	78
Veateate lahendamine	78
Kulutarvikute tagastamine hoiukohta	79
Käituse tühistamine	79
Käituse uuesti järjestamine	80
Seadme taaskäivitamine	80
Süsteemi kontrollimine	81
Tehasesätete taastamine	82
Installitud kujutise jäädvustamine	82
Jäädvustatud kujutise taastamine	82
Ressursid ja viited	84
Proovilehe v2 sätted	84
Tumeda tsükli sekvenerimine	98
Register	100
Tehniline tugi	104

Süsteemi ülevaade

Sekvenerimissüsteem Illumina® NextSeq™ 1000 võimaldab sihipärast lähenemist järgmise põlvkonna sekvenerimisele (NGS)¹. See rakendusepõhine süsteem mahutab Illumina sekvenerimistehnoloogia kulusäästlikkusse lauaseadmesse, mis pakub järgmisi funktsioone.

- **Juurdepääas ja usaldusväärsus** – süsteemil NextSeq 1000/2000 on kohalik DRAGEN-i analüüs ning süsteemis toimuv denaturatsioon ja lahjendamine. Pildindusmoodul on süsteemi sisse ehitatud ja vedelikukomponendid on kulutarvikusse sisse ehitatud, mis hõlbustab seadme hooldust.
- **Üheetapiline kulumaterjali laadimine** – ühekordselt kasutatav kassett on kõigi käituseks vajalike reaktiividega eeltäidetud. Teek ja läbivooluküvett laaditakse otse kassetti, mis seejärel laaditakse seadmele. Integreeritud identifitseerimine võimaldab täpset jälgimist.
- **Sekvenerimistarkvara NextSeq 1000/2000** – integreeritud tarkvarakomplekt, mis kontrollib seadme toiminguid, töötleb pilte ja genereerib aluste nimetusi.
 - **Cloud mode** (Pilverežiim) – plaanige käitus seadme käituse häälestamisega rakenduses BaseSpace Sequence Hub. Valitud analüüsi töövoogu alustatakse automaatselt pilvest. Käituse andmed ja analüüsi tulemused on samuti pilves.
 - **Hybrid mode** (Hübridrežiim) – plaanige käitus seadme käituse häälestamisega rakenduses BaseSpace Sequence Hub. Valitud analüüsi töövoogu alustatakse seejärel seadmel oleva DRAGEN-i kaudu.
 - **Local mode** (Kohalik režiim) – plaanige käitus proovilehe v2 faili kohaliku vorminguga. Valitud analüüsi töövoogu alustatakse automaatselt seadmel oleva DRAGEN-i kaudu.
 - **Standalone mode** (Eraldiseisev režiim) – plaanige käitus ilma proovileheta.

See jaotis pakub süsteemi ülevaadet, sh informatsiooni riistvara, tarkvara ja andmete analüüsi kohta. Samuti võtab see kokku see põhilised mõisted ja terminoloogia, mida dokumendis kasutatakse. Üksikasjalike täpsustuste, andmelehtede, rakenduste ja seotud toodete kohta teabe saamiseks vaadake sekvenerimissüsteemide [NextSeq 1000 ja NextSeq 2000](#) tootelehte Illumina veebisaidil.

Lisamaterjalid

[Sekvenerimissüsteemide NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 kasutajatoe lehed](#), mis asuvad Illumina veebisaidil, pakuvad süsteemi kohta lisateabeallikaid. Nimetatud teabeallikad hõlmavad tarkvara, koolitusi, teavet seadmega ühilduvate toodete kohta ja järgmisi dokumente. Uusima teabe saamiseks kontrollige alati kasutajatoe lehti.

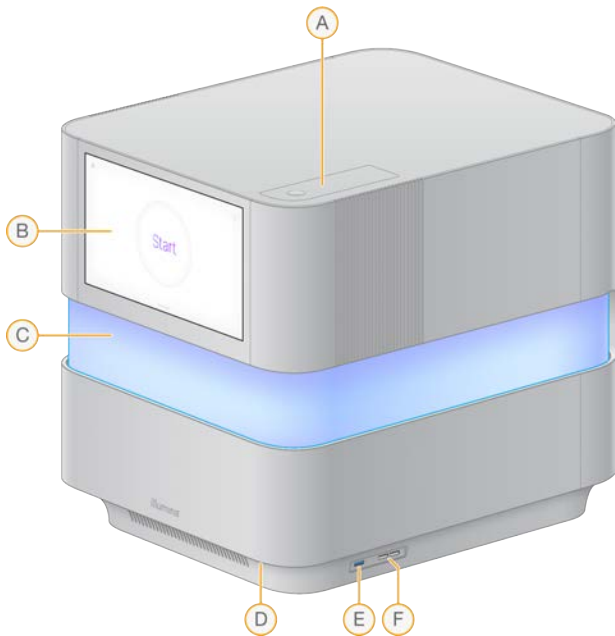
¹järgmise põlvkonna sekvenerimine

Teabeallikas	Kirjeldus
<i>Kohandatud protokoll valimine</i>	Täielike suuniste tootmiseks mõeldud tööriist, mis on kohandatud teie teegi ettevalmistusmeetodi, parameetrite ja analüüsimeetodite jaoks ning sisaldab võimalust määrata detailide üksikasjalikkuse taset.
<i>Sekveneerimissüsteemide NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 ohutus- ja vastavusjuhend (dokument nr 1000000111928)</i>	Sisaldab teavet tööohutuskaalutluste, vastavusavalduste ja seadme märgistamise kohta.
<i>RFID-lugeja mooduli vastavusjuhend (dokument nr 1000000002699)</i>	Sisaldab teavet seadme RFID-lugeja, vastavussertifikaatide ja ohutuskaalutluste kohta.
<i>NextSeq 1000 ja 2000 denatureerimise ja lahjendamise juhend (dokument nr 1000000139235)</i>	Sisaldab suuniseid ettevalmistatud teekide käsitsi denatureerimiseks ja lahjendamiseks sekveneerimiskäituse jaoks ning valikulise PhiX-i kontrolli ettevalmistamiseks.
<i>NextSeq 1000 ja 2000 kohandatud praimerite juhend (dokument nr 1000000139569)</i>	Sisaldab teavet Illumina sekveneerimise praimerite asendamise kohta kohandatud sekveneerimise praimeritega.
<i>Sekveneerimissüsteemi NextSeq 2000 kasutuskoha ettevalmistamise juhend (dokument nr 1000000109378)</i>	Kirjeldab tehnilisi andmeid laboriruumi, elektrinõuete ning keskkonna- ja võrgutingimuste kohta.
<i>BaseSpace'i spikker (help.basespace.illumina.com)</i>	Sisaldab teavet BaseSpace™ Sequence Hubi kasutamise ja saadaolevate analüüsivalikute kohta.
<i>Indeksi adapterite ühendamise juhend (dokument nr 1000000041074)</i>	Sisaldab ühendamise suuniseid ja topeltindeksi strateegiaid.
<i>Illumina adapterijärjestused (dokument nr 1000000002694)</i>	Sisaldab Illumina teegi ettevalmistuskomplektide adapterijärjestuse loendeid.

Seadme riistvara

Sekveneerimissüsteem NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 koosneb toitenupust, monitorist, olekuribast, kulutarvikute sektsioonist ja USB-portidest.

Joonis 1. Välise süsteemi osad



- A. **Õhufiltri sektsioon** – tagab juurdepääsu väljavahetatavatele õhufiltritele.
- B. **Puutekraaniga monitor** – võimaldab seadme konfigureerimist ja häälestamist juhtimistarkvara liidese abil.
- C. **Olekuriba** – süsteemi liikumisel läbi tööprotsessi muutub valguse värv. Sinine ja lilla näitavad interaktiivsust (nt eelkäituse kontrollid) ja mitmikvärvid näitavad väljapaistvaid hetki ja andmeid (nt sekvenerimise lõpp). Kriitilisi vigu näidatakse punase tule abil.
- D. **Toitenupp** – kontrollib seadme toidet ja näitab, kas süsteem on sisse lülitatud (põleb), välja lülitatud (ei põle) või välja lülitatud, kuid vooluvõrgus (pulseerib).
- E. **3.0 USB-port** – välise kaasaskantava ketta ühendamiseks andmeülekaneks.
- F. **2.0 USB-pordid** – hiire ja klaviatuuri ühendamiseks.

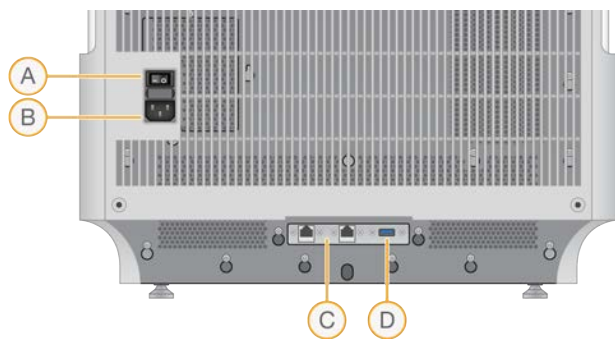
Toite- ja lisaseadmete ühendused

Liigutage seadet, et saada juurdepääs seadme tagaküljel asuvale toitenupule, USB-pordile ja teistele abistavatele ühendustele.

Seadme tagaküljel on lüliti ja sisend, mis kontrollib seadme toidet, ning kaks Etherneti-ühenduse jaoks mõeldud Etherneti porti. 3.0 USB-port pakub võimalust ühendada andmete ülekandmiseks väline kaasaskantav ketas (exFAT ei ole toetatud sellel Linux-i-põhisel platvormil).

Sekvenerimistarkvaradega NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 on kaasas kaks Etherneti porti, mis on mõeldud süsteemi võimekuse ja paindlikkuse suurendamiseks. Näiteks võib üks Etherneti port olla sisese võrguketta suhtlusele mõeldud ja teine port välisele suhtlusele, näiteks rakendusele BaseSpace Sequence Hub või proaktiivsele toele.

Joonis 2. Tagapaneeli komponendid

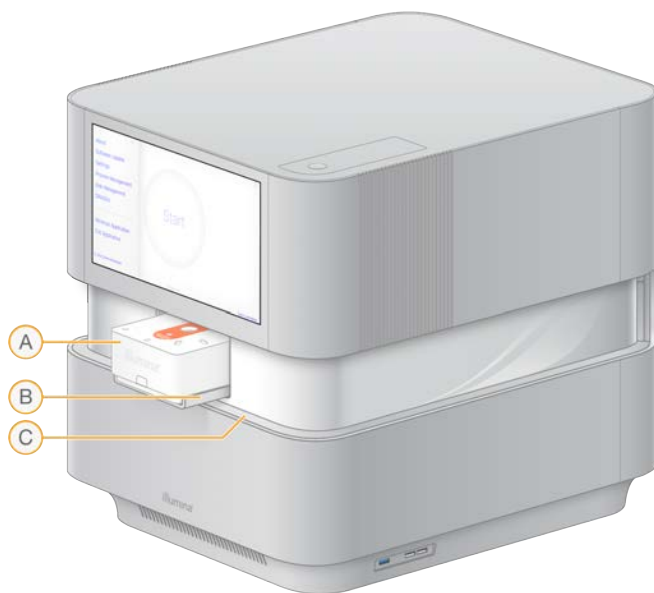


- A. **Lüliti** – seadme toite sisse- ja väljalülitamiseks.
- B. **Vahelduvvoolu toitesisend** – toitekaabli ühendus.
- C. **Etherneti port** – valikuline Etherneti kaabli ühendus.
- D. **3.0 USB-port** – välise kõvaketta andmeülekanne ühendamiseks.

Kulutarvikute seksioon

Kulutarvikute seksioon sisaldab kassetti, sealhulgas ka läbivooluküvetti ja lahjendatud teeki sekveneerimiskäituseks.

Joonis 3. Laaditud kulutarvikute seksioon



- A. **Kassett** – sisaldab läbivooluküvetti, teeki ja reaktiive ning kogub kasutatud reaktiive käituse ajal.
- B. **Alus** – kasseti hoidmiseks sekveneerimise ajal.
- C. **Visiir** – avaneb, et võimaldada juurdepääsu kulutarvikute seksioonile.

Integreeritud tarkvara

Süsteemi tarkvarapakett sisaldab integreeritud rakendusi sekvenerimiskäituste ja analüüsi tegemiseks.

- **NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara** – juhib seadme tööd ja pakub liidest süsteemi konfigureerimiseks, sekvenerimiskäituse häälestamiseks ning käituse statistika jälgimiseks sekvenerimise edenemisel.
- **Tarkvara Real-Time Analysis (RTA3)** – RTA teeb käituse ajal pildianalüüsi ja nimetab aluseid. Lisateavet vt jaotisest [Sekvenerimisväljund leheküljel 53](#).
- **Teenus Universal Copy Service** – kopeerib sekvenerimisväljundi failid käituse kaustast teenusesse BaseSpace Sequence Hub (kui on rakendatav) ja väljundkausta, kus pääsete neile juurde.

Juhtimistarkvara on interaktiivne ja käitab automaatseid taustatoiminguid. Tarkvara Real-Time Analysis ja teenus Universal Copy Service käitavad ainult taustatoiminguid.

Süsteemiinfo

Valige ülevalt vasakust nurgast juhtimistarkvara menüü, et avada jaotis About (Teave).

Juhtimistarkvara menüüs on jaotis About (Teave), kus saate vaadata Illumina kontaktteavet ja järgmist süsteemiteavet.

- Seadme seerianumber
- Arvuti nimi
- Süsteemipaketi versioon
- Image OS-i versioon
- Käituste koguarv

Teated ja märguanded

Teadete ikoon asub üleval paremas nurgas. Kui ilmneb hoiatus või viga, liigub parem paneel teate kuvamiseks välja. Valige mis tahes ajal see ikoon, et vaadata nimekirja praegustest või möödunud teadetest hoiatuste või vigade kohta.

- Hoiatused vajavad tähelepanu, kuid ei peata käitust ega vaja muud toimingut kui kinnitus.
- Veateated nõuavad enne käituse alustamist või jätkamist toimingut.

Juhtimistarkvara minimeerimine

Juurdepääsuks teistele rakendustele minimeerige juhtimistarkvara. Näiteks väljundkausta sirvimiseks rakenduses File Explorer või proovilehe leidmiseks.

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Minimize Application** (Minimeeri rakendus).

Juhtimistarkvara on minimeeritud.

2. Juhtimistarkvara maksimeerimiseks valige tööriistaribalt suvand **NextSeq 1000/2000 Control Software** (NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara)

Toiminguhaldus

Ekraan Process Management (Toiminguhaldus) näitab ajutisi käitusi, mida hoitakse salvestusruumis `/usr/local/illumina/runs`. Igat käitust on tuvastatav käituse kuupäeva, nime ja ID-ga. Teavet käituse seisundi, sekundaarse analüüsi, väljundkausta ja pilve kohta näidatakse samuti iga käituse ajal. Valige käitust, et näha lisainformatsiooni, sh töövoogu, keskmist %Q30, PF-lugemite koguarvu ja kogusaagist. Käituste kustutamise ja ruumi vabastamise kohta lugege jaotisest [Kõvakettaruumi vabastamine leheküljel 72](#). Analüüsi taasjärjestamiseks seadmes vaadake jaotist [Käituse uuesti järjestamine leheküljel 80](#).

Käituse olek

See jaotis näitab käituse olekut sekvenerimiskäituse ajal.

- **In Progress** (Pooleli) – sekvenerimiskäitust on pooleli.
- **Complete** (Lõpetatud) – sekvenerimiskäitust on lõppenud.
- **Stopped** (Peatatud) – sekvenerimiskäitust peatati.
- **Errored** (Vigane) – sekvenerimiskäituses tekkis viga.

Sekundaarse analüüsi olek

See jaotis näitab seadmel toimuva DRAGEN-i sekundaarse analüüsi olekut. See näitab N/A, kui analüüs toimub rakenduses BaseSpace Sequence Hub.

- **Not started** (Pole alanud) – DRAGEN-i analüüsi pole veel alustatud.
- **In Progress**(Pooleli) – DRAGEN-i analüüs on pooleli.
- **Stopped** (Peatatud) – DRAGEN-i analüüs on peatatud.
- **Errored** (Vigane) – DRAGEN-i analüüsis tekkis viga.
- **Complete** (Lõpetatud) – DRAGEN-i analüüs on valmis.

Väljundkausta olek

See jaotis näitab väljundkausta kopeeritavate failide olekut.

- **In Progress** (Pooleli) – toimub failide kopeerimine väljundkausta.
- **Complete** (Lõpetatud) – failid on väljundkausta kopeeritud.

Pilve (rakenduse BaseSpace Sequence Hub) olek

See jaotis näitab nende failide olekut, mida laaditakse rakendusse BaseSpace Sequence Hub pilve kaudu.

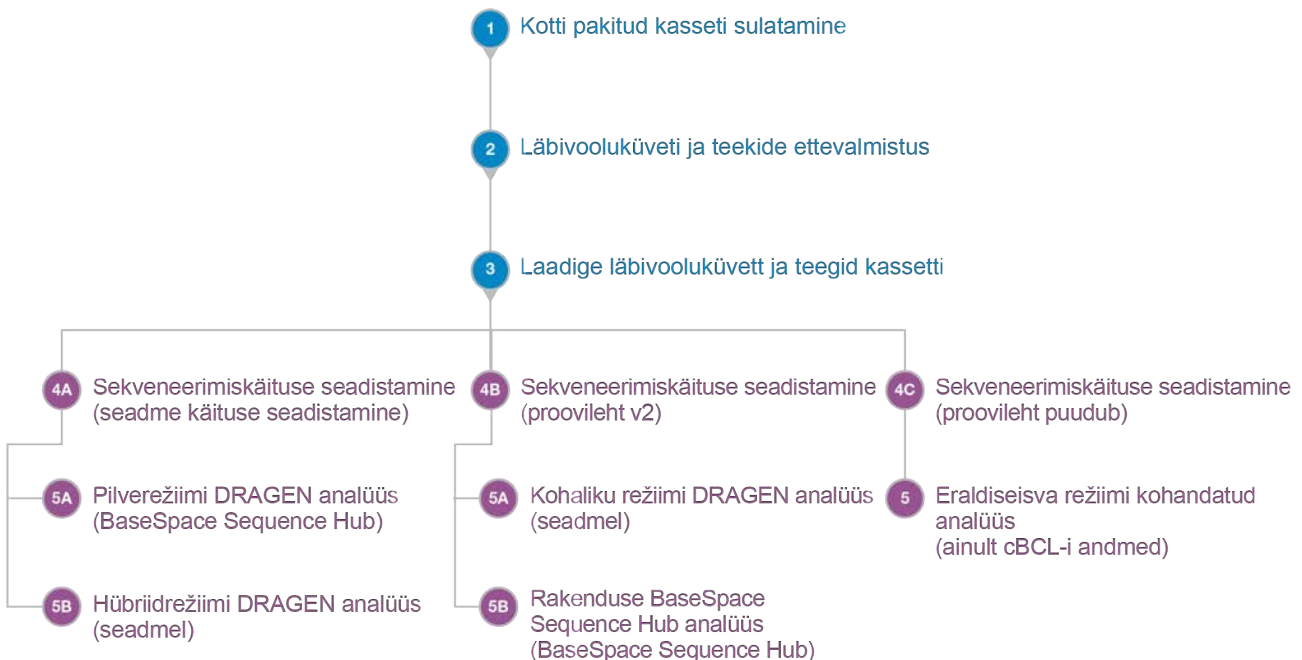
- **In Progress** (Pooleli) – juhtimistarkvara laadib faile üles rakendusse BaseSpace Sequence Hub.
- **Complete** (Lõpetatud) – kõik failid on edukalt rakendusse BaseSpace Sequence Hub üles laaditud.

Olekuprobleemi tõrkeotsing

- Kui käitus on pooleli, sulgege ekraan Process Management (Toiminguhaldus), oodake umbes viis minutit ja seejärel avage see uuesti.
- Kui käitus ei ole pooleli, taaskäivitage seade ja seejärel avage ekraan Process Management (Toiminguhaldus) uuesti. Vt [Seadme taaskäivitamine leheküljel 80](#).

Sekvenerimise protokollid diagramm

Järgmine diagramm illustreerib sekvenerimisprotokollid NextSeq 1000/2000 kasutamisel.



Kuidas sekvenerimine töötab

Klastrite genereerimine, sekvenerimine ja analüüsimine moodustavad sekvenerimise NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 sekvenerimissüsteemis. Iga etapp toimub sekvenerimiskäituse ajal automaatselt. Olenevalt süsteemi konfiguratsioonist tehakse pärast analüüsi lõppu täiendav seadmeväline analüüs.

Klastri loomine

Teek¹ denatureeritakse automaatselt üksikuteks ahelateks ja lahjendatakse täiendavalt seadmel. Klastri moodustamise ajal seotakse üksikud DNA-molekulid läbivooluküveti pinnaga ja neid võimendatakse klastrite² moodustamiseks. Klastri loomine võtab aega ~4 tundi.

Sekveneerimine

Klastreid kujutatakse kahel kanalil põhineva keemiaga – ühe rohelise kanali ja ühe sinise kanaliga, et kodeerida nelja nukleotiidi andmeid. Kui paani kujutamine läbivooluküvetis on lõpetatud, kujutatakse järgmine paan. Protsessi korratakse iga sekveneerimistsükli jaoks (~5 minutit ühe tsükli jaoks). Pildianalüüsi järel teostab reaalarajas analüüsi tarkvara aluse nimetamise³, filtreerimise ja kvaliteedi hindamise.⁴

Esmane analüüs

Käituse edenemisel edastab juhtimistarkvara automaatselt aluste nimetusfailid⁵ (*.bcl) andmeanalüüsiks määratud väljundasukohta. Sekveneerimiskäituse ajal teostab reaalarajas analüüsi (RTA3) tarkvara pildi analüüsi, aluse nimetamise ja demultipleksimise⁶. Kui sekveneerimine on lõpetatud, algab sekundaarne analüüs. Sekundaarse andmeanalüüsi meetod oleneb teie rakendusest ja süsteemi konfiguratsioonist.

Sekundaarne analüüs

BaseSpace Sequence Hub on Illumina pilvepõhine arvutuskeskkond käituste jälgimiseks, andmete analüüsimiseks ja salvestamiseks ning koostööks. See hostib rakendusi DRAGEN ja BaseSpace Sequence Hub, mis toetavad ühise analüüsi meetodeid sekveneerimiseks.

Pärast algse analüüsi lõppu teostab DRAGEN sekundaarse analüüsi, kasutades üht saadaolevatest analüüsi konveieritest.

Kasutades pilve või hübriidrežiimi, leiab DRAGEN proovilehe, referentsgenoomi ja käituse sisendfailid rakenduse BaseSpace Sequence Hub seadme käituse häälestusest. Pilverežiimi jaoks laetakse cBCL-i

¹DNA või RNA proov, millele on sekveneerimiseks lisatud adapterid. Ettevalmistusmeetodid erinevad.

²Läbivooluküveti DNA-ahelate kolonaalne grupp, mis tekitab ühe sekveneerimislugemi. Iga läbivooluküveti DNA-ahel külvab malli, mida võimendatakse, kuni klaster koosneb sadadest või tuhandetest koopiatest. Näiteks 10 000 klastriga läbivooluküvett tekitab ühe lugemi või 20 000 paarislugemi.

³Tuvastab paani iga klastri aluse (A, C, G või T) konkreetsetes tsükliis.

⁴Arvutab iga aluse nimetamise kvaliteedi prognoosijate komplekti ja kasutab seejärel prognoosija väärtusi Q-skoori otsimiseks.

⁵Sisaldab iga sekveneerimistsükli iga klastri aluse nimetust ja seostatud kvaliteediskoori.

⁶Analüüsiprotsess, mis eristab iga teegi lugemeid.

andmed automaatselt rakendusse BaseSpace Sequence Hub ja BaseSpace Sequence Hub algatab rakenduse DRAGEN sekundaarse analüüsi. Hübriidrežiimi korral tehakse rakenduse DRAGEN sekundaarne analüüs seadmel ja väljundfailid saab salvestada valitud kausta või pilve.

Kui kasutate kohalikku režiimi, taastab DRAGEN antud proovilehe, referentsgenoomi ja käituse sisendfailid NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 sekveneerimissüsteemidest. DRAGEN-i sekundaarne analüüs tehakse seadmel ja väljundfailid salvestatakse valitud väljundkausta. Kui proaktiivne tuhi, käituse jälgimine ja andmesalvestus on valitud, saab analüüsi algatada ka rakenduse BaseSpace Sequence Hub kaudu pärast sekveneerimise lõppu.

Kui kasutate eraldiseisvat režiimi, häälestage käitus ilma proovileheta. Töövoog on soovitatud kohandatud analüüside töövoogude jaoks, mis algavad cBCL-i andmetest.

- Lisateabe saamiseks rakenduse BaseSpace Sequence Hub kohta lugege rakenduse [BaseSpace Sequence Hub veebiabi](#).
- Lisateabe saamiseks rakenduse DRAGEN kohta lugege rakenduse [DRAGEN Bio-IT platvormi tugilehte](#).
- Kõikide rakenduste ülevaate leiate jaotisest [BaseSpace'i rakendused](#).

Süsteemi konfiguratsioon

See jaotis pakub suuniseid teie süsteemi häälestamiseks, sealhulgas tarkvarasätete kirjeldust.

Need suunised kirjeldavad peamiselt juhtimistarkvara koos informatsiooniga võrgu konfigureerimise ja juhtsüsteemide kohta.

i Brauseri Google Chrome kasutamisel kuvatakse teile viip ja palutakse avada teie sisselogimise võtmehoidja. Võite käsku ohutult ignoreerida.

Kasutajakonto nõuded

Linuxi juhtsüsteemil on kolm kontot:

- juur (superadministraator)
- ilnadmin (administraator)
- ilnuser (kasutaja)

Administraatori konto on mõeldud ainult süsteemi uuenduste tegemiseks, nagu NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara värskendamine, või IT-personalile kasutamiseks, et kinnitada püsiv võrguketas.

Kasutajakonto kaudu saate täita kõiki muid funktsioone, sh sekveneerimist.

Nõuded salasõnale

Kohapealse teeninduse insener algatab parooli muutmise kõigi kolme konto jaoks pärast seadme paigaldamise lõppu. Värskendage mõlemat parooli iga 180 päeva järel, kui seda palutakse.

Tabel 1. Parooli vaikepoliitika

Poliitika	Säte
Enforce password history (Parooliajaloo jõustamine)	Five passwords remembered (Viie parooli meeldejätmise)
Lockout threshold (Lukustuskünnis)	Ten invalid logon attempts (Kümme kehtetut sisselogimiskatset)
Minimum password length (Parooli minimaalne pikkus)	Ten characters (Kümme tärki)
Minimaalne tärgivalik	Kõigist kolm: number, suur täht, väike täht ja sümbol

Poliitika	Säte
Maksimaalne tärkide kordus	Kolm tärki
Password must meet complexity requirements (Parool peab vastama keerukusnõuetele)	Disabled (Inaktiveeritud)
Store passwords using reversible encryption (Paroolide salvestamine ennistatava krüptimisega)	Disabled (Inaktiveeritud)

Uue kasutaja lisamine

1. Logige ilmnadmini sisse.
2. Valige toitenupp ja seejärel avage ilmnadmini rippmenüü.
3. Valige **Account Settings** (Konto sätted).
4. Valige **Unlock** (Ava) ja seejärel sisestage ilmnadmini parool.
5. Valige **Add User** (Lisa kasutaja).
6. Valige standardne kontotüüp ja sisestage seejärel uus kasutajanimi.
7. Valige **Set password now** (Määra parool kohe) ja sisestage seejärel parool.
8. Valige **Add** (Lisa).
Uus kasutaja on lisatud kasutajate nimekirja.
9. Võimaldage kasutaja juurdepääs NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvarale järgmiselt.
 - a. Avage terminal.
 - b. Sisestage järgmine:

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <uus kasutajanimi>
```
 - c. Kui küsitakse, sisestage ilmnadmini parool.
10. Selleks et kontrollida, kas kasutaja luba on õigesti määratud, tehke järgmist.
 - a. Logige sisse uude kasutajakontosse.
 - b. Minge NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvarasse.
 - c. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).
 - d. Tehke vaikimisi väljundkausta all kindlaks, kas saate valida ja salvestada väljundkausta teekonna.
Kui saate väljundkausta tee valida ja salvestada ilma vigadeta, on load edukalt määratud.

Parooli lähtestamine

Selles jaotises on üksikasjad selle kohta, kuidas lähtestada ilmnuseri, ilmnadmini või juure parool. Parooli taastamine ei ole saadaval. Parooli lähtestamine ei väldi kontost väljalukustamist pärast liiga palju valesid parooli sisestamise katseid. Te peate ootama 10 minutit, enne kui saate oma parooli lähtestada või proovida sisse logida.

Ilmnuseri parooli lähtestamine

Saate ilmnuseri parooli lähtestada, kui teate ilmnadmini või juure parooli.

1. Logige ilmnadmini sisse.
2. Avage terminal.
3. Sisestage `sudo passwd ilmnuser`.
4. Kui küsitakse, sisestage ilmnadmini parool.
5. Kui küsitakse, sisestage uus ilmnuseri parool.
6. Kui küsitakse, sisestage ilmnuseri uus parool uuesti, et see kinnitada.

Lähtestage ilmnadmini parool

Saate ilmnadmini parooli lähtestada, kui teate juure parooli.

1. Logige juurkontole sisse.
2. Avage terminal.
3. Sisestage `passwd ilmnadmin`, et muuta ilmnadmini parooli, või sisestage konto `passwd ilmnuser`, et muuta ilmnuseri parooli.
4. Kui küsitakse, sisestage uus parool.
5. Kui küsitakse, sisestage uus parool uuesti, et uus parool kinnitada.

Juure parooli lähtestamine

Juure parooli lähtestamiseks kasutage üht järgmistest valikutest.

- Kui teate parooli korrast, kui viimane OS-i kujutis jäädvustati, taastage see säilitatud kujutis.
- Kui te ei mäleta parooli, võtke ühendust Illumina tehnilise toega.

Teenuse BaseSpace Sequence Hub ja proaktiivse toe konfigureerimine

Teenuse BaseSpace Sequence Hub ja proaktiivse toe konfigureerimiseks oma süsteemis järgige alltoodud suuniseid. Teenuse BaseSpace Sequence Hub konto loomiseks lugege [Teenuse BaseSpace Sequence Hub veebiabi](#).

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).

2. Teenuse BaseSpace Sequence Hub ja proaktiivse toe säteteks valige üks järgmistest valikutest.

Valik	Kirjeldus ja nõuded
Proactive Support Only (Ainult proaktiivne tugi)*	Kiiremaks tõrkeotsinguks saatke seadme jõudlusandmed Illuminale. Vajalik on internetiühendus.
Proactive and Run Monitoring (Proaktiivne tugi ja käituse jälgimine)	InterOp- ja logifailide saatmine rakendusse BaseSpace Sequence Hub käituse kaugjälgimiseks. See on vaikevalik. Nõutav on rakenduse BaseSpace Sequence Hub konto ja internetiühendus.
Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiivne tugi, käituse jälgimine ja andmesalvestus)	InterOP-failide, logifailide ja käitusandmete saatmine rakendusse BaseSpace Sequence Hub kaugjälgimiseks ja analüüsiks. Nõutav on rakenduse BaseSpace Sequence Hub konto, internetiühendus ja proovileht.
None (Puudub)	Katkestage käituste ühendus rakenduse BaseSpace Sequence Hub kontodega ja ärge saatke seadme jõudlusandmeid Illumina proaktiivsele toele.

* Olenevalt juhtimistarkvara versioonist võib selle sätte nimi tarkvara liideses erineda selles juhendis esitatud nimest.

Kui ükskõik milline valik (välja arvatud Puudub) valitakse, aktiveeritakse proaktiivne tugi. See on tasuta teenus, millega saate näha oma jõudlusandmeid platvormil MyIllumina Customer Dashboard ja mis võimaldab Illumina teenusemeeskondadel tõrkeotsinguid kiiremini teha.



Proaktiivsuse ja käituse jälgimine on vaikimisi sisse lülitatud Sellest teenusest loobumiseks valige suvand **None** (Puudub).

- Kui valisite sammus 2 suvandi None (Puudub), valige lõpetamiseks käsk **Save** (Salvesta). Vastasel korral jätkake sammuga 6.
- Valige hostimise asukoha nimekirjast teenuse BaseSpace Sequence Hub serveri asukoht, kuhu andmed üles laaditakse.
Veenduge, et kasutaksite hostimise asukohta, mis asub teie piirkonnas või sellele kõige lähemal.
- Kui teil on ettevõtte tellimus, sisestage väljale domeeni nimi (URL), mida kasutatakse teie teenuse BaseSpace Sequence Hub konto jaoks.
Näide: <https://teielabor.basespace.illumina.com>.
- Valige käsk **Save** (Salvesta).

Vaikimisi väljundkausta asukoha määramine

Kasutage selle jaotise suuniseid, et valida vaikimisi väljundkausta asukoht. Käituse häälestamise ajal saate väljundkausta iga käituse jaoks muuta. Tarkvara salvestab BCL-failid¹ ja muud käituse andmed väljundkausta.

Väljundkaust on kohustuslik, välja arvatud juhul, kui süsteem on konfigureeritud teenuses BaseSpace Sequence Hub proaktiivseks režiimiks, käituse jälgimiseks ja andmesalvestuseks. Kasutage vaikimisi väljundkaustana ainult välist või võrguketast. Seadmel asuva väljundkausta kasutamine mõjutab teie sekveneerimiskäitust negatiivselt.

Välise ketta väljundkausta määramine

Kasutage järgmiseid juhiseid, et valida väline teisaldatav ketas vaikimisi väljundkaustaks. Soovitav on omatoitega ketas, mis on vormindatud kui NFTS või GPT/EXTA.

1. Ühendage väline teisaldatav ketas, kasutades USB 3.0 porti seadme küljel või taga. Veenduge, et väline teisaldatav ketas lubaks kirjutusõigusi. Kui see on häälestatud kirjutuskaitstuna, ei saa juhtimistarkvara sellele andmeid salvestada.
2. Looge välisel teisaldataval kettal uus kaust. Sellest kaustast saab vaikimisi väljundkausta asukoht. NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara nõuab vähemalt kahe tasemega sisseehitatud kaustasid, et asukoht välisel teisaldataval kettal ära tunda.
3. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).
4. Suvandi Default Output Folder (Vaikimisi väljundkaust) alt valige eksisteeriv kausta tee ja liikuge välisel teisaldataval kettal uude kausta.
5. **[Valikuline]** Kui valisite jaotises Run Mode (Käitusrežiim) suvandi **Online Run Setup** (Veebikäituse häälestus), valige suvand Hosting Location (Hosti asukoht) rippmenüüst.
6. Valige käsk **Save** (Salvesta).

Võrguketta vaikimisi väljundkausta määratlemine

Kasutage järgmiseid juhiseid, et kinnitada püsiv võrguketaskas ja täpsustada vaikimisi väljundkaust. Serverisõnumiplokk (Server Message Block, SMB) / üldised interneti-failisüsteemid (Common Internet File Systems, CIF-id) ja võrgufailisüsteem (Network File System, NFS) on ainsad võrgudraivi NextSeq 1000/2000-ga püsivalt ühendamise viisid.

SMB/CIFS-i kinnitamise juhised

1. Kui NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara on avatud, valige **Minimize Application** (Minimeeri rakendus).
2. Logige ilmnadmini sisse.

¹Sisaldab iga sekveneerimistsükli iga klastri aluse nimetust ja seostatud kvaliteediskoori.

3. Valige **Applications** (Rakendused).
4. Suvandi Favourites (Lemmikud) all valige **Terminal**.
5. Sisestage `sudo touch /root/.smbcreds` ja seejärel valige **Enter**.
6. Sisestage ilmnadmini parool, kui seda teie käest küsitakse.
Ilmnadmini parool on vajalik iga kord, kui kasutate `sudo`-käsku.
7. Sisestage `sudo gedit /root/.smbcreds` ja seejärel valige **Enter**, et avada tekstifail nimega `smbcreds`.
8. Kui tekstifail `.smbcreds` avaneb, sisestage oma võrgu sisselogimisandmed järgmises vormingus.

```
username = <kasutajanimi>
password = <parool>
domain = <domeeni_nimi>
```

Sulud ei ole kasutajanime, parooli ega domeeni volituste jaoks vajalikud. Domeeni volitused on nõutavad ainult siis, kui kaugkonto on domeeni osa.
9. Valige **Save** (Salvesta) ja väljuge failist.
10. Tuvastage serveri nimi ja SMB/CIF-ide serveri ühiskasutusnimi.
Serveri nimel ega ühiskasutusnimel ei saa olla tühikuid, näiteks:
serveri nimi: `192.168.500.100` või `Myserver-myinstitute-03`
ühiskasutusnimi: `/share1`
11. Sisestage terminalis `sudo chmod 400 /root/.smbcreds` ja valige seejärel **Enter**, et anda tekstifailile `.smbcreds` lugemisjuurdepääs.
12. Sisestage `sudo mkdir /mnt/<kohalik nimi>`.
`<kohalik nimi>` on uue kataloogi nimi teie võrgudraivil ja võib sisaldada tühikuid. See on kataloog, mis ilmub seadmes.
13. Valige **Enter**.
14. Sisestage `sudo gedit /etc/fstab` ja seejärel valige **Enter**.
15. Kui fail `fstab` avaneb, sisestage järngev faili lõppu ja seejärel valige **Enter**.

```
//<Serveri nimi>/<Ühiskasutusnimi> /mnt/<kohalik nimi> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```
16. Valige **Save** (Salvesta) ja väljuge failist.
17. Sisestage terminalis `sudo mount -a -vvv` ja seejärel valige **Enter**.
Võrguketas on nüüd paigaldatud kujul `/mnt/<kohalik nimi>`.
18. Paigaldamise õnnestumise kinnitamiseks sisestage `<df | grep <kohalik nimi>>` ja seejärel valige **Enter**.
Ilmuma peaks failide ühiskasutusnimi
19. Sisestage `sudo mkdir /mnt/<kohalik nimi>/<väljundteek>`, et luua kohaliku kataloogi sees alamkaust. `<väljundkataloog>` esindab teie vaikumisi väljundkausta asukohta.

NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara nõuab vähemalt kahe tasemega sisseehitatud kaustasid, et asukoht paigaldatud võrgukettal ära tunda.

20. Taaskäivitage seade. Vt [Seadme taaskäivitamine leheküljel 80](#).
21. Määrake püsivalt paigaldatud võrguketas vaikimisi väljundkaustaks. Vt [Püsivalt paigaldatud võrguketta vaikimisi väljundkaustana määratlemine leheküljel 16](#).

NFS-i paigaldamise juhised

1. Kui NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara on avatud, valige **Minimize Application** (Minimeeri rakendus).
2. Logige ilmnadmini sisse.
3. Tuvastage oma NFS-i serveri nimi.
Serveri nimes ei saa olla tühikuid, näiteks:
serveri nimi: 192.168.500.100 või Myserver-myinstitute-03
4. Valige **Applications** (Rakendused).
5. Suvandi Favourites (Lemmikud) all valige **Terminal**.
6. Sisestage `sudo mkdir /mnt/<local name>` ja vajutage **Enter**.
<kohalik nimi> on uue kataloogi nimi teie võrgudraivil.
7. Sisestage `sudo gedit /etc/fstab` ja seejärel valige **Enter**.
8. Kui fail `fstab` avaneb, sisestage järgev ja seejärel valige **Enter**.
Serveri nimi: /share //mnt/<local name> nfs x-systemd.automount,defaults 0 0
9. Valige **Save** (Salvesta) ja väljuge failist.
10. Sisestage terminalis `sudo mount -a -vvv` ja seejärel valige **Enter**.
Võrguketas on nüüd paigaldatud kausta /mnt/directory kaustas <kohalik nimi>.
11. Looge uus <alamkaust> kaustas <kohalik nimi>. Alakaust esindab teie vaikimisi väljundkausta asukohta.
NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara nõuab vähemalt kahe tasemega sisseehitatud kaustasid, et asukoht paigaldatud võrgukettal ära tunda.
12. Taaskäivitage seade. Vt [Seadme taaskäivitamine leheküljel 80](#).
13. Määrake püsivalt paigaldatud võrguketas vaikimisi väljundkaustaks. Vt [Püsivalt paigaldatud võrguketta vaikimisi väljundkaustana määratlemine leheküljel 16](#).

Püsivalt paigaldatud võrguketta vaikimisi väljundkaustana määratlemine

1. Logige ilmnuserisse sisse.
2. Valige NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).
3. Vaikimisi väljundkausta alt valige püsiv võrguketta paigalduskoht, milleks on
/mnt/<kohalik nimi>/<väljundteek>.

4. **[Valikuline]** Kui valisite jaotises Run Mode (Käitusrežiim) suvandi **Online Run Setup** (Veebikäituse häälestus), valige suvand hosti asukoha rippmenüüst.
5. Valige käsk **Save** (Salvesta).

Kohandatud referentsgenoomide importimine

Uusi kohandatud referentsgenoome saab importida ainult administraatori kontot kasutades. Kõikide ühilduvate referentsgenoomide jaoks külastage NextSeq 1000/2000 toote ühilduvuse lehte.

1. Looge referentsgenoom, kasutades Illumina seadmete rakenduse BaseSpace Sequence Hub referentsi loojat. Lisateavet vt *Illumina seadmete versiooni 1.0.0 rakenduse referentsi looja võrguspikker*.
2. Valige juhtimistarkvara menüü ja seejärel valige **Process Management** (Toiminguhaldus).
3. Veenduge, et käimas ei oleks ühtegi sekveneerimiskäitust ega seadmes toimuvaid sekundaarseid analüüse.
4. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Minimize Application** (Minimeeri rakendus).
5. Logige ilmnadmini sisse.
6. Valige juhtimistarkvara menüü ja seejärel valige **DRAGEN**.
7. Jaotises Genome (Genoom) valige **View Installed Genomes** (Kuva installitud genoomid), et vaadata kõikide hetkel installitud Illumina ja kohandatud genoomide loendit.
8. Sulgege modaal.
9. Valige jaotises Import New Reference Genomes (Impordi uued referentsgenoomid) suvand **Choose** (Vali), liikuge teisaldatavas või paigaldatud võrgukettas referentsgenoomi faili (*.tar.gz) ja seejärel valige **Open** (Ava).
10. Valige suvand **Import** (Impordi).

Müra alusjoone failide importimine

Kui kasutate DRAGEN-i rikastamise töövoogu somaatilises režiimis, saate kasutada müra alusjoone faili, et filtreerida välja sekveneerimise või süstemaatiline müra. Saate laadida alla standardsed kohandatud mürafailid [Illumina tugiteenuste lehelt](#) või luua kohandatud müra alusjoone faili.

Kohandatud müra alusjoone faili loomine

Kui kasutate somaatilist režiimi, saate luua kohandatud müra alusjoone faili. Müra alusjoone fail on loodud, kasutades tavapäraseid proove, mis ei ühti uuritavaga, kellelt proovid pärinevad. Tavapäraste proovide soovitatav arv on 50.

Kohandatud müra alusjoone faili loomiseks kasutage üht järgmistest meetoditest.

- Kasutage DRAGEN Bio-IT platvormi serverit. Juhiste saamiseks vaadake *DRAGEN Bio-IT platvormi võrguspikrit*.

- Kasutage DRAGEN-i alusjoone koostamise rakendust BaseSpace Sequence Hubis. Kasutage FASTQ-failide loomiseks BCL-i konvertimise konveierit BaseSpace Sequence Hubi seadme kaituse häälestamises. Pärast seda kui sekvenerimiskaitus on lõppenud ja 50 proovi on saadaval, sisestage FASTQ-failid DRAGEN-i alusjoone koosterakendusse.

Alusjoone failide importimine kasutajaliidest kasutades

Pärast alusjoone faili importimist saate häälestada oma sekvenerimiskaituse, kasutades somaatilises režiimis DRAGEN-i rikastamise töövoogu.

1. Laadige alla standardne alusjoone fail [Illumina tugiteenuste lehelt](#) või laadige alla kohandatud alusjoone fail DRAGEN-i serverist või DRAGEN-i alusjoone koosterakendusest.
2. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Minimize Application** (Minimeeri rakendus).
3. Logige ilmnadmini sisse.
4. Valige **Applications** (Rakendused) ja seejärel valige **Favorites** (Lemmikud).
5. Valige **+Other Locations** (+ Muu asukoht) ja seejärel valige **Computer** (Arvuti).
6. Topeltklõpsake suvandil **usr** (Kasutaja) ja seejärel suvandil **local** (Kohalik).
7. Topeltklõpsake suvandil **illumina** ja seejärel failil **aux_files**.
8. Lohistage müra alusjoone fail faili **aux_files**.

Alusjoone failide importimine terminali kasutades

Pärast alusjoone faili importimist saate häälestada oma sekvenerimiskaituse, kasutades somaatilises režiimis DRAGEN-i rikastamise töövoogu.

1. Laadige alla standardne alusjoone fail [Illumina tugiteenuste lehelt](#) või laadige alla kohandatud alusjoone fail DRAGEN-i serverist või DRAGEN-i alusjoone koosterakendusest.
2. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Minimize Application** (Minimeeri rakendus).
3. Logige ilmnadmini sisse.
4. Valige **Applications** (Rakendused).
5. Suvandi Favourites (Lemmikud) all valige **Terminal**.
6. Sisestage järgmine käsk.

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

Käitusrežiimi konfigureerimine

Käitusrežiim kehtib kõigile kaitustele ja määratleb, kuhu sisestada kaituse parameetrid ja kuidas andmeid analüüsida.

Pilve- või hübriidrežiim

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).

2. Valige rakenduse BaseSpace Sequence Hub ja proaktiivse toe valikutest suvand **Online Run Setup** (Veebikäituse häälestamine).
3. Konfigureerige vastavad lisaääted õigesti, valides järgmised.
 - a. **Proactive and Run Monitoring** (Proaktiivne tugi ja käituse jälgimine) või **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktiivne tugi, käituse jälgimine ja andmesalvestus).
 - b. Rippmenüü **Hosting Location** (Hosti asukohad).
 - c. **[Valikuline]** Sisestage **privaatne domeeninimi**.
4. Valige käsk **Save** (Salvesta).

Kohalik või eraldiseisev režiim

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).
2. Valige rakenduse BaseSpace Sequence Hub ja proaktiivse toe valikutest suvand **Local Run Setup** (Kohaliku käituse häälestamine).
3. Konfigureerige vastavad lisaääted õigesti, valides järgmised.
 - a. **Proactive Support Only** (Ainult proaktiivne tugi), **Proactive and Run Monitoring** (Proaktiivne tugi ja käituse jälgimine), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktiivne tugi, käituse jälgimine ja andmesalvestus) või **None** (Puudub).



BaseSpace Sequence Hub lubab uuesti järjestamise funktsionaalsusi ainult siis, kui valitud on **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktiivne tugi, käituse jälgimine ja andmesalvestus). Kui tegemist on kehtetu proovilehega, lubatakse teil proovilehte parandada ja järjestada uuesti demultipleksimise analüüse. Seadmel teostatava uuesti järjestamise funktsionaalsuseks vaadake jaotist [Käituse uuesti järjestamine leheküljel 80](#).

- b. Rippmenüü **Hosting Location** (Hosti asukohad).
 - c. **[Valikuline]** Sisestage **privaatne domeeninimi**.
4. Valige käsk **Save** (Salvesta).

Proovilehe valikud kohaliku või eraldiseisva režiimi jaoks

Rakendusega DRAGEN analüüsimiseks peate kasutama proovilehe vormingut v2. Proovilehe vorming v2 sobib ka rakendustega BaseSpace Sequence Hub, mis ei ole DRAGEN-i poolt lubatud. Teavet v2 failivormingus proovilehe koostamise kohta vt [Proovilehe v2 sätted leheküljel 84](#).

Seadme kohandamine

See jaotis sisaldab teavet saavaolevate kohandamissätete konfigureerimise kohta. Vaikimisi väljundkausta määramiseks vt [Vaikimisi väljundkausta asukoha määramine leheküljel 14](#).

Seadme nimetamine

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).
2. Valige seadme hüüdnimi ja sisestage seadme jaoks soovitud nimi.
Nimi kuvatakse iga ekraani ülaosas.
3. Valige käsk **Save** (Salvesta).

Denatureerimise ja lahjendamise eelistuste määramine

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).
2. Valige, kas denatureerida ja lahjendada teeke seadmes automaatselt. Sätte vaikevalik vastab eelmisele käitusele valitud suvandile.
 - Teekide automaatselt seadmes denatureerimise ja lahjendamise jaoks valige märkeruut **Denature and Dilute On Board** (Kohapealne denatureerimine ja lahjendamine).
 - Teekide käsitsi denatureerimise ja lahjendamise jaoks tühjendage valik märkeruudus **Denature Dilute On Board** (Kohapealne denatureerimine ja lahjendamine).Teekide käsitsi denatureerimise ja lahjendamise juhiseid vaadake *NextSeq 1000 ja 2000 denatureerimise ja lahjendamise juhendist (dokument nr 1000000139235)*

Reaktiivi automaatse puhastamise eelistuse määramine

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).
2. Valige, kas süsteem suunab kasutamata reaktiivid automaatselt pärast iga käitamist kasutatud reaktiivide mahutisse, et muuta reaktiivijäätmete kõrvaldamine pärast iga käituse lõpetamist sujuvamaks.
 - Automaatseks puhastamiseks valige märkeruut **Purge Reagent Cartridge** (Puhasta reaktiivikassett).
 - Automaatse puhastamise vahelejätmiseks tühistage valik märkeruudus **Purge Reagent Cartridge** (Puhasta reaktiivi kassett).Kasutamata reaktiivide puhastamine lisab töövoole kuni 2 tundi.
3. Valige käsk **Save** (Salvesta).

Tarkvarauuenduste konfigureerimine

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).
2. Valige, kas süsteem otsib automaatselt tarkvaravärskendusi.
 - Automaatseks otsimiseks märkige ruut **Autocheck for software updates** (Otsi tarkvaravärskendusi automaatselt).
 - Käsitsi kontrollimiseks tühjendage ruut **Autocheck for software updates** (Otsi tarkvaravärskendusi automaatselt).

Tarkvaravärskenduste automaatne otsimine vajab internetiühendust. Lisateavet tarkvaravärskenduste installimise kohta vt [Tarkvaravärskendused leheküljel 72](#).

3. Valige käsk **Save** (Salvesta).

LCD heleduse muutmine

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).
2. Liigutage LCD heleduse liugur soovitud protsendile.
3. Valige käsk **Save** (Salvesta).

Puhverserveri määramine

Puhverserveri tugi on saadaval ainult NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvaras v1.3.

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Settings** (Sätted).
2. Valige praeguse puhverserveri seadmed, et avada kuva Proxy Settings (Puhverserveri sätted).
3. Valige märkeruut **Enable Proxy** (Luba puhverserver) ja seejärel sisestage serveri IP-pordi aadress.
4. **[Valikuline]** Kui puhverserver nõuab autentimist, valige märkeruut **Requires Username and Password** (Vajab kasutajanime ja parooli) ning sisestage kasutajanimi ja parool.
5. Valige käsk **Save** (Salvesta), et salvestada ja kinnitada puhverserveri teave.
6. Valige üks järgmistest valikutest.
 - Valige **Yes, I'm Finished** (Jah, ma olen lõpetanud), et taaskäivitada süsteem ja lisada uue puhverserveri sätted.
 - Valige **No, Take Me Back** (Ei, vii mind tagasi), et naasta kuvale Settings (Sätted). Uue puhverserveri sätted on salvestatud, kuid ei rakendata enne, kui taaskäivate süsteemi.

Kulutarvikud ja vahendid


Selles jaotises on loetletud kõik, mis on reaktiivikomplektiga kaasas, ning vastavad säilitustingimused. Siit leiate ka teabe täiendavate kulutarvikute ja vahendite kohta, mida ostma peaksite, et lõpetada protokoll ja teha hoolduse ning tõrkeotsingu protseduure.

Sekvenerimise kulutarvikud

Seadmega NextSeq 1000/2000 sekvenerimine vajab üht ühekordseks kasutuseks mõeldud Illumina NextSeq 1000/2000 P2 reaktiivikomplekti või ühte ühekordseks kasutuseks mõeldud Illumina NextSeq 1000/2000 P3 reaktiivikomplekti. NextSeq 1000/2000 P2 reaktiivikomplekt on saadaval kolmes suuruses (100 tsükli, 200 tsükli, 300 tsükli) ja NextSeq 1000/2000 P3 reaktiivikomplekt on saadaval neljas suuruses (50 tsükli, 100 tsükli, 200 tsükli, 300 tsükli).

Sekvenerimissüsteem NextSeq 1000 sobib ainult Illumina NextSeq 1000/2000 P2 reaktiivikomplektiga. Reaktiivikomplektis on sekvenerimiseks vajalik kassett ja läbivooluküvett. Kui saate NextSeq 1000/2000 P2 reaktiivi või Illumina NextSeq 1000/2000 P3 reaktiivikomplekti kätte, tehke järgmist.

- Nõuetekohase toimivuse tagamiseks pange komponendid kohe hoiule näidatud temperatuuridel.
- Ärge avage hõbedast fooliumkotti enne, kui ei ole juhendatud seda tegema.
- Hoiustage kassette nende karbis, et vältida fooliumkoti rebenemist või läbistamist.
- Hoiustage kassette selliselt, et nooled oleksid suunatud üles.

 Kui kassett ei asetse sildiga ülespoole, võib see sekvenerimisandmeid negatiivselt mõjutada.

Tabel 2. Komplekti komponendid

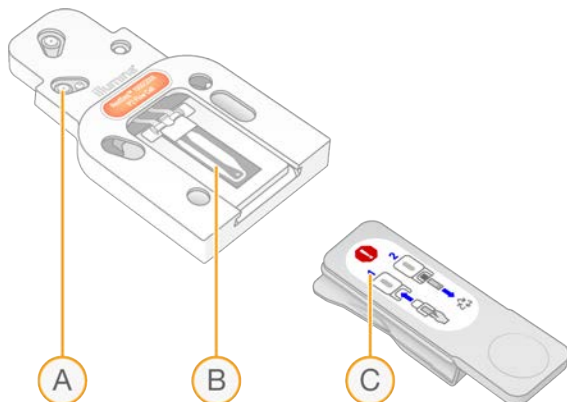
Kulutarvik	Kogus	Hoiustamistemperatuur	Mõõtmed
Kassett	1	-25 °C kuni -15 °C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm (11,5 tolli × 7 tolli × 5 tolli)
Läbivooluküvett	1	2 °C kuni 8 °C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm (8,5 tolli × 5 tolli × 0,75 tolli)
RSB koos Tween 20-ga	1	-25 °C kuni -15 °C	4 cm × 6,6 cm × 5 cm (1,6 tolli × 2,6 tolli × 2 tolli)

* Tarnitakse toatemperatuuril.

Mõlemal kulutarvikul on identifitseerimisandmed jälgimiseks ja ühilduvuse tagamiseks. Kassett ja läbivooluküvett kasutavad RFID-d¹.

Läbivooluküvett

Läbivooluküvett on muustriline, üherajaline läbivooluküvett. Klaasist läbivooluküveti ümbritseb plastkassett. Hall sakk katab ja ulatub läbivooluküvetist välja, et tagada ohutu käsitlemine.



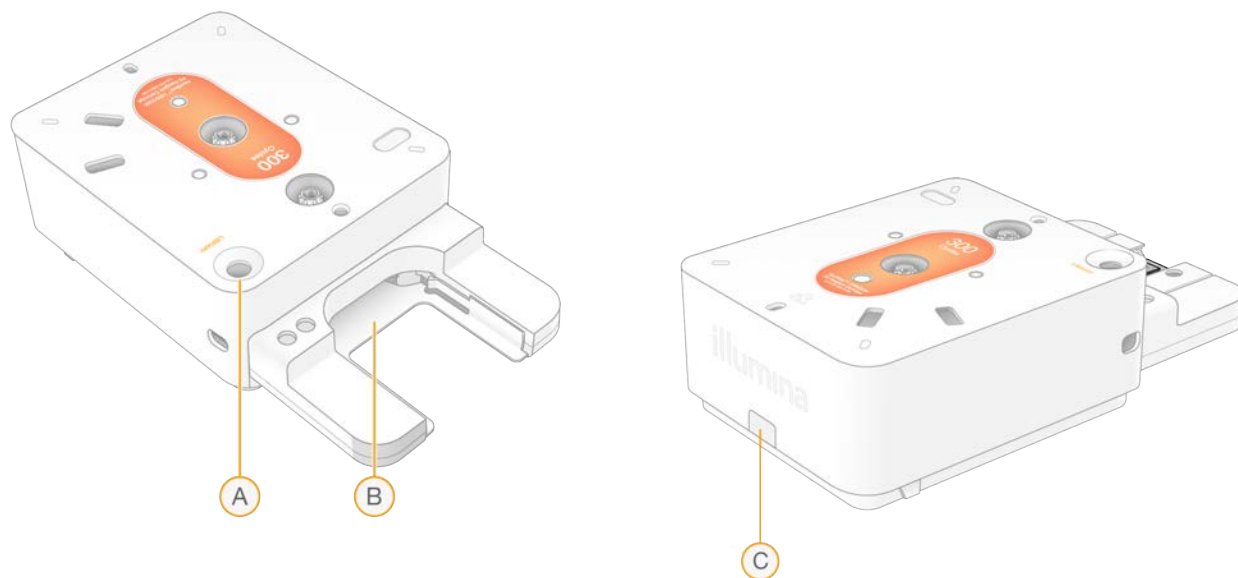
- A. Plastkassett
- B. Läbivooluküvett
- C. Hall sakk

Läbivooluküveti sisemist pinda katavad miljonid nanosüvendid. Nanosüvendites luuakse klastrid, millest seejärel tehakse sekveneerimisreaktsioon. Nanosüvendite muustriline järjestus suurendab väljundlugemeid ja andmeid.

¹raadiosageduslik identifitseerimine

Kassett

Sekvenerimisreaktiivide kassett on eeltäidetud klasterdus-, sekvenerimis-, paaristulemuse ja indekseerimisreaktiividega. Fooliumiga suletud mahuti on mõeldud teekide jaoks ja esipaneelil olev pesa läbivooluküveti jaoks.



- A. Teegimahuti
- B. Läbivooluküveti pesa
- C. Äravoolu kork

Kassett sisaldab kõiki käituseks vajalikke kulutarvikuid: reaktiivid, teek ja läbivooluküvett. Teek ja läbivooluküvett laaditakse sulatatud kassetti, mis seejärel laaditakse seadmesse. Pärast käituse algust kantakse reaktiivid ja teek automaatselt kassetist edasi läbivooluküveti.

Kassett sisaldab pumпасid, klappe ja kõiki vedelikusüsteeme, sh põhjas paiknevat mahutit kasutatud reaktiivide kogumiseks. Kassett kõrvaldatakse pärast käitust, seega pole seadet vaja pesta.

Toetatud tsüklite arv

Kassetil olev silt näitab, kui palju tsükleid analüüsitakse, mitte seda, kui palju tsükleid on tehtud. Läbivooluküvett ühildub mis tahes arvu tsüklite ja iga lugemistüübiga.

Kõik 100-tsüklilised ja 200-tsüklilised kassetid sisaldavad 38 lisatsükli. 300-tsükliline kassett sisaldab 27 lisatsükli. Näiteks 300-tsükliline kassett tagab piisavad reaktiivid kuni 327 sekvenerimistsükli jaoks. Teavet selle kohta, kui palju tsükleid sekvenerida, vt [Tsüklite arv lugemises leheküljel 30](#).

Sümbolite kirjeldused

Järgmises tabelis kirjeldatakse kulutarvikute või nende pakendite sümboleid.

Sümbol	Kirjeldus
	Kulutarviku aegumiskuupäev. Parimate tulemuste saamiseks kasutage kulutarvik ära enne seda kuupäeva.
	Viitab tootjale (Illumina).
	Kavandatud kasutusotstarve on ainult teadustöö (RUO).
	Näitab osa numbrit, et võimaldada kulutarviku tuvastada. ¹
	Näitab partii koodi, et tuvastada pakett või partii, milles kulutarvik valmistati. ¹
	Näitab terviseriski.
	Säilitamise temperatuurivahemik Celsiuse kraadides. Säilitage kulutarvikut näidatud temperatuurivahemikus. ²

Täiendavad kulutarvikud

Ostke sekveneerimiseks ja hoolduseks järgmised kulutarvikud ja -materjalid.

Sekvenerimise kulutarvikud

Tabel 3. Sekvenerimise kulutarvikud

Kulutarvik	Tarnija	Otstarve
Ühekordsed kindad, talgita	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Üldotstarbeks.
NextSeq 1000/2000 P2 (ver 3) reaktiivikomplekt	Illumina: katalooginr 20046811 (100 tsükli) katalooginr 20046812 (200 tsükli) katalooginr 20046813 (300 tsükli)	Sisaldab töötsükli kassetti, läbivooluküvetti ja NextSeq 1000/2000 RSB-d Tween 20-ga ühe käituse jaoks. NextSeq 1000-ga ja NextSeq 2000-ga ühilduv.
NextSeq 2000 P3 reaktiivikomplekt	Illumina katalooginr 20046810 (50 tsükli) katalooginr 20040559 (100 tsükli) katalooginr 20040560 (200 tsükli) katalooginr 20040561 (300 tsükli)	Sisaldab töötsükli kassetti, läbivooluküvetti ja NextSeq 1000/2000 RSB-d Tween 20-ga ühe käituse jaoks. Ühildub ainult NextSeq 2000-ga.
Mikrokatsutid, 1,5 ml	Fisher Scientific, katalooginr 14-222-158 või samaväärsed vähesiduvad katsutid	Teekide lahjendamiseks laadimiskontsentratsioonini.
Pipeti otsakud, 10 µl	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Teekide lahjendamine.
Pipeti otsakud, 20 µl	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Teekide lahjendamine ja laadimine.
Pipeti otsakud, 200 µl	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Teekide lahjendamine.
Pipeti otsakud, 1000 µl	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Teegimahuti fooliumi läbistamiseks.
[Valikuline] PhiX Control ver 3	Illumina, katalooginr FC-110-3001	Ainult PhiX-i kasutamine või PhiX-kontrolli tegemine.
[Valikuline] Paberkäterätikud	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Kasseti kuivatamiseks pärast sulatamist vesivannis.

Hoolduse kulutarvikud

Tabel 4. Hoolduse kulutarvikud

Kulutarvik	Tarnija	Otstarve
Ühekordsed kindad, talgita	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Üldotstarbeks.
NextSeq 1000/2000 õhufiltri asendamine*	Illumina, katalooginr 20029759	Õhufiltri asendamiseks iga kuu kuu tagant.

* Seadme tarnekomplekt sisaldab üht paigaldatud tarvikut ja üht varukomponenti. Kui garantii ei kehti, peab kasutaja varukomponendid ise hankima. Hoidke kuni kasutamiseni pakendatult.

Täiendavad vahendid

Ostke järgmine varustus sekveneerimise jaoks.

Toode	Päritolu	Otstarve
Sügavkülmik, -25 °C kuni -15 °C	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Kasseti hoiustamiseks.
Jäänõu	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Teekide säilitamiseks sekventeerimiseni.
Pipett, 10 µl	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Teekide lahjendamiseks laadimiskontsentratsioonini.
Pipett, 20 µl	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Teekide lahjendamiseks laadimiskontsentratsioonini ja teekide kassetti laadimiseks.
Pipett, 200 µl	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Teekide lahjendamiseks laadimiskontsentratsioonini.
Külmkapp, 2 °C kuni 8 °C	Tavapäraselt laboritarvete tarnijalt	Läbivooluküveti hoiustamiseks või kasseti sulatamiseks.

Toode	Päritolu	Otstarve
<p>[Valikuline] Üks järgmistest kontrollitava temperatuuriga vesivannidest või samaväärne, mis suudab hoida temperatuuri 25 °C:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Thermo Scientific Precisioni 35L tsirkulatsiooniga veevann (mahutab korruga 5 kassetti) • SHEL LAB 22L digitaalne tsirkulatsiooniga veevann (mahutab korruga 3 kassetti) 	<ul style="list-style-type: none"> • Thermo Fisher Scientific, kataloogi nr TSCIR 35 • Shel Lab, kataloogi nr SWBC22 	<p>Kasseti sulatamiseks.</p>

Protokoll

See jaotis sisaldab samm-sammulisi suuniseid, kuidas ette valmistada kulutarvikuid, lahjendada teeke ja seadistada sekvenerimiskäitus ühes neljast käituserežiimist (pilv, hübriid ja kohalik režiim kasutavad DRAGEN-it või rakendust BaseSpace Sequence Hub, samal ajal kui eraldiseisev režiim on eraldiseisev käitus, mis on mõeldud loomaks cBCL-i andmeid ainult kohandatud analüüsi töövoogudele).

Reaktiivide ja muude kemikaalide käsitsemisel kandke kaitseprille, laborikitlit ja puudrita kindaid.

Enne protokolliga käivitamist veenduge, et teil oleksid vajalikud kulutarvikud ja vahendid olemas. Vaadake jaotist [Kulutarvikud ja vahendid leheküljel 22](#).

Järgige protokolle näidatud järjekorras, kasutades määratud mahte, temperatuure ja kestusi.

Sekvenerimise kaalutlused

Enne protokolliga alustamist vaadake üle järgmine informatsioon, et valmistada teekide lahjendamiseks ja käituse häälestamiseks. Optimaalse laadimiskontsentratsiooni saavutamine on kriitiline edukaks sekvenerimiseks ja analüüsiks. Õige tsükli arvu numbri käitusesse sisestamine tagab optimaalseima andmete väljutuse.

Laadimismaht ja kontsentratsioonid

Laadimismaht on 20 µl. Laadimiskontsentratsioon oleneb teegi tüübist.

Teegi tüüp	Laadimiskontsentratsioon (pM)
AmpliSeq™ Illumina Library PLUS-i jaoks	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep rikastamisega	1000
Illumina Stranded Total RNA koos Ribo-Zero Plusiga	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA PCR-vaba	1000
100% PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1200
TruSeq DNA Nano 550	1500
TruSeq Stranded mRNA	1000

Teiste teegitüüpide puhul on soovitatav algne laadimiskontsentratsioon 650 pM. Optimeerige seda kontsentratsiooni järgmiste käituste ajal, et tuvastada laadimiskontsentratsioon, mis annab järjepidavalt nõudmistele vastavaid tulemusi.



Laadimiskontsentratsiooni optimeerimiseks kasutage % laadimiskontsentratsiooni mõõdikut `PrimaryAnalysisMetrics.csv` väljundfailis, mis on kättesaadav pärast käituse lõppu. Kui laadimiskontsentratsioon on < 95%, suurendage laadimiskontsentratsiooni 100 pM võrra sammhaaval hilisemate käituste ajal.

Tsüklite arv lugemises

Iga lugemise puhul aitab vähemalt 26 ja kõige rohkem 151 tsükli sisestamine tagada andmete kvaliteedi. Tsüklite täpne arv oleneb teie katsest. Juhtimistarkvara NextSeq 1000/2000 nõuab 1 lugemiseks vähemalt 1 tsükli, kuid kuvab hoiatust, kui tsüklite arv 1. lugemises on väiksem kui 26.

1. lugemise, 1. indeksi, 2. indeksi ja 2. lugemise tsüklite koguarv ei saa olla suurem kui tsüklite arv, mida toetab komplekt, pluss 38 tsükli 100-tsükliliste ja 200-tsükliliste komplektide korral ja 27 tsükli P3 300-tsükliliste komplektide korral. Juhtimistarkvara NextSeq 1000/2000 kuvab hoiatust, kui 1. indeks ja 2. indeks on väiksemad kui 6 tsükli. Hoiatust ei näidata kui 1. indeks või 2. indeks on 0 tsükli.

Tsüklite minimaalne ja maksimaalne arv hõlmab lisatsükli. Lisage soovitud lugemispikkusele alati üks tsükkel, et korrigeerida faasimise ja eelfaasimise mõju. Lugemispikkus on *sekveneerimistsüklite* arv 1. ja 2. lugemises, mis ei hõlma lisatsükleid ja indekstsükleid. Lisateabe saamiseks järkjärgulise parandamise kohta vaadake jaotist [Reaalajas analüüsi töövoog leheküljel 55](#).

Käituse häälestamise näide.

- Lugemispikkuse 35 (üksiklugemine) korral sisestage väljale Read 1 (1. lugemine) väärtus **36**.
- Lugemispikkuse 150 korral iga lugemise kohta (paaristulemus) sisestage väljale Read 1 (1. lugemine) väärtus **151** ja väljale Read 2 (2. lugemine) väärtus **151**.

BaseSpace Sequence Hubi sekveneerimiskäituse planeerimine

Kasutage BaseSpace Sequence Hubis seadme käituse häälestust, et luua ja konfigureerida teie käituse sätteid. Kui häälestate käitust pilve- või hübriidrežiimis, esitage käituse konfiguratsioon teenuse BaseSpace Sequence Hub konto vahekaardi Planned Runs (Planeeritud käitused) planeeritud käituste loendis. Käitused, mis on NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 sekveneerimissüsteemides sekveneerimiseks saadaval, kuvatakse vahelehel Planned Runs (Planeeritud käitused). Kui häälestate käitust kohalikus režiimis, kasutage seadme käituse häälestust, et luua ja eksportida oma proovileht v2 failivormingus. Teise võimalusena vaadake jaotist [Proovilehe v2 sätteid leheküljel 84](#), et luua oma proovileht ilma BaseSpace Sequence Hubita, kasutades etteantud malli.

BaseSpace Sequence Hub seadme käituse häälestus ei toeta enam kui 1536 proovi.

Käituse häälestamine

1. Navigeerige BaseSpace Sequence Hubi.
2. Sisestage oma meiliaadress ja teenuse BaseSpace Sequence Hub parool, seejärel valige suvand **Sign in** (Logi sisse).
3. Valige vahekaart **Runs** (Käitused) ja seejärel valige rippmenüü **New Run** (Uus käitus).
4. Valige **NextSeq 1000/2000**.
5. Sisestage väljale Run Name (Käituse nimi) soovitud kordumatu nimi praeguse käituse identifitseerimiseks.

Käituse nimi võib sisaldada maksimaalselt 225 tähtnumbrilist märki, vahesid, sidekriipse ja alakriipse.

6. Valige üks järgmistest analüüsi asukohtadest.
 - **BaseSpace** – analüüsige sekveneerimisandmeid pilves.
 - **Kohalik** – analüüsige sekveneerimisandmeid seadmes või tekitage proovilehe v2 kohaliku või hübriidrežiimi jaoks.
7. Valige analüüsi tüüp ja versioon.

Rohkema teabe saamiseks sekundaarse analüüsi kohta vt [DRAGEN-i sekundaarse analüüsi väljundfailid leheküljel 60](#) või tutvuge rakenduse BaseSpace Sequence Hub dokumentatsiooniga. Kui valisite DRAGEN-i üksikraku RNA analüüsi, vaadake teavet kolmanda osapoole üksikraku RNA teegi ettevalmistuskomplekti ühilduvuse kohta NextSeq 1000/2000 tootefailide lehel.



Seadmes analüüsimise jaoks valitud versioon peab kattuma DRAGEN-i seadmele installitud versiooniga. Seadmele installitud DRAGEN-i versiooni kinnitamiseks vt [DRAGEN-i töövoog ja litsentsi uuendused leheküljel 74](#).

8. **[Valikuline]** Häälestage kohandatud indeksikomplektid järgnevalt.
Kui kasutate rohkem kui ühte teeki, peavad teekide indeksite lugemid olema sama pikkusega.
 - a. Valige rippmenüüs Index Adapter Kit (Indeksi adapterikomplekt) suvand **Add Custom Index Adapter Kit** (Lisa kohandatud indeksi adapterikomplekt).
 - b. Valige malli tüüp ja sisestage komplekti nimi, adapterijärjestus, indeksi strateegiad ja indeksijärjestused.
Veenduge, et teise indeksi (i5) adapterijärjestused oleksid pärisuunalises orientatsioonis.
 - c. Valige **Create New Kit** (Loo uus komplekt).
9. **[Valikuline]** Häälestage kohandatud teegi ettevalmistuskomplektid järgnevalt.
 - a. Valige rippmenüüs Library Prep Kit (Teegi ettevalmistuskomplekt) suvand **Add Custom Library Prep Kit** (Lisa kohandatud teegi ettevalmistuskomplekt).
 - b. Sisestage oma kohandatud teegi ettevalmistuskomplekti nimi, lugemise tüübid, vaikimisi lugemise tsükliid ja ühilduvad indeksi adapterikomplektid.
 - c. Valige **Create New Kit** (Loo uus komplekt).

10. Valige järgmised seadme sätted. Olenevalt teegi ettevalmistuskomplektist on soovitatavad valikud automaatselt valitud. Mõnedel teekide ettevalmistuskomplektidel on püsiprogrammeeritud indeksite lugemiste arv ja lugemise tüübid, mida ei saa muuta.

- Teegi ettevalmistuskomplekt
- Indeksi adapterikomplekt
- Indeksi lugemiste arv
- Lugemise tüüp
- Sekveneerimistsükli arv lugemise kohta

i | Kui teegi ettevalmistuskomplekti jaoks on valitud Not Specified (Pole määratud), ei uuendata indeksi lugemiste arvu enne, kui indeksi sekveneerimised on sisestatud jaotisse Sample Data (Proovi andmed).

11. Sisestage proovi teave arvutustabelisse Sample Data (Proovi andmed), kasutades ühte järgmistest valikutest. Proovide rühmitamiseks andmete koondamise eesmärgil määrake rühmale nimi veerus Project (Projekt).

- Valige **Import Data** (Impordi andmed) ja seejärel valige oma proovileht. Veenduge, et teie proovileht vastaks vormindamise nõuetele. Vt [Proovilehe v2 sätted leheküljel 84](#). Proovilehe muutmine pärast algset allalaadimist võib põhjustada analüüsi nurjumise.
- Kleepige proovi ID-d ja kas indeksi plaadi süvendite positsioonid või i7 ja i5 indeksid otse välisest failist. Enne kleepimist sisestage proovide ridade arv väljale Rows (Read) ja seejärel valige +. Proovi ID-d võivad sisaldada kuni 20 tähtnumbrilist märki, sidekriipsu ja alakriipsu.

i | Fikseeritud paigutusega indeksiplaadid vajavad sissekandeid süvendite positsioonide kohta. Indeks, mille paigutus ei ole fikseeritud, vajavad sissekandeid i7 ja i5 indeksite jaoks. i5 indeksid tuleb sisestada pärisuunalises orientatsioonis.

- Sisestage käsitsi proovi ID-d ja vastavad süvendite asendid või indeksid. Kui teegi ettevalmistuskomplekti jaoks on valitud Not Specified (Pole määratud), sisestage indeksi 2 (i5) järjestused pärisuunalises orientatsioonis.

12. Valige **Next** (Edasi).

Sekundaarse analüüsi loomine

Konfigureerige sätted teie käituse jaoks valitud analüüsi tüübi jaoks. Lisateabe saamiseks DRAGEN-i analüüsi töövoogude kohta vaadake jaotist [DRAGEN-i sekundaarse analüüsi väljundfailid leheküljel 60](#)

Illumina DRAGEN BCL-i konvertimine

Järgige neid suuniseid, et konfigurereida Illumina DRAGEN BCL-i konvertimise analüüs.

1. Sisestage järgmised valikulised sätted.

Säte	Kirjeldus
AdapterRead1	Adaptori sekveneerimine 1. lugemiseks. Kui kasutate Illumina teekide ettevalmistuskomplekti, jätke AdapterRead1 väli tühjaks.
AdapterRead2	Adaptori sekveneerimine 2. lugemiseks. Kui kasutate Illumina teekide ettevalmistuskomplekti, jätke AdapterRead2 väli tühjaks.
BarcodeMismatchesIndex1	Lubatud mittevastavuste arv esimese indeksi lugemise ja indeksi järjestuse vahel. Vaikeväärtus on 1. Kui vöotkood on 6 bp, on soovitatav väärtus 0.
BarcodeMismatchesIndex2	Lubatud mittevastavuste arv teise indeksi lugemise ja indeksi järjestuse vahel. Vaikeväärtus on 1. Kui vöotkood on 6 bp, on soovitatav väärtus 0.
OverrideCycles	String, mida kasutatakse UMI tsükli määramiseks ja lugemise tsükli peitmiseks. Lubatud on järgmised väärtused. <ul style="list-style-type: none"> • N – täpsustab tsükleid, mida tuleb ignoreerida. • Y – täpsustab sekveneerimistsükleid. • I – täpsustab indeksi tsükleid. • U – täpsustab UMI tsükleid, mida tuleb kärpida. Iga element on semikoolonitega eraldatud. Järgnevad on näited sisendist OverrideCycles. U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

2. Valige, kas salvestada koopia oma FASTQ-failidest. FASTQ-failid luuakse ainult siis, kui valite FASTQ-failide allesjätmise.
3. Valige üks järgmistest FASTQ väljundvormingutest.
 - **gzip** – salvestage FASTQ-failid GZIP-vormingus.
 - **DRAGEN** – salvestage FASTQ-failid ORA-vormingus.
4. Lõpetage käituse konfigurimine.

- Käituse konfiguratsiooni saatmiseks oma rakenduse BaseSpace Sequence Hub kontole valige **Submit Run** (Esita käitus). Rakendusse BaseSpace Sequence Hub edastatud käitused kuvatakse planeeritud käituste nimekirjas ja on saadaval süsteemide jaoks, mis kasutavad pilverežiimi või hübriidrežiimi.
- Käituse konfiguratsiooni salvestamiseks proovilehena v2-failiformaadis valige **Export Sample Sheet** (Ekspordi proovileht) rippmenüüst **Submit Run** (Esita käitus). Proovileht on nõutav käituste algatamiseks süsteemidel, mis kasutavad kohalikku režiimi. See suvand on saadaval ainult juhul, kui analüüsi asukohaks valiti kohalik režiim.

Illumina DRAGEN-i rikastamine

Järgige alltoodud suuniseid, et konfigurereida Illumina DRAGEN-i rikastamise analüüs.

1. Valige referentsgenoom.
Kui võimalik, kasutage ALT-teadlikkusega referentsgenoomi.
2. Valige *.bed-fail, mis sisaldab regioone, mida sooviksite sihtida, või laadige üles uus kohandatud fail.

Veenduge, et BED-faili referentsgenoom vastaks sammus 1 valitud referentsgenoomile. Kasutage järgmist nimetamise formaati uue kohandatud BED-faili jaoks: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.

- **Local mode** (Kohalik režiim) – valige **Select Custom File (Local)** (Vali kohandatud fail (kohalik)), et laadida üles üksikuks käituseks, või **Upload Custom File (BaseSpace)** (Laadi üles kohandatud fail (BaseSpace)) mitmekordseks kasutamiseks.
 - **Cloud or Hybrid mode** (Pilve- või hübriidrežiim) – valige **Upload Custom File (BaseSpace)** (Laadi üles kohandatud fail (BaseSpace)). Kohandatud BED-fail on saadaval ainult töögrupis, kuhu see üles laaditi.
3. Valige kas idurada või somaatilise variandi nimetaja.
 4. **[Valikuline]** Kui kasutate somaatilise variandi nimetajat, valige müra alusjoone fail. Lisateabe saamiseks vt jaotist [Müra alusjoone failide importimine leheküljel 17](#).
 5. Valige kaart / joondage väljundvorming.
 6. Valige, kas salvestada koopia oma FASTQ-failidest. FASTQ-failid luuakse ainult siis, kui valite FASTQ-failide allesjätmise.
 7. Valige üks järgmistest FASTQ väljundvormingutest.
 - **gzip** – salvestage FASTQ-failid GZIP-vormingus.
 - **DRAGEN** – salvestage FASTQ-failid ORA-vormingus.
 8. Lõpetage käituse konfigurimine.

- Käituse konfiguratsiooni saatmiseks oma rakenduse BaseSpace Sequence Hub kontole valige **Submit Run** (Esita käitus). Rakendusse BaseSpace Sequence Hub edastatud käitused kuvatakse planeeritud käituste nimekirjas ja on saadaval süsteemide jaoks, mis kasutavad pilverežiimi või hübriidrežiimi.
- Käituse konfiguratsiooni salvestamiseks proovilehena v2-failiformaadis valige **Export Sample Sheet** (Ekspordi proovileht) rippmenüüst **Submit Run** (Esita käitus). Proovileht ja sekundaarset analüüsi toetavad lehed laaditakse alla *.zip-kaustas ja need peavad algatama käitusi süsteemides, mis kasutavad suvandit Local mode (Kohalik režiim). See suvand on saadaval ainult juhul, kui analüüsi asukohaks valiti kohalik režiim.

Illumina DRAGEN-i idutee

Järgige alltoodud suuniseid, et konfigurereida Illumina DRAGEN-i idutee analüüs.

1. Valige referentsgenoom.
Kui võimalik, kasutage ALT-teadlikkusega referentsgenoomi.
2. Valige kaart / joondage väljundvorming.
3. Valige, kas salvestada koopia oma FASTQ-failidest. FASTQ-failid luuakse ainult siis, kui valite FASTQ-failide allesjätmise.
4. Valige üks järgmistest FASTQ väljundvormingutest.
 - **gzip** – salvestage FASTQ-failid GZIP-vormingus.
 - **DRAGEN** – salvestage FASTQ-failid ORA-vormingus.
5. Lõpetage käituse konfigurereimine.
 - Käituse konfiguratsiooni saatmiseks oma rakenduse BaseSpace Sequence Hub kontole valige **Submit Run** (Esita käitus). Rakendusse BaseSpace Sequence Hub edastatud käitused kuvatakse planeeritud käituste nimekirjas ja on saadaval süsteemide jaoks, mis kasutavad pilverežiimi või hübriidrežiimi.
 - Käituse konfiguratsiooni salvestamiseks proovilehena v2-failiformaadis valige **Export Sample Sheet** (Ekspordi proovileht) rippmenüüst **Submit Run** (Esita käitus). Proovileht ja sekundaarset analüüsi toetavad lehed laaditakse alla *.zip-kaustas ja need peavad algatama käitusi süsteemides, mis kasutavad suvandit Local mode (Kohalik režiim). See suvand on saadaval ainult juhul, kui analüüsi asukohaks valiti kohalik režiim.

Illumina DRAGEN-i RNA

Järgige alltoodud suuniseid, et konfigurereida Illumina DRAGEN-i RNA analüüs.

1. Valige referentsgenoom.
Kui võimalik, kasutage ALT-teadlikkuseta referentsgenoomi.
2. Valige kaart / joondage väljundvorming.

3. Valige, kas salvestada koopia oma FASTQ-failidest. FASTQ-failid luuakse ainult siis, kui valite FASTQ-failide allesjätmise.
4. Valige üks järgmistest FASTQ väljundvormingutest.
 - **gzip** – salvestage FASTQ-failid GZIP-vormingus.
 - **DRAGEN** – salvestage FASTQ-failid ORA-vormingus.
5. **[Valikuline]** Laadige üles RNA annotatsioonifail geeni ülekande formaadis (GTF).
 - **Local mode** (Kohalik režiim) – valige **Select Custom File (Local)** (Vali kohandatud fail (kohalik)), et laadida üles üksikuks käituseks, või **Upload Custom File (BaseSpace)** (Laadi üles kohandatud fail (BaseSpace)) mitmekordseks kasutamiseks.
 - **Cloud or Hybrid mode** (Pilve- või hübriidrežiim) – valige **Upload Custom File (BaseSpace)** (Laadi üles kohandatud fail (BaseSpace)). Kohandatud GTF-fail on saadaval ainult töögrupis, kuhu see üles laaditi.

Kui GTF-fail on üles laaditud teenuse BaseSpace Sequence Hub töögruppi, valige rippmenüüst RNA annotatsioonifail.
6. Valige, kas lubate diferentsiaalset ekspressiooni.
7. Kui lubate diferentsiaalset ekspressiooni, valige iga proovi jaoks kontroll- või võrdlusväärtus. Igas võrdlusgrupi võrreldakse mis tahes proovi, mis on märgistatud kontrollina, kõigi proovidega, mis on märgistatud võrdlusena. Kui proov ei sisalda kontroll- või võrdlusväärtust, valige väärtuseks **na** (ei kohaldata).
8. Lõpetage käituse konfigureerimine.
 - Käituse konfiguratsiooni saatmiseks oma rakenduse BaseSpace Sequence Hub kontole valige **Submit Run** (Esita käitus). Rakendusse BaseSpace Sequence Hub edastatud käitused kuvatakse planeeritud käituste nimekirjas ja on saadaval süsteemide jaoks, mis kasutavad pilverežiimi või hübriidrežiimi.
 - Käituse konfiguratsiooni salvestamiseks proovilehena v2-failiformaadis valige **Export Sample Sheet** (Ekspordi proovileht) rippmenüüst **Submit Run** (Esita käitus). Kui esitatud on valikuline GTF-fail, laaditakse proovileht ja sekundaarset analüüsi toetavad lehed alla *.zip-kaustas ja need on vajalikud käituste algatamiseks süsteemides, mis kasutavad suvandit Local mode (Kohalik režiim). See suvand on saadaval ainult juhul, kui analüüsi asukohaks valiti kohalik režiim.

Illumina DRAGEN-i üksikraku RNA

Järgige alltoodud suuniseid, et konfigureerida Illumina DRAGEN-i üksikraku RNA analüüs.

1. Valige referentsgenoom.
Kui võimalik, kasutage ALT-teadlikkuseta referentsgenoomi.
2. **[Valikuline]** Laadige üles RNA annotatsioonifail geeni ülekande formaadis (GTF).

- **Local mode** (Kohalik režiim) – valige **Select Custom File (Local)** (Vali kohandatud fail (kohalik)), et laadida üles üksikuks käituseks, või **Upload Custom File (BaseSpace)** (Laadi üles kohandatud fail (BaseSpace)) mitmekordseks kasutamiseks.
- **Cloud or Hybrid mode** (Pilve- või hübriidrežiim) – valige **Upload Custom File (BaseSpace)** (Laadi üles kohandatud fail (BaseSpace)). Kohandatud GTF-fail on saadaval ainult töögrupis, kuhu see üles laaditi.

Kui GTF-fail on üles laaditud teenuse BaseSpace Sequence Hub töögruppi, valige rippmenüüst RNA annotatsioonifail.

3. Valige kaart / joondage väljundvorming.
4. Valige, kas salvestada koopia oma FASTQ-failidest. FASTQ-failid luuakse ainult siis, kui valite FASTQ-failide allesjätmise.
5. Valige üks järgmistest FASTQ väljundvormingutest.
 - **gzip** – salvestage FASTQ-failid GZIP-vormingus.
 - **DRAGEN** – salvestage FASTQ-failid ORA-vormingus.
6. Valige konfiguratsioon, mis on identne teie teegi ettevalmistuskomplekti tüübiga. Näiteks kui valisite ettevalmistuskomplektiks üksiku raku RNA teegikomplekti 1, valige tüüp 1 oma konfiguratsiooni tüübiks.
7. Valige vöotkoodi lugemine.
8. **[Valikuline]** Muutke aluste arvu vöotkoodis ja UMI-d. Väärtused on automaatselt täidetud selle põhjal, millise teekide ettevalmistuskomplekti ja konfiguratsiooni tüübi te valisite.
9. Valige ahela suund.
10. **[Valikuline]** Valige fail, mis sisaldab teie vöotkoodi järjestusi või laadige üles uus kohandatud fail.
11. Kui kasutate täpsemat/kohandatud konfiguratsiooni tüüpi, sisestage väärtused alistustsüklite arvu, vöotkoodi positsiooni ja UMI positsiooni jaoks.
12. Lõpetage käituse configureerimine.
 - Käituse konfiguratsiooni saatmiseks oma rakenduse BaseSpace Sequence Hub kontole valige **Submit Run** (Esita käitus). Rakendusse BaseSpace Sequence Hub edastatud käitused kuvatakse planeeritud käituste nimekirjas ja on saadaval süsteemide jaoks, mis kasutavad pilverežiimi või hübriidrežiimi.
 - Käituse konfiguratsiooni salvestamiseks proovilehena v2-failiformaadis valige **Export Sample Sheet** (Ekspordi proovileht) rippmenüüst **Submit Run** (Esita käitus). Kui esitatud on valikuline GTF-fail, laaditakse proovileht ja sekundaarset analüüsi toetavad lehed alla *.zip-kaustas ja need on vajalikud käituste algatamiseks süsteemides, mis kasutavad suvandit Local mode (Kohalik režiim). See suvand on saadaval ainult juhul, kui analüüsi asukohaks valiti kohalik režiim.

Illumina DRAGEN-i amplikon

Järgige alltoodud suuniseid, et konfigurereida Illumina DRAGEN-i amplikoni analüüs.

1. Valige referentsgenoom.
2. Valige *.bed-fail, mis sisaldab regioone, mida sooviksite sihtida, või laadige üles uus kohandatud fail.

Veenduge, et BED-faali referentsgenoom vastaks sammus 1 valitud referentsgenoomile. Kasutage järgmist nimetamise formaati uue kohandatud BED-faali jaoks: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.

- **Cloud or Hybrid mode** (Pilve- või hübriidrežiim) – valige **Upload Custom File (BaseSpace)** (Laadi üles kohandatud fail (BaseSpace)). Kohandatud BED-fail on saadaval ainult töögrupis, kuhu see üles laaditi.
 - **Local mode** (Kohalik režiim) – valige **Select Custom File (Local)** (Vali kohandatud fail (kohalik)), et laadida üles üksikuks käituseks, või **Upload Custom File (BaseSpace)** (Laadi üles kohandatud fail (BaseSpace)) mitmekordseks kasutamiseks.
3. Valige kas idutee või somaatiline variandi nimetaja.
 4. Valige kaart / joondage väljundvorming.
 5. **[Kohalik]** Valige, kas salvestada koopia oma FASTQ-failidest. FASTQ-failid luuakse ainult siis, kui valite FASTQ-failide allesjätmise.
 6. Valige, kas salvestada koopia oma FASTQ-failidest. FASTQ-failid luuakse ainult siis, kui valite FASTQ-failide allesjätmise.
 7. Valige üks järgmistest FASTQ väljundvormingutest.
 - **gzip** – salvestage FASTQ-failid GZIP-vormingus.
 - **DRAGEN** – salvestage FASTQ-failid ORA-vormingus.
 8. Lõpetage käituse konfigurimine.
 - Käituse konfiguratsiooni saatmiseks oma rakenduse BaseSpace Sequence Hub kontole valige **Submit Run** (Esita käitus). Rakendusse BaseSpace Sequence Hub edastatud käitused kuvatakse planeeritud käituste nimekirjas ja on saadaval süsteemide jaoks, mis kasutavad pilverežiimi või hübriidrežiimi.
 - **[Kohalik]** Käituse konfiguratsiooni salvestamiseks proovilehena v2-failiformaadis valige **Export Sample Sheet** (Ekspordi proovileht) rippmenüüst **Submit Run** (Esita käitus). Proovileht ja sekundaarset analüüsi toetavad lehed laaditakse alla *.zip-kaustas ja need on vajalikud käituste algatamiseks süsteemides, mis kasutavad suvandit Local mode (Kohalik režiim). See suvand on saadaval ainult juhul, kui analüüsi asukohaks valiti kohalik režiim.

Kotti pakitud kasseti ja läbivooluküveti sulatamine

See samm sulatab kasseti *avamata kotis* ja valmistab ette läbivooluküveti. Sulatage kotti pakitud kassett ühel kolmest viisist: kontrollitud temperatuuriga veevann, külmkapp või toatemperatuuril õhu käes. Kasutage kassetti kohe pärast sulatamist, külmutamata seda uuesti. Kui teil ei ole võimalik kassetti kohe pärast sulatamist kasutada, vaadake jaotist [Kulutarvikute tagastamine hoiukohta leheküljel 79](#).

Joonis 4. Kotti pakitud kassett



Sulatage kassett kontrollitud temperatuuriga veevannis.

1. Pange kätte uus paar talgita kindaid ja eemaldage kassett hoiukohast.
2. Eemaldage kassett karbist, kuid *ärge avage valget fooliumkotti*.

! Rebenenud või aukudega koti sulatamine veevannis võib põhjustada sekvenerimise ebaõnnestumise. Sulatage selle asemel toatemperatuuril või külmikus.

3. Sulatage kotti pakitud kassetti reguleeritavas veevannis temperatuuril 25 °C 6 tundi.

- Jälgige, et vee tase oleks vähemalt 9,5–10 cm olenemata sellest, kui mitut kassetti te sulatate.
- Seadke reguleeritava veevanni temperatuuriks 25 °C.
- Asetage kassett vette silt ülespoole, nii et see vee alla ei vajuks.


! Ärge üritage kassetti vee alla suruda. Kui kott ei asetse silt ülespoole või kui see pöörab ringi sulatamise ajal, võib see sekvenerimisandmeid negatiivselt mõjutada.

- Ärge hoidke veevannis üle 8 tunni.


- Ärge sulatage samal ajal rohkem kassette kui veevanni mahub. Sobivate veevannide kohta leiате teavet jaotisest [Täiendavad vahendid leheküljel 27](#).
 - Ärge laduge kassette üksteise otsa.
4. Eemaldage kassetid veevannist ja kuivatage paberrätikutega.

Sulatage kassetti külmikus

1. Pange kätte uus paar talgita kindaid.
2. Päev enne planeeritud käitust võtke kassett temperatuuriga -25 °C kuni -15 °C hoiukohast välja.
3. Eemaldage kassett karbist, kuid *ärge avage valget fooliumkotti*.
4. Asetage kassett toatemperatuuril silt ülespoole, nii et õhk saaks liikuda kõigil külgedel ja pealmisel osal.

 Kui kott ei asetse silt ülespoole, võib see sekveneerimisandmeid negatiivselt mõjutada.


5. Laske 6 tundi toatemperatuuril sulada.
6. Asetage kassett külmikusse temperatuuril 2 °C kuni 8 °C , silt ülespoole, nii et õhk saaks liikuda kõigil külgedel.

 Kui kott ei asetse silt ülespoole, võib see sekveneerimisandmeid negatiivselt mõjutada.

7. Laske 12 tundi külmkapis sulada. Ärge ületage 72 tundi.

Laske kassetil toatemperatuuril sulada

1. Pange kätte uus paar talgita kindaid.
2. Võtke kassett temperatuuriga -25 °C kuni -15 °C hoiukohast välja.
3. Eemaldage kassett karbist, kuid *ärge avage valget fooliumkotti*.
4. Asetage kassett silt ülespoole, et õhk saaks liikuda külgedel ja pealmisel osal.

 Kui kott ei asetse silt ülespoole, võib see sekveneerimisandmeid negatiivselt mõjutada.

5. Laske 9 tundi toatemperatuuril sulada. Ärge ületage 16 tundi.

Valmistage läbivooluküvett ja kassett ette.

1. Valmistage läbivooluküvett järgmiselt ette.
 - a. Võtke uus läbivooluküvett temperatuuriga 2 °C kuni 8 °C hoiukohast välja.
 - b. Jätke avamata pakend 10–15 minutiks toatemperatuurile, et vältida kondenseerumist läbivooluküveti eemaldamisel pakist. Läbivooluküveti ettevalmistamine tagab, et see saavutab toatemperatuuri õigel ajal.
2. Kui kasutada külmikus sulatamise meetodit, tehke järgmist.

- Võtke kassett temperatuuriga 2 °C kuni 8 °C hoiukohast välja.
- Hoidke avamata kassetti toatemperatuuril vähemalt 15 minutit enne sekveneerimist. Ärge ületage 1 tundi.

Teekide lahjendamine

Kui kasutada süsteemis denatureerimist ja lahjendamist, siis lahjendab see samm teegid sobivale laadimiskontsentratsioonile. Valikuline 2% PhiX-¹ lisand pakub lisamõõdikuid, aluste mitmekesisust või positiivset kontrolli. Phix-i lisandi protsent peaks olema suurem teekide jaoks, millel on väiksem aluste mitmekesisus.

Kui denatureerite ja lahjendate teeke käsitsi, kasutage *NextSeq 1000 ja 2000 denatureerimise ja lahjendamise juhendit (dokument nr 1000000139235)* See samm kehtib ainult süsteemis toimuva denatureerimise ja lahjendamise puhul.

Teegi lahjendamine 2 nM-ni

- [Valikuline] Eemaldage 10nM PhiX-i varud temperatuuriga –25 °C kuni –15 °C hoiukohast. PhiX-i on vaja ainult valikulise lisamise või ainult PhiX-iga kaitse jaoks.
- [Valikuline] Sulatage Phix-i toatemperatuuril 5 minutit ja seejärel kvantifitseerige, kasutades fluorestsentsipõhist meetodit nagu Qubit, et kinnitada Phix-i kontsentratsioon. Kui kvantifitseerimine ei ole võimalik, jätkake 10 nM kontsentratsiooniga.
- Segage teeke või PhiX-i lühidalt vortekssegistil ja seejärel tsentrifugeerige 280 × g juures 1 minuti jooksul.
- Kasutades RSB-d koos Tween 20-ga lahjendajana, valmistage vähemalt 24 µl 2 nM teeki vähese siduvusega mikrokatsutis. PhiX-i lisandi juhendi leiate teemast [PhiX-i kontrolli lisamine \(valikuline\) leheküljel 42](#).
- Segage lühidalt vortekssegistil ja seejärel tsentrifugeerige 280 × g juures 1 minuti jooksul.

2 nM teegi lahjendamine laadimiskontsentratsioonini

- Ühendage järgmised mahud vähesiduvast mikrokatsutis, et valmistada 24 µl teegivedelikku, mis on lahjendatud sobivale laadimiskontsentratsioonile.

Teegi tüüp*	Laadimiskontsentratsioon (pM)	2 nM teegi maht (µl)	RSB koos Tween 20 mahuga (µl)
AmpliSeq Illumina Library PLUS-i jaoks	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15

¹PhiX on väike kasutusvalmis Illumina teek, mille nukleotiidikoostis on tasakaalustatud.

Teegi tüüp*	Laadimiskontsentratsioon (pM)	2 nM teegi maht (µl)	RSB koos Tween 20 mahuga (µl)
Illumina DNA Prep rikastamisega	1000	12	12
Illumina Stranded Total RNA koos Ribo-Zero Plusiga	750	9	15
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA PCR-vaba	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

* Loetlemata teegitüüpide puhul on algne laadimiskontsentratsioon 650 pM, mis optimeeritakse järgmiste käituste jooksul.

Selles tabelis on esitatud laadimiskontsentratsioonide näited. Süsteem NextSeq 1000/2000 sobib kõigi Illumina teekide ettevalmistuskomplektidega, kuid optimaalne laadimiskontsentratsioon võib erineda.

2. Segage lühidalt vortekssegistil ja seejärel tsentrifugeerige 280 × g juures 1 minuti jooksul.
3. Asetage lahjendatud teek jäässe sekveneerimist ootama.
Sekveneerige laadimiskontsentratsioonile lahjendatud teek lahjendamisega samal päeval.
4. Jätkamiseks tehke järgmist.
 - Kui lisate PhiX-i, vt teavet jaotisest [PhiX-i kontrolli lisamine \(valikuline\) leheküljel 42](#).
 - Kui te ei lisa PhiX-i või teete ainult PhiX-iga käitust, vaadake teavet jaotisest [Kulutarvikute kasseti laadimine leheküljel 43](#).

PhiX-i kontrolli lisamine (valikuline)

1. Segage väheses mahus mikrokatsutis kokku järgmised mahud, et valmistada 20 µl 1 nM PhiX-i.
 - 10 nM PhiX (2 µl)
 - RSB koos Tween 20-ga (18 µl)
2. Segage lühidalt vortekssegistil ja seejärel tsentrifugeerige 280 × g juures 1 minuti jooksul.
3. Lisage 1 µl 1 nM PhiX-i 24 µl lõplikule laadimiskontsentratsioonile lahjendatud teegile.
Nende mahtude tulemuseks on umbes 2% PhiX-i lisand. Tegelik protsent varieerub olenevalt teegi kvaliteedist ja kogusest.

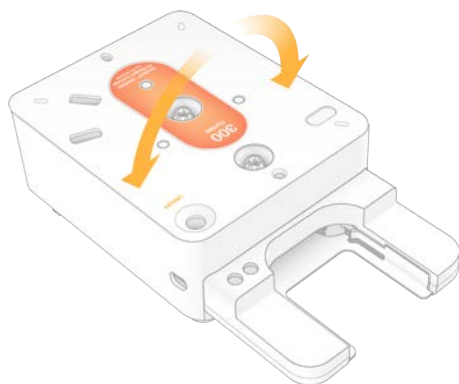
4. Asetage teek koos PhiX-i lisandiga jäässe sekveneerimist ootama.
Sekveneerige teegid PhiX-i lisandiga samal päeval, kui neid lahjendatakse.

Kulutarvikute kasseti laadimine

See etapp valmistab kasseti sekveneerimiseks ette, segades eeltäidetud reaktiivid ja laadides lahjendatud teegid ning läbivooluküveti.

Kasseti ettevalmistamine

1. Avage kasseti kott, rebides või lõigates kääridega kummalgi küljel ülemist saki.
2. Eemaldage kassett kotist. Eemaldage kott ja kuivatusaine.
3. Pöörake kassetti reaktiivide segamiseks kümme korda ümber.
Sisemised komponendid võivad pööramise ajal klõbiseda, mis on tavapärane.



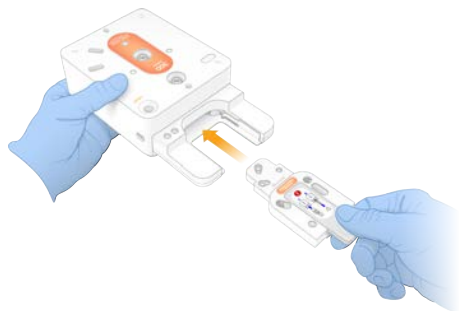
Läbivooluküveti laadimine

1. Avage hõbefooliumist pakend, rebides või lõigates kääridega kummalgi küljel ülemist saki.
Kui teil ei ole võimalik läbivooluküveti kohe kasutada, vt [Kulutarvikute tagastamine hoiukohta leheküljel 79](#).
2. Tõmmake läbivooluküvett pakendist välja.
Pange fooliumpakend ja kuivatusaine kõrvale juhuks, kui peate läbivooluküveti tagasi hoiuruumi panema. Kuivatusaine sisaldub fooliumpakendi põhjas väikeses kotis. Visake need ära sekveneerimise algamisel.

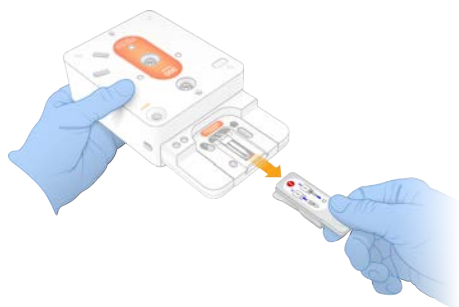


3. Hoidke läbivooluküveti hallist sakist, nõnda et sakil oleva silt on suunatud üles.

4. Sisestage läbivooluküvett, surudes selle kasseti esiküljel olevasse pilusse. Läbivooluküvett liigub kuuldava klõpsuga paika. Kui see on õigesti laaditud, ulatub hall sakk kassetist välja



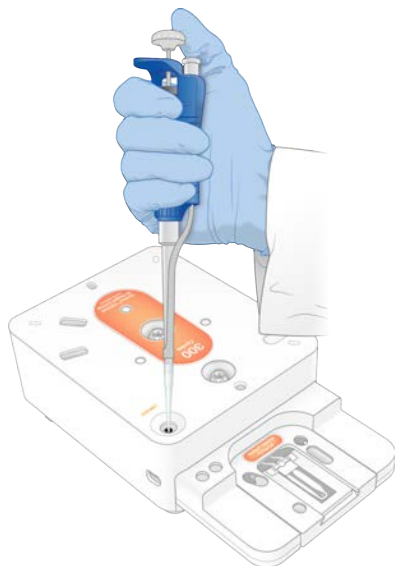
5. Läbivooluküveti paljastamiseks tõmmake hall sakk tagasi ja eemaldage see. Võtke sakk korduskasutusse.



Teekide laadimine

1. Lâbistage teegimahuti uue P1000 pipeti otsakuga ja suruge foolium servadele, et ava suurendada.
2. Saastumise vältimiseks visake pipeti otsak ära.

3. Lisage 20 µl lahjendatud teeki mahuti *põhja*, langetades pipeti otsaku aeglaselt mahuti põhja enne jaotamist. Vältige fooliumi puudutamist.



Sekvenerimiskäituse alustamine


See samm käivitab sekvenerimiskäituse ühes neljast režiimist.

- **Pilverežiim** – käitus on valitud NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara planeeritud käituste loendist. Sekvenerimise ajal laaditakse cBCL andmed cBCL üles platvormile BaseSpace Sequence Hub. Pärast sekvenerimist käivitub DRAGEN platvormil BaseSpace Sequence Hub automaatselt.
- **Hübriidrežiim** – käitus on valitud NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara planeeritud käituste loendist. Pärast sekvenerimist käivitub seadmes olev analüüs automaatselt. cBCL andmed ja DRAGEN-i sekundaarse analüüsi väljundfailid talletatakse valitud väljundkaustas.
- **Kohalik režiim** – v2-failivormingus proovileht imporditakse käsitsi NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvarasse. Pärast sekvenerimist käivitub seadmes olev analüüs automaatselt. cBCL andmed ja DRAGEN-i sekundaarse analüüsi väljundfailid talletatakse valitud väljundkaustas. Kui proaktiivne tugi, käituse jälgimine ja andmesalvestus on valitud, saab analüüsi algatada ka rakenduse BaseSpace Sequence Hub kaudu pärast sekvenerimise lõppu.
- **Eraldiseisev režiim** – häälestage käitamine, järgides NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvaras juhiseid cBCL andmete loomiseks.

⚠ | Visiiri avamine käituseelse kontrolli või käituse ajal võib põhjustada käituse nurjumise.

⚠ | Vigastuse vältimiseks hoidke käed visiiri avamise ja sulgemise ajal seadmest eemal.

Pilve- või hübriidrežiimi käivitamine


1. Konfigureerige käitusrežiim, nagu on kirjeldatud jaotises [Käitusrežiimi konfigureerimine leheküljel 18](#).
 2. Valige suvand **Start** (Käivita).
 3. Sisestage oma teenuse BaseSpace Sequence Hub sisselogimisandmed ja valige seejärel **Sign In** (Logi sisse).
 4. Kui valisite proaktiivse toe, käituse jälgimise ja andmesalvestuse, valige töörühm, mis sisaldab käitust, mille platvormi BaseSpace Sequence Hub seadme käituse häälestamisel lõite.
-  Töögrupi valimine on vajalik, et vältida vigu. Veenduge, et oleksite valinud töörühma enne kui jätkate.
5. Valige **Next** (Edasi).
 6. Valige oma käitus.
 7. Kontrollige, et analüüsi, käituse pikkuse ja sekundaarse analüüsi versioon ühtiksid õige käitusega. Analüüs kuvab atribuudi Cloud_ näitamaks, et analüüsimine toimub platvormil BaseSpace Sequence Hub.
 8. Valige suvand **Review** (Läbivaatus).
 9. **[Valikuline]** Sisestage kohandatud lugemi praimerid ja kohandatud indeksi praimerid asukohad. Teavet kohandatud praimerite ettevalmistamise ja lisamise kohta vaadake *NextSeq 1000 ja 2000 kohandatud praimerite juhendist (dokument nr 1000000139569)*. Külastage kindlasti oma teegi ettevalmistuskomplekti ühilduvate toodete lehte, et kontrollida, kas Illumina kohandatud praimerid on vajalikud.
 10. **[Valikuline]** Valige kohandatud moodus. Lisateavet vt [Tumeda tsükli sekveneerimine leheküljel 98](#). Kui kasutate NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara versiooni 1.3 ja Illumina Stranded Total RNA ettevalmistust koos Ribo-Zero Plus komplektiga või Illumina Stranded mRNA ettevalmistuskomplektiga, valitakse kohandatud moodus automaatselt.
 11. **[Valikuline]** Teekide käsitsi denatureerimise ja lahjendamise jaoks tühjendage valik märkeruudus **Denature and Dilute On Board** (Kohapealne denatureerimine ja lahjendamine). Vaadake *NextSeq 1000 ja 2000 denatureerimise ja lahjendamise juhendit (dokument nr 1000000139235)*. Vaikimisi valik on konfigureeritud NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara sätetes.
 12. **[Valikuline]** Väljundkausta muutmiseks valige väli Output Folder (Väljundkaust) ja sisestage uus asukoht.
Väli Output Folder (Väljundkaust) täidetakse automaatselt teie vaikesätete põhjal ja on vajalik, v.a juhul kui valitud on **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktiivne tugi, käituse jälgimine ja andmesalvestus).
Kui valisite proaktiivse toe, käituse jälgimise ja andmesalvestuse, kuvatakse valik Save to BaseSpace Sequence Hub (Salvesta BaseSpace Sequence Hubi) lubatuna.

Kui valisite proaktiivse toe ja käituse jälgimise, kuvatakse valik Save to BaseSpace Sequence Hub (Salvesta BaseSpace Sequence Hubi) keelatud.

13. Vaadake oma käituse teave üle ja seejärel valige **Prep** (Ettevalmistus).

Kohaliku käituse alustamine


1. Konfigureerige käitusrežiim, nagu on kirjeldatud jaotises [Käitusrežiimi konfigureerimine leheküljel 18](#).
2. Valige suvand **Start** (Käivita).
3. Kui valisite proaktiivse toe, käituse jälgimise ja andmesalvestuse või proaktiivse toe ja käituse jälgimise, sisestage oma BaseSpace Sequence Hubi sisselogimisteave ja seejärel valige **Sign In** (Logi sisse).
4. Kui valisite proaktiivse toe, käituse jälgimise ja andmesalvestuse, valige BaseSpace Sequence Hubi töörühm, et salvestada oma käitus, ja seejärel valige **Next** (Järgmine).

 Töögrupi valimine on vajalik, et vältida vigu. Veenduge, et oleksite valinud töörühma enne kui jätkate.

5. Valige jaotises Start With Sample Sheet (Proovilehega alustamine) suvand **Choose...** (Vali...) ja liikuge NextSeq 1000/2000 seadmes, teisaldataval kettal või kinnitatud võrgukettal v2-vormingus proovilehele. Proovilehe failinimed ei tohi sisaldada eritärke.

NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara v1.3 tuvastab DRAGEN-i versiooni proovilehelt automaatselt ja palub vajaduse korral versioone vahetada. DRAGEN-i versioon peab olema süsteemi installitud. Installimise teavet vt [Tarkvaravärskendused leheküljel 72](#).

- **Kasutatakse seadme käitamise häälestust** – valige proovilehe v2 sisaldav ZIP-kaust ja vajaduse korral toetavad failid. Muudel juhtudel valige proovilehe v2.
- **Seadme käitamise häälestust ei kasutata** – veenduge, et sekundaarset analüüsi toetav fail asuks proovilehe v2-ga samas kataloogis.

 Valitud proovileht peab olema v2-vormingus. Proovilehe v2 loomiseks laadige BaseSpace Sequence Hubi seadme käituse häälestusest alla loodud näidisfail või muutke proovilehe v2 malli, mis asub NextSeq 1000/2000 tugiteenuste lehel. Lisateavet näidisfaili v2 vormindamise ja nõuete kohta vt [Proovilehe v2 sätted leheküljel 84](#). Veenduge, et kõik proovilehel viidatud failid asuksid proovilehega samas kaustas.

6. Valige suvand **Review** (Läbivaatus).
7. **[Valikuline]** Sisestage kohandatud lugemi praimerid ja kohandatud indeksi praimerid asukohad. Teavet kohandatud praimerite ettevalmistamise ja lisamise kohta vaadake *NextSeq 1000 ja 2000 kohandatud praimerite juhendist (dokument nr 1000000139569)*. Külastage kindlasti oma teegi ettevalmistuskomplekti ühilduvate toodete lehte, et kontrollida, kas Illumina kohandatud praimerid on vajalikud.
8. **[Valikuline]** Valige kohandatud moodus. Lisateavet vt [Tumeda tsükli sekveneerimine leheküljel 98](#).

Kui kasutate NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara versiooni 1.3 ja Illumina Stranded Total RNA ettevalmistust koos Ribo-Zero Plus komplektiga või Illumina Stranded mRNA ettevalmistuskomplektiga, valitakse kohandatud moodus automaatselt.

9. **[Valikuline]** Teekide käsitsi denatureerimise ja lahjendamise jaoks tühjendage valik märkeruudus **Denature and Dilute On Board** (Kohapealne denatureerimine ja lahjendamine). Vaadake *NextSeq 1000 ja 2000 denatureerimise ja lahjendamise juhendit (dokument nr 1000000139235)* Vaikimisi valik on konfigureeritud NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara sätetes.
10. **[Valikuline]** Väljundkausta muutmiseks valige väli Output Folder (Väljundkaust) ja sisestage uus asukoht.
Väli Output Folder (Väljundkaust) täidetakse automaatselt teie vaikesätete põhjal ja on vajalik, v.a juhul kui valitud on Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiivne tugi, käituse jälgimine ja andmesalvestus).
Kui valisite proaktiivse toe, käituse jälgimise ja andmesalvestuse, kuvatakse valik Save to BaseSpace Sequence Hub (Salvesta BaseSpace Sequence Hubi) lubatuna.
Kui valisite proaktiivse toe ja käituse jälgimise, kuvatakse valik Save to BaseSpace Sequence Hub (Salvesta BaseSpace Sequence Hubi) keelatud.
11. Vaadake oma käituse teave üle ja seejärel valige **Prep** (Ettevalmistus).

Eraldiseisva käituse käivitamine

1. Konfigureerige käitusrežiim, nagu on kirjeldatud jaotises [Käitusrežiimi konfigureerimine leheküljel 18](#).
2. Valige suvand **Start** (Käivita).
3. Kui valisite proaktiivse toe, käituse jälgimise ja andmesalvestuse või proaktiivse toe ja käituse jälgimise, sisestage oma BaseSpace Sequence Hubi sisselogimisteave ja seejärel valige **Sign In** (Logi sisse).
4. Kui valisite proaktiivse toe, käituse jälgimise ja andmesalvestuse, valige BaseSpace Sequence Hubi tööruhm, et salvestada oma käitus, ja seejärel valige **Next** (Järgmine).
5. Valige **Set Up New Run** (Uue käituse häälestamine).
6. Sisestage väljale Run Name (Käituse nimi) soovitud kordumatu nimi praeguse käituse identifitseerimiseks.
Käituse nimi võib sisaldada tähtnumbrilisi märke, mõttekriipse, sidekriipse ja allkriipse.
7. Parameetri Read Type (Lugemitüüp) jaoks valige, mitu sekveneermislugemit teha.
 - **Single Read** (Üksiklugemine) – tehakse üks lugemine, mis on lihtsam ja kiirem valik.
 - **Paired End** (Paaristulemus) – tehakse kaks lugemist, mille konsensus annab kvaliteetsemad andmed ja täpsema joonduse.
8. Sisestage igal lugemisel tehtavate tsüklite arv.
Indeksi tsüklite maksimaalset arvu pole, kuid lugemistsüklite ja indeksi tsüklite summa peab olema väiksem kui tsüklite arv, mis on näitatud kasseti sildil, pluss 27.

Read 1 (1. lugemine) – sisestage **1–151** tsükli.

Index 1 (1. indeks) – sisestage 1. indeksi (i7) praimeri tsükli arv. Ainult PhiX-iga käituse puhul sisestage mõlemale indeksiväljale **0**.

Index 2 (2. indeks) – sisestage tsükli arv 2. indeksi (i5) praimerile.

Read 2 (2. lugemine) – sisestage kuni **151** tsükli. See väärtus on tavaliselt sama, mis 1. lugemise väärtus.

9. Kui valisite proaktiivse toe, käituse jälgimise ja talletamise, valige suvand **Choose...** (Valimine...), et importida proovileht.

NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara v1.3 tuvastab DRAGEN-i versiooni proovilehelt automaatselt ja palub vajaduse korral versioone vahetada. DRAGEN-i versioon peab olema süsteemi installitud. Installimise teavet vt [Tarkvaravärskendused leheküljel 72](#).

i Valitud proovileht peab olema v2-vormingus. Proovilehe v2 loomiseks laadige BaseSpace Sequence Hubi seadme käituse häälestusest alla loodud näidisfail või muutke proovilehe v2 malli, mis asub NextSeq 1000/2000 tugiteenuste lehel. Lisateavet näidisfaili v2 vormindamise ja nõuete kohta vt [Proovilehe v2 sätted leheküljel 84](#). Veenduge, et kõik proovilehel viidatud failid asuksid proovilehega samas kaustas.

10. **[Valikuline]** Sisestage kohandatud lugemi praimeri ja kohandatud indeksi praimeri asukohad. Teavet kohandatud praimerite ettevalmistamise ja lisamise kohta vaadake *NextSeq 1000 ja 2000 kohandatud praimerite juhendist (dokument nr 1000000139569)*. Küllastage kindlasti oma teegi ettevalmistuskomplekti ühilduvate toodete lehte, et kontrollida, kas Illumina kohandatud praimerid on vajalikud.
11. **[Valikuline]** Valige kohandatud moodus. Lisateavet vt [Tumeda tsükli sekveneerimine leheküljel 98](#)
12. **[Valikuline]** Teekide käsitsi denatureerimise ja lahjendamise jaoks tühjendage valik märkeruudus **Denature and Dilute On Board** (Kohapealne denatureerimine ja lahjendamine). Vaadake *NextSeq 1000 ja 2000 denatureerimise ja lahjendamise juhendit (dokument nr 1000000139235)* Vaikimisi valik on konfigureeritud NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara sätetes.
13. **[Valikuline]** Väljundkausta muutmiseks valige väli Output Folder (Väljundkaust) ja sisestage uus asukoht. Väli Output Folder (Väljundkaust) täidetakse automaatselt teie vaikesätete põhjal ja on vajalik, v.a juhul kui valitud on Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiivne tugi, käituse jälgimine ja andmesalvestus).
14. Valige **Prep** (Ettevalmistus).

Kulutarvikute seadmesse laadimine

1. Veenduge, et kassett oleks eelnevalt sulatatud ja segamiseks 10 korda ümber pööratud, enne kui laadite läbivooluküveti (hall sakk eemaldatud) ja lahjendatud teegi.
2. Valige käsk **Load** (Laadi).

NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara avab visiiri ja eemaldab aluse.

3. Asetage kassett alusele sildiga üles ja läbivooluküvetiga seadme sees. Lükake kassett sisse, kuni see lukustub paigale.



4. Valige käsk **Close** (Sulge), et kassett sisse lükata ja visiir sulgeda.
NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara kuvab teabe skannitud kulutarvikutelt ~3 minuti pärast.
5. [Valikuline] Kasseti eemaldamiseks valige **Eject Cartridge** (Väljuta kassett).
Visiir avaneb 1 minuti möödudes ja väljutab kasseti.
6. Valige **Sequence** (Sekveneeri).

Käituseelsed kontrollid

Käituseelsed kontrollid hõlmavad seadme kontrolli, millele järgneb vedeliku kontrollimine. Vedeliku kontrollimisel läbistatakse kasseti ümbrised, mis põhjustab seadmest 3–4 plaksuva heli kostumist. See on ootuspärane. Reaktiivi liigutatakse nüüd läbi läbivooluküveti.

! Kulutarvikuid ei saa pärast vedeliku kontrollimise algamist uuesti kasutada.

1. Oodake umbes 15 minutit, kuni käituseelsed kontrollid on lõppenud.
Käitus algab automaatselt pärast edukat lõpetamist.
2. Kui seadme kontrollimise ajal ilmneb viga, valige käsk **Retry** (Proovi uuesti), et kontrolli korrata.
Kui kontroll on pooleli, on sellele kontrollile vastav ring liikumises.
3. Korduvate vigade tõrkeotsinguks vt [Veateate lahendamine leheküljel 78](#).

Käituse edenemise jälgimine

1. Saate jälgida käituse edenemist ja mõõdikuid nende ilmumisel kuvale Sequencing (Sekveneerimine).
 - **Estimated run completion** (Käituse hinnanguline lõpp) – käituse ligikaudne lõppkuupäev ja -kellaaeg. Käituse täpse lõpetamisaja arvutamiseks vajab hinnangulise käituse lõpetamise mõõdik 10 eelnevat käitust.

- **Average %Q30** (Keskmise Q-skoor ≥ 30) – aluste nimetamise keskmine protsent Q-skooriga ≥ 30 .
- **Projected Yield** (Proгноositav saagis) – käituse jaoks nimetatud aluste eeldatav arv.
- **Total Reads PF** (PF-lugemite koguarv) – filtreerimist l ibivate klastrite (miljonites) paarisotstega tulemuste arv (kui kohaldatav).
- **Real Time Demux** (Reaalajas demultipleksimine) – demultipleksimise olek, kui see käivitatakse 2. lugemise alguses pärast 1. lugemise, 1. indeksi ja 2. indeksi tsüklite lõppu. Olekuks kuvatakse Complete (Lõpetatud) isegi kui indeksite tsükleid pole tehtud. Pole pilvere iimi k itustes saadaval.
- **Real Time Alignment** (Reaalajas joondamine) – 1. lugemise joondamise olek, kui see käivitatakse 2. lugemise alguses pärast 1. lugemise, 1. indeksi ja 2. indeksi tsüklite lõppu. Pole pilvere iimi k itustes saadaval.

Q30 ja saagise m oodikud kuvatakse pärast 26. tsüklit (u 6 tundi pärast käituse algust).

2. K itustoimingute jälgimiseks valige juhtimistarkvara men u ja seej areel valige suvand **Process Management** (Toiminguhaldus).
3. Käituse tühistamiseks valige **End Run** (Lõpeta käitus). Käituste tühistamise kohta lisateabe vaatamiseks vt [Käituse tühistamine leheküljel 79](#) (Käituse tühistamine).
4. Laadige kulutarvikud seadmest välja. Eemaldage kassett seadmest 3 päeva jooksul.

Kulutarvikute mahalaadimine

1. Kui sekveneerimine on lõpetatud, valige käsk **Eject Cartridge** (Väljuta kassett). Tarkvara v aljutab kasutatud kasseti seadmest.
2. Eemaldage kassett aluselt.
3. Eemaldage l ibivoolurakk kassetist.
4. Kõrvaldage elektroonilisi komponente sisaldav l ibivoolurakk kasutuselt oma piirkonnas kehtivate eeskirjade järgi.
5. [Valikuline] Eemaldage  aravoolukork, mis asub kasseti küljel Illumina logo all, sobiva anuma (st kraanikausi või ohtlike vedelj aatmete anuma) kohal selliselt, et kork on suunatud horisontaalselt või allapoole, teie näost eemale. Valage kasutatud reaktiivid ära piirkonnas kehtivate standardite kohaselt. V aljavoolamise aeg oleneb kasseti suurusest, kui automaatne reaktiivi puhastamine pole lubatud.

! See reaktiivide komplekt sisaldab potentsiaalselt ohtlikke kemikaale. Sissehingamine, allaneelamine ning kokkupuude naha ja silmadega võivad tekitada kehavigastusi. Kandke isikukaitsevahendeid, sealhulgas kaitseprille, kindaid ja laborikitlit, mis on kokkupuuteohuks sobilikud. Käsitsege kasutatud reaktiive keemiliste jäätmetena ja kõrvaldage need kohalduvate piirkondlike, riiklike ning kohalike seaduste ja määruste alusel. Täiendavat keskkonna-, tervise- ja ohutusteavet vaadake ohutuskaardilt (SDS) veebilehel support.illumina.com/sds.html.

6. Visake reaktiivikassett ära.
Käitusjärgne pesu ei ole vajalik, kuna vedelikud visatakse ära koos kassetiga.
7. Valige käsk **Close Door** (Sule luuk), et alus uuesti laadida ja avakuvale naasta.
Tarkvara laadib aluse automaatselt uuesti ja andurid kinnitavad kasseti eemaldamist.

Kasseti aluse puhastamine

Kasseti aluse puhastamine on vajalik ainult siis, kui reaktiivi on lekkinud kasseti alusele.

1. Eemaldage kassett seadmest.
2. Pange kätte uus paar talgita kindaid ja mis tahes täiendav kaitseriietus.
3. Pihustage riidele 10%-list pleegituslahust.
4. Pühkige riidega kasseti alust ja seejärel eemaldage pleegituslahus kohe tugevatoimelist lappi kasutades.
Kui pleegitusainet kohe ei eemaldata, jätab see kasseti alusele plekid.
5. Pihustage kassetile 70%-list etanoolilahust ja eemaldage see koheselt, kasutades vastupidavat lappi.
6. Seadke kasseti alus tagasi laadimisasendisse.

Sekvenerimisväljund

See jaotis kirjeldab reaajas analüüsi tarkvara, mis teeb aluse nimetamist, määrab kvaliteediskoore ja väljutab andmeid. Lugege erinevate väljundfaili tüüpide ja selle kohta, kuhu need pärast käitust panna.

Reaajas analüüsi ülevaade

NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 sekvenerimissüsteemid käitavad RTA3, reaajas analüüsi tarkvara (RTA) teostust, seadme arvutusmootoris (Compute Engine, CE). RTA3 eraldab intensiivsused kaamerast saadud piltidelt, teostab aluste nimetamist, määrab aluse nimetustele kvaliteediskoori, joondab PhiX-ga ja edastab andmed InterOp-failidena seadme juhtimistarkvaras vaatamiseks.

Töötlusaja optimeerimiseks hoiustab RTA3 teavet mälus. Kui RTA3 lülitatakse välja, siis töötlus ei jätku ja kõik mälus töödeldavad käituse andmed lähevad kaduma.

RTA3 sisendid

RTA3 vajab töötlemiseks kohaliku süsteemi mälus töötlemise sisalduvaid paani kujutisi. RTA3 saab käituse teabe ja käsud juhtimistarkvaralt.

RTA3 väljundid

Iga värvikanali kujutised edastatakse mälus RTA3-le paanidena. Nende piltide põhjal väljastab RTA3 kvaliteediskooriga aluste nimetamise failide ja filtrifailide komplekti. Kõik teised väljundid toetavad väljundfaile.

Faili tüüp	Kirjeldus
Aluste nimetusfailid	Kõik paanid, mida analüüsitakse, lisatakse konkateneeritud aluste nimetamise faili (*.cbcl). Paanid samast reast ja pinnast kuhjatakse ühte *.cbcl faili iga rea ja pinna jaoks.
Filtrifailid	Iga paan koostab filtrifaili (*.filter), mis määratleb, kas klaster läbib filtrid.
Klastrite asukohafailid	Klastrite asukohafailid (*.locs) sisaldavad iga paani klastrite X- ja Y-koordinaate. Klastrite asukohafail luuakse iga käituse jaoks.

Väljundfaile kasutatakse allavoolu analüüside jaoks DRAGEN-is ja BaseSpace Sequence Hubis.

Vigade lahendamine

RTA3 loob logifailid ja kirjutab need kausta Logs. Vead salvestatakse *.log-failivormingus tekstifailina.

Töötlemise lõpus edastatakse lõplikku väljundsihtkohta järgmised logifailid.

info_00000.log võtab kokku tähtsad käituse sündmused.

error_00000.log sisaldab käituse ajal ilmnenu vigu.

warning_00000.log sisaldab käituse ajal ilmnenu hoiatusi.

Läbivooluküveti paanid

Paanid on väikesed kujutise alad läbivooluküvetil. Kaamera teeb ühe pildi paani kohta.

NextSeq 1000/2000 P2 läbivooluküvetil on kokku 132 paani. NextSeq 1000/2000 P3 läbivooluküvetil on kokku 264 paani.

Tabel 5. Läbivooluküveti paanid

Läbivooluküveti komponendid	NextSeq 1000/2000 P2 läbivooluküvett	NextSeq 1000/2000 P3 läbivooluküvett	Kirjeldus
Rajad	1	2	Rajad on optiliselt erinevad, kuid mitte voolusüsteemis eraldi kanalid.
Pinnad	2	2	P2 ja P3 läbivooluküvetid on hõivatud kahel pinnal: üleval ja all. Paani ülemine pind hõivatakse esimesena.
Vaalusid raja kohta	6	6	Vaal on veerg läbivooluküveti rajas.
Paane vaalu kohta	11	11	Paan on osa vaalust ja kujutab läbivooluküveti hõivatavat piirkonda.
Loodud paanide hulk kokku	132	264	Paanide koguarv võrdub rajad × pinnad × vaalud × paanid vaalu kohta.

Paani nimetamine

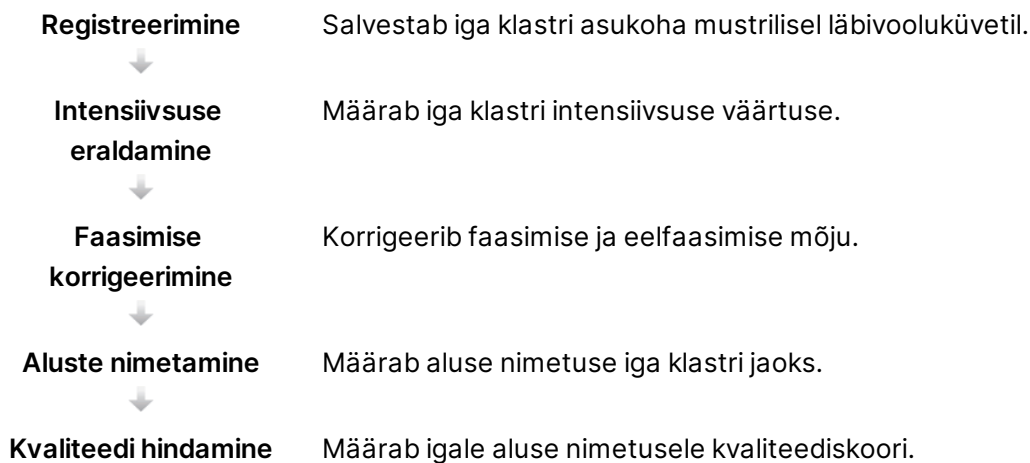
Paani nimi on neljakohaline number, mis esindab paani asukohta läbivooluküvetil. Näiteks viitab paani nimi 1205 ülemisele pinnale, vaalule 2, paanile 05.

Esimene number näitab pinda: 1 ülemise jaoks ja 2 alumise jaoks.

Teine number näitab vaalu numbrit: 1, 2, 3, 4, 5 või 6.

Kaks viimast numbrit näitavad paani numbrit. Vaalu numbrit 1–4 jaoks algab nummerdamine 01-ga läbivooluküveti väljundi otsa juures kuni 11-ni sisselaske otsas. Vaalu numbrit 5–6 jaoks algab nummerdamine 01-ga sisendi otsa juures kuni 11-ni väljundi otsas.

Reaalajas analüüsi töövoog



Registreerimine

Registreerimine joondab kujutise nanosüvendite pööratud ruutmassiiviga muustrilisel läbivooluküvetil. Nanosüvendite järjestatud paigutuse tõttu on iga klasteri X- ja Y-koordinaadid ettemääratud. Klasterite asendid on kirjutatud iga käituse klasteri asukoha (s.locs) faili.

Kui tsükli mõne pildi registreerimine nurjub, siis selle tsükli paani aluse nimetusi ei looda. Kasutage sekvenerimisanalüüsi vaaturit, ei tuvastada, milliste piltide registreerimine nurjus.

Intensiivsuse eraldamine

Pärast registreerimist arvutab intensiivsuse eraldamine iga nanosüvendi intensiivsuse väärtuse antud pildil. Kui registreerimine nurjus, ei ole võimalik selle paani intensiivsust eraldada.

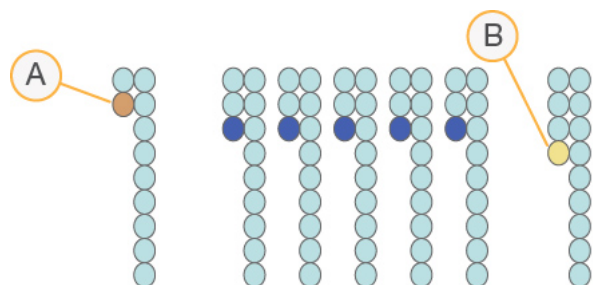
Faasimise korrigeerimine

Sekvenerimisreaktsiooni ajal pikeneb iga DNA ahel klasteris ühe aluse võrra tsükli kohta. Faasimine ja eelfaasimine toimub, kui ahel muutub praeguse kaasamistsükliga faasist väljas olevaks.

Faasimine toimub, kui alus jääb maha.

Eelfaasimine toimub, kui alus hüppab edasi.

Joonis 5. Faasimine ja eelfaasimine



- A. Lugem alusega, mis on faasimises
- B. Lugem alusega, mis on eelfaasimises.

RTA3 korrigeerib faasimise ja eelfaasimise mõju, mis maksimeerib andmete kvaliteeti igas tsükli kogu käituse vältel.

Aluste nimetamine

Aluste nimetamine määrab aluse (A, C, G või T) antud paani iga klastriga jaoks kindlas tsükli. Sekvenerimissüsteemid NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 kasutavad kahekanalilist sekvenerimist, mis nõuab nelja DNA-aluse andmete kodeerimiseks ainult kahte kujutist, üks rohelisest ja teine sinisest kanalist.

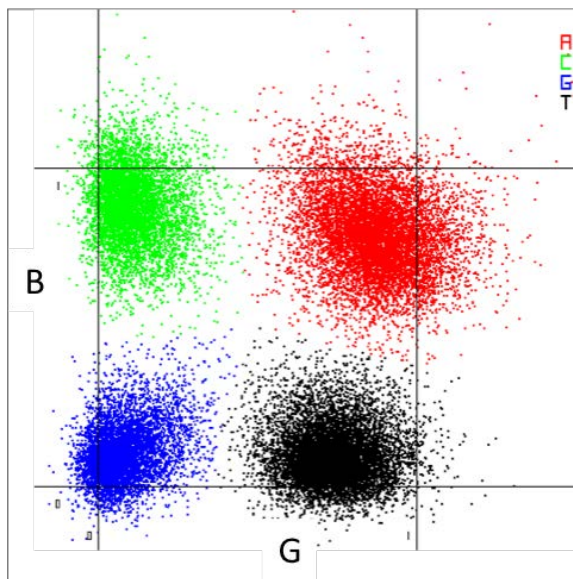
Nimetuse puudumine tuvastatakse kui N. Nimetuse puudumised leiavad aset, kui klaster ei läbi filtrit, registreerimine nurjub või klaster nihkub kujutiselt välja.

Iga klastriga intensiivsused eraldatakse roheliselt ja siniselt kujutiselt ning võrreldakse omavahel, mille tulemuseks on neli erinevat populatsiooni. Iga populatsioon vastab alusele. Aluste nimetamise protsess määrab, millisesse populatsiooni iga klaster kuulub.

Tabel 6. Aluste nimetused kahekanalilises sekvenerimises

Alus	Roheline kanal	Sinine kanal	Tulemus
A	1 (esineb)	1 (esineb)	Klastrid, mis näitavad intensiivsust nii rohelises kui ka sinises kanal.
C	0 (ei esine)	1 (esineb)	Klastrid, mis näitavad intensiivsust ainult sinises kanal.
G	0 (ei esine)	0 (ei esine)	Klastrid, mis näitavad intensiivsuse puudumist teadolevas klastriga asukohas.
T	1 (esineb)	0 (ei esine)	Klastrid, mis näitavad intensiivsust ainult rohelises kanal.

Joonis 6. Klasteri intensiivsuse visualiseerimine



i | Iga klasteri värv korreleerub sekveneerimisanalüüsi vaaturis (SAV) aluste % graafikutega ja BaseSpace Sequence Hubi käituse andmetega tsükli järgi ning ei ole mõeldud korreleeruma roheline ega sinise kanaliga.

Klastrite läbipääsufilter

Käituse ajal filtreerib RTA3 toorandmeid, et eemaldada lugemid, mis ei vasta andmete kvaliteedikünnisele. Kattuvad ja madala kvaliteediga klastrid eemaldatakse.

Kahekanaliliste analüüside jaoks kasutab RTA3 aluse nimetuse puhtuse määramiseks (intensiivsuse puhtuse mõõtmiseks) populatsioonipõhist süsteemi. Klastrid läbivad filtri (PF), kui 25 esimeses tsükliis pole rohkem kui ühel aluse nimetusel puhtusetase alla fikseeritud künnise. Kui see on hõlmatud, toimub PhiX-i joondamine 26. tsükli ajal filtri läbinud klastrite paanide alamkogumil. Klastrid, mis filtrit ei läbi, ei ole aluse nimetusega ja neid ei joondata.

Kvaliteediskoorid

Kvaliteediskoor (Q-skoor) on ebaõige aluse nimetamise tõenäosuse prognoos. Kõrgem Q-skoor näitab, et aluse nimetus on kõrgema kvaliteediga ja tõenäolisemalt õige. Kui Q-skoor on määratud, salvestatakse tulemused aluste nimetamise (*.cbcl) failidesse.

Q-skoor on kompaktne viis väikeste vea tõenäosuste edastamiseks. Kvaliteediskoor on esitatud kujul Q (X), kus X on skoor. Järgmises tabelis on toodud kvaliteediskoori ja vea tõenäosuse seos.

Q-skoor Q (X)	Tõrke tõenäosus
Q 40	0,0001 (1/10 000)
Q 30	0,001 (1/1000)
Q 20	0,01 (1/100)
Q 10	0,1 (1/10)

Kvaliteedi hindamine ja aruandlus

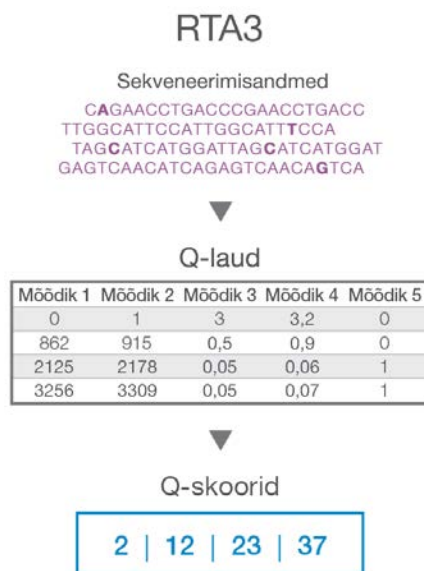
Kvaliteedi hindamine arvutab iga aluse nimetamise jaoks prognoosijate komplekti ja seejärel kasutab prognoosijate väärtusi kvaliteeditabelist Q-skoori otsimiseks. Kvaliteeditabelid on loodud sekveneerimisplatvormi ja kasutatava keemilise meetodi kindla konfiguratsiooniga loodud käituste puhul optimaalselt täpsete kvaliteediprognoside pakkumiseks.



Kvaliteedi hindamine põhineb Phred-algoritmi modifitseeritud versioonil.

Q-tabeli genereerimiseks sekveneerimissüsteemides NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 määrati kolm gruppi aluse nimetusi, mis põhinevad nende spetsiifiliste prognoosivate funktsioonide klastritel. Pärast aluse nimetuste rühmitamist arvutati empiirilisel keskmise vigade määr iga kolme grupi jaoks ja vastavad Q-skoorid salvestati Q-tabelisse koos ennustavate funktsioonidega korreleeruvalt selle grupiga. Sellisena on RTA3-ga võimalikud ainult kolm Q-skoori ja need Q-skoorid esindavad selle grupi keskmist vigade määra. ([Lihtsustatud Q-skoori määramine koos RTA3-ga leheküljel 59](#)). Üldiselt on selle tulemuseks lihtsustatud, kuid väga täpne kvaliteedi hindamine. Need kolm gruppi kvaliteeditabelis vastavad marginaalsele (< Q15), keskmisele (u Q20) ja kõrge kvaliteedoga (> Q30) aluste nimetustele ning neile on määratud spetsiifilised skoorid, vastavalt 12, 23 ja 37. Lisaks sellele määratakse puuduva nimetuse korral null-skoor 2. See Q-skoori aruandluse mudel vähendab salvestusruumi ja ribalaiuse nõudeid ilma täpsust või jõudlust mõjutamata.

Joonis 7. Lihtsustatud Q-skoori määramine koos RTA3-ga



Sekvenerimise väljundfailid

Faili tüüp	Faili kirjeldus, asukoht ja nimi
Konkateneeritud aluste nimetamise failid	Iga analüüsitud klaster sisaldub konkateneeritud aluste nimetamise failis, mis on koondatud ühte faili iga tsükli, raja ja pinna kohta. Koondfail sisaldab konkateneeritud aluste nimetamist ja kodeeritud kvaliteediskoori iga klasteri kohta. Konkateneeritud aluste nimetamise faile kasutavad BaseSpace Sequence Hub või bcl2fastq2. Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, näiteks L001_1.cbcl
Klastrite asukohafailid	Iga läbivooluküveti jaoks sisaldab binaarne klasteri asukohafail XY-koordinaate paanis olevate klastrite kohta. Kuusnurkne paigutus, mis ühtib läbivooluküveti nanosüvendite paigutusega, eelmääratleb koordinaadid. Andmed/intensiivsused s_[lane].locs
Filtrifailid	Filtrifail määratleb, kas klaster läbis filtrid. Filtrifailid luuakse 26. tsüklis 25 tsükli andmete põhjal. Iga paani jaoks luuakse üks filtrifail. Data/Intensities/BaseCalls/L001 s_[lane]_[tile].filter
InterOp-failid	Binaarseid aruandlusfaile saab vaadata seadme juhtimistarkvaraga seadmes või SAV-is või BaseSpace Sequence Hubis seadmest eemal. InterOp-faile värskendatakse kogu kaituse jooksul. Kaust InterOp

Faili tüüp	Faili kirjeldus, asukoht ja nimi
Käituse teabefail	Sisaldab käituse nime, tsükli arvu igas lugemis, kas lugemine on indekseeritud lugemine, ning läbivooluküveti vaalude ja paanide arvu. Käituse teabefail luuakse käituse alguses. [Root folder], RunInfo.xml

DRAGEN-i sekundaarse analüüsi väljundfailid

DRAGEN-i Bio-IT Platvorm analüüsib teie sekveneerimise väljundit seadmel edasi, kasutades üht järgmistest analüüsikonveieritest.

- BCL-i konverter
- Idutee
- RNA
- Rikastamine
- Üksikraku RNA
- DNA amplikon

See jaotis sisaldab infot iga DRAGEN-i konveieri kohta, sh väljundfaili informatsiooni. Peale failide loomise spetsiifiliselt iga konveieri jaoks pakub DRAGEN analüüsi mõõdikuid failis `<sample_name>.metrics.json` ja aruandeid, mida kirjeldatakse jaotises [DRAGEN-i BCL-konvertimise konveier leheküljel 65](#). Lisateabe saamiseks rakenduse DRAGEN kohta lugege [DRAGEN Bio-IT platvormi toelehte](#).

Kõik DRAGEN-i konveierid toetavad sisend-BCL-i dekompressiooni ja BAM-/CRAM-väljundfailide tihendamist.

Väljundfaili kaalutlused.

- Seadmes teostatava geenirea, RNA, rikastamise ja DNA amplikoni konveierite analüüside korral ei laadita BAM-faile rakendusse BaseSpace Sequence Hub, kui proaktiivne tugi, käituse jälgimine ja andmesalvestus on valitud.

DRAGEN-i rikastamise konveier

DRAGEN-i rikastamise konveier toetab järgmisi funktsioone. Kui kasutate DRAGEN 3.7 või hilisemat versiooni, on nii idutee kui ka somaatiline režiim toetatud.

- Proovi demultipleksimine
- Kaardistamine ja joondamine, sh sorteerimine ja duplikaatide märgistamine
- Väikeste variantide nimetamine
- Struktuursete variantide nimetamine

Variantide nimetamiseks peab *.bed-fail sisalduma proovilehes või olema täpsustatud instrumendi käituse häälestuses BaseSpace Sequence Hubis. Struktuursete variantide nimetamine luuakse ainult paarisotstega lugemiste ja geenirea režiimi jaoks.

DRAGEN Enrichment'i versiooni 3.8 või uuema kasutamisel sisestage somaatilises režiimis jõudluse parandamiseks müra alusjoone fail. Vaadake jaotist [Müra alusjoone failide importimine leheküljel 17](#).

Konveier loob järgmisi väljundfaile.

Komponent	Tüüp	Väljundfaili nimi
Kaardistamine/joondamine	BAM või CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <sample_name>.bam või <sample_name>.cram
Väikeste variantide nimetamine	VCF ja gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz
Struktuursete variantide nimetamine	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <sample_name>.sv.vcf.gz

* gVCF-väljundfailid on saadaval ainult geenirea režiimis.

DRAGEN-i geenirea konveier

DRAGEN-i geenirea konveier toetab järgmisi funktsioone.

- Proovi demultipleksimine
- Kaardistamine ja joondamine, sh sorteerimine ja duplikaatide märgistamine
- Väikeste variantide nimetamine
- Struktuursete variantide nimetamine paarisotstega lugemiste puhul
- Koopiaarvu variantide nimetamine inimgenoomide puhul
- Korduste ekspansioonid inimgenoomide puhul
- Homosügootsuse piirkonnad inimgenoomide puhul
- **[DRAGEN v3.8 või hilisem]** CYP2D6 tuvastamine

Struktuursete variantide nimetamine luuakse ainult paarisotstega lugemiste jaoks.

Konveier loob järgmisi väljundfaile.

Komponent	Tüüp	Väljundfaili nimi
Kaardistamine/joondamine	BAM või CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <sample_name>.bam või <sample_name>.cram

Komponent	Tüüp	Väljundfaili nimi
Väikeste variantide nimetamine	VCF ja gVCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz
Struktuursete variantide nimetaja	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.sv.vcf.gz
Koopiaarvu variandid	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.cnv.vcf.gz
Korduste ekspansioon	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.repeats.vcf.gz
Homosügootsuse regioonid	CSV ja BED	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.roh_metrics.csv • <sample_name>.roh.bed
CYP2D6 tuvastamine	TSV	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>n.cyp2d6.tsv

DRAGEN-i DNA amplikoni konveier

DRAGEN-i konveier toetab järgmisi funktsioone.

- Proovi demultipleksimine
- Kaardistamine ja joondamine, sh sorteerimine ja duplikaatide märgistamine
- Väikeste variantide nimetamine geenirea või somaatilises režiimis.

Variantide nimetamiseks peab *.bed-fail sisalduma proovilehes või olema täpsustatud instrumendi kaituse häälestuses BaseSpace Sequence Hubis.

Konveier loob järgmisi väljundfaile.

Komponent	Tüüp	Väljundfaili nimi
Kaardistamine/joondamine	BAM või CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam või • <sample_name>.cram
Väikeste variantide nimetamine	VCF ja gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz

* gVCF-väljundfailid on saadaval ainult geenirea režiimis.

DRAGEN RNA konveier

DRAGEN-i RNA konveier toetab järgmisi funktsioone.

- Proovi demultipleksimine
- Kaardistamine ja joondamine, sh sorteerimine ja duplikaatide märgistamine
- Geenifusiooni tuvastamine
- Transkripti kvantifitseerimine
- [DRAGEN v3.8 või uuem] Diferentsiaalne geeniekspressioon

Väljundfailide genereerimiseks täpsustage proovilehel GTF-fail või tehke kindlaks, et vaikumisi `genes.gt.f.gz` eksisteerib referentsgenoomiga.

Konveier loob järgmisi väljundfaile.

Komponent	Tüüp	Väljundfaili nimi	Kirjeldus
Kaardistamine/joondamine	BAM või CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <code><sample-name>.bam</code> või <code><sample_name>.cram</code> 	Joondamise väljundi vastamine SAM-i täpsustustele.
Geenifusiooni tuvastamine	Tavaline tekst	<ul style="list-style-type: none"> <code><sample_name>.fusion_candidates.preliminary</code> <code><sample_name>.fusion_candidates.final</code> 	<ul style="list-style-type: none"> Fusiooni kandidaadid enne filtrite rakendamist. Fusiooni kandidaadid pärast filtrite rakendamist.
Transkripti kvantifitseerimine	Tavaline tekst	<ul style="list-style-type: none"> <code>sample_name.quant.genes.sf</code> <code>sample_name.quant.sf</code> 	<ul style="list-style-type: none"> Transkripti kvantifitseerimise tulemused geeni tasemel. Kõik transkripti kvantifitseerimise tulemused.
Diferentsiaalne ekspressioon	PNG	Vt järgmist diferentsiaalse ekspressiooni väljundfailide tabelit.	Väljundfailide loomiseks tuleb määrata võrdlus proovilehes.

Järgmised failid väljastatakse, kui diferentsiaalne ekspressioon on lubatud.

Faili nimi	Kirjeldus
<code>Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv</code>	Sisaldab diferentsiaalse ekspressiooni analüüsi mõõdikuid.
<code>Control_vs_Comparison.genes.counts.csv</code>	Kirjeldab igale geenile kaardistatud lugemite arvu igas proovis kontroll- ja võrdlusrühmades.

Faili nimi	Kirjeldus
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Diferentsiaalselt ekspresseeritud geenide soojuskaart kontroll- ja võrdlusrühmade proovides. Soojuskaart näitab ainult diferentsiaalselt ekspresseeritud gene kohandatud P-väärtusega $< -0,05$. Kui diferentsiaalselt ekspresseeritud gene on rohkem kui 30, kasutatakse ainult 30 kõige enam diferentsiaalselt ekspresseeritud geeni. Kui DESeq1 koondumine ei õnnestu või kui diferentsiaalselt ekspresseeritud gene pole, siis faili ei tekitata.
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Sisaldab geeniekspressiooni suhtarvude varieerumist keskmise signaali intensiivsuse funktsioonina. Selleks et näidata erinevusi kahe proovi mõõtmise vahel, teisendatakse andmed skaaladele M (log suhtarv) ja A (keskmine keskvärtus) ja kantakse andmed seejärel graafikule. MA graafik näitab antud muutujale omistatavaid log ₂ -kordseid muutusi võrreldes kõigi proovide normaliseeritud loenduste keskmisega. Kui kohandatud P-väärtus on väiksem kui 0,1, on punktid punased. Punktid, mis aknast välja jäävad, on tähistatud avatud kolmnurkadena. Ülespoole suunatud kolmnurgad esindavad positiivset log kordset muutust. Allapoole suunatud kolmnurgad esindavad negatiivset log kordset muutust.
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	Graafikul kuvatakse kahte esimest peamist komponenti, mis selgitavad kõige enam varieeruvust.
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Sisaldab DESeq2 tulemusi, mis kirjeldavad keskmist ekspressiooni, log ₂ (kordset muutust), log ₂ standardviga, P-väärtust, kohandatud P-väärtust ja iga geeni ekspressiooni olekut.
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Sisaldab DESeq2 abil arvutatud korrapärasustatud log ₂ -teisendatud loendusi.

DRAGEN-i üksikraku RNA konveier

DRAGEN toetab järgmisi funktsioone.

- Proovi demultipleksimine
- Kaardistamine ja joondamine, sh sorteerimine ja duplikaatide märgistamine
- Raku ja geeni klassifitseerimine

Väljundfailide genereerimiseks täpsustage proovilehel GTF-fail või tehke kindlaks, et vaikevalik `genes.gtf.gz` eksisteerib referentsgenoomiga.

Konveier loob järgmisi väljundfaile.

Komponent	Tüüp	Väljundfaili nimi
Kaardistamine/joondamine	BAM või CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <code><sample_name>.bam</code> või • <code><sample_name>.cram</code>
Raku/geeni klassifikatsioon	TSV, CSV ja MTX	<ul style="list-style-type: none"> • <code><sample_name>.scRNA.barcodeSummary.tsv</code> • <code><sample_name>.scRNA.genes.tsv</code> • <code><sample_name>.scRNA.matrix.mtx</code>
Analüüsiaruanne	HTML	<code><sample_name>.dragen.scrna-report.*.html</code>

DRAGEN-i BCL-konvertimise konveier

DRAGEN-i BCL-i konvertimise konveier kasutab BCL-i andmeid, mis on genereeritud sekveneerimiskäitusest ja proovilehe andmetest, et väljastada iga proovi jaoks FASTQ-fail. FASTQ-faili nimi on `<sample_name>.fastq.gz`.

Konveier loob järgmisi aruandeid.

Komponent	Tüüp	Väljundfaili nimi
Demultipleksimine	CSV	• <code>Demultiplex_Stats.csv</code>
Adapteri mõõdikud	CSV	• <code>Adapter_Metrics.csv</code>
Indeksivahetus	CSV	• <code>Index_Hopping_Counts.csv</code>
Levinumad teadmata vötkoodid	CSV	• <code>Top_Unknown_Barcodes.csv</code>

Demultipleksimise statistika aruanne

Demultipleksimise statistika aruanne sisaldab informatsiooni filtrit läbivate lugemite arvu kohta, mis on omistatud igale proovile proovilehel. Kõik lugemid, mis ei ole selgelt prooviga seotud, klassifitseeritakse määramatuks. Aruanne sisaldab ka informatsiooni aluste kvaliteediskooride kohta igale proovile määratud filtrit läbivates (PF) lugemites.

Aruanne sisaldab järgmist teavet.

Mõõdik	Kirjeldus
Rada	Rada läbivooluküvetil, millel proovi sekveneriti.
ProovID	Proovi ID proovilehelt. Kui lugem ei vasta ühelegi proovile, kuvatakse väljal väärtus <i>undetermined</i> (määramata).
Indeks	Indeksi 1. lugemi ja indeksi 2. lugemi konkatenatsioon proovilehelt, eraldatud sidekriipsuga. Kui lugem ei vasta ühelegi proovile, kuvatakse väljal väärtus <i>undetermined</i> (määramata).
Lugemite arv	Demultipleksitud PF lugemite arv proovi kohta näidatud rajal.
Täiuslike indeksilugemite arv	Lugemite, mis kattuvad täiuslikult proovilehel näidatud kombineeritud indeksijärjestustega, arv.
Ühe mittevastavusega indeksilugemite arv	Lugemite, millel on proovilehel näidatud kombineeritud indeksijärjestustes üks viga, arv.
≥ Q30 aluste arv (PF)	Aluste, sh adapterite, mis vastavad Q30 kvaliteedilävendit ületavate lugemitele, arv.
Keskmine kvaliteediskoor (PF)	Lugemite, mis vastavad proovile näidatud rajal, keskmine kvaliteediskoor. Väärtus sisaldab adapterite aluseid.

Adapteri mõõdikute aruanded

Adapteri mõõdikute fail sisaldab iga lugemiga seotud adapterite ja proovi aluste arvu.

Aruanne sisaldab järgmist teavet.

Mõõdik	Kirjeldus
Rada	Rada läbivooluküvetil, millel proovi sekveneriti.
Sample_ID	Proovi ID proovilehelt. Kui lugem ei vasta ühelegi proovile, kuvatakse väljal väärtus <i>undetermined</i> (määramata).
indeks	Index1 järjestus proovilehelt. See väli on tühi, kui indeksit ei täpsustatud proovilehel või kui proovi ID väärtus on <i>undetermined</i> (määramata).
indeks2	Indeks2 järjestus proovilehelt. See väli on tühi, kui indeks2 ei täpsustatud proovilehel või kui proovi ID väärtus on <i>undetermined</i> (määramata).
R1_AdapterBases	AdapterRead1-le vastavate aluste arv proovilehel.
R1_SampleBases	Kärbitud või maskitud aluste arv 1. lugemist vastava raja ja proovi kohta.

Mõõdik	Kirjeldus
R2_ AdapterBases	AdapterRead2-le vastavate aluste arv proovilehel.
R2_ SampleBases	Kärbitud või maskitud aluste arv 2. lugemist vastava raja ja proovi kohta.
Lugemite arv	Lugemite arv proovi kohta näidatud rajal.

Indeksivahetuste loenduse aruanne

Indeksivahetuste loenduse aruanne sisaldab lugemite arvu iga eeldatava ja vahetatud indeksi kohta topeltindeksiga käituste korral. Aruanne sisaldab ainult unikaalseid topeltindekseid raja kohta, milles vötkoodide kollisiooni ei tuvastata kummaski indeksis. Indeksivahetuse mõõdikute genereerimiseks rajale peab iga kirjade paari Hammingi vahemaa olema vähemalt $2N + 1$, milles N tähistab indeksile määratletud vötkoodi mittevastavuste taluvust.

Aruanne sisaldab järgmist teavet.

Mitteindekseeritud käituste, ühe indeksiga käituste või radade korral, mis ei sisalda unikaalseid topeltindekseid, sisaldab fail ainult päiseid.

Mõõdik	Kirjeldus
Rada	Rada läbivooluküvetil, millel proovi sekveneeriti.
Lugemite arv	Lugemite arv proovi kohta näidatud rajal.
ProovID	Proovi ID proovilehelt. Kui lugem ei vasta ühelegi proovile, kuvatakse väljal väärtus <code>undetermined</code> (määramata).
indeks1	Indeks1 järjestus proovilehelt. Väli on tühi, kui lugem on üheotsaline või kui proovi ID väärtus on <code>undetermined</code> (määramata).
indeks2	Indeks2 järjestus proovilehelt. Väli on tühi, kui lugem on üheotsaline või kui proovi ID väärtus on <code>undetermined</code> (määramata).

Levinumad teadmata vötkoodid

Levinumate teadmata vötkoodide aruanne sisaldab 100 levinumat indeksit või indeksipaari raja kohta, mida proovilehel lubatud mittevastavuste arvu järgi ei tuvastatud. Kui 100. suurima indeksi loendusega kirjena on toodud mitu indeksiväärtust, väljastatakse kõik sama loendusega indeksiväärtused 100. kirjena.

Aruanne sisaldab järgmist teavet.

Möödik	Kirjeldus
Rada	Rada läbivooluküvetil, millel proovi sekveneeriti.
indeks	Iga teadmata indeksi järjestus 1. indeksi lugemises. Väli on tühi, kui mitte ühtegi teadmata indeksit ei leitud.
indeks2	Iga teadmata indeksi järjestus 2. indeksi lugemises. Kui käitus oli ülksiklugemisega või ühtegi teadmata indeksit ei leitud, on väli tühi.
Lugemite arv	Lugemite arv proovi kohta näidatud rajal.

Illumina DRAGEN-i QC aruanded

DRAGEN FastQC genereerib vaikumisi QC graafikud kõigi konveierite puhul. Koondatud QC tulemused talletatakse kaustas `AggregatedFastqcMetrics` ja tulemused proovi kohta talletatakse kaustas `<sample_name>`.

QC aruandeid ei genereerita, kui proovide arv on üle 512.

Olemas on järgmised QC graafikud.

QC graafik	Kirjeldus
adapter_content	Järjestuste protsent iga aluspaari kohta.
positional_mean_quality	Iga lugemi asendi keskmine Phred-skaala aluste kvaliteediskoor.
gc_content	Iga sekveneerimislugemi GC sisu protsent.
positional_quality.read_1	Aluste keskmine Phred-skaala kvaliteediväärtus koos spetsiifilise nukleotiidiga ja teatud kindlas asukohas 1. lugemis.
gc_quality	
positional_quality.read_2	Aluste keskmine Phred-skaala kvaliteediväärtus koos spetsiifilise nukleotiidiga ja teatud kindlas asukohas 2. lugemis.
n_content	
read_length	Iga loendi järjestuse pikkus.
positional_base_content.read_1	Iga spetsiifilise nukleotiidi aluste arv teatud kindlates asukohtades 1. lugemis.
read_quality	Iga sekveneerimislugemine keskmine Phred-skaala kvaliteediskoor.
positional_base_content.read_2	Iga spetsiifilise nukleotiidi aluste arv konkreetses teatud kindlates asukohtades 2. lugemis

DRAGEN-i sekundaarse analüüsi väljundkausta struktuur

Vaikimisi genereerib DRAGEN väljundfailid vahekaardil Settings (Sätted) valitud väljundkaustas. DRAGEN loob iga töövoos jaoks kokkuvõtliku aruande failis `report.html`.

Andmed

report.html

report_files

AggregateFastQCPlots

*.png

*stderr_.txt

*stdout_.txt

dragen_prev_48_hrs.log

d1m_prev_48_hrs.log

SampleSheet.csv

Käituse sisendfailid (nt BED-, GTF-failid)

sample_name

enrich_caller , germline_seq, dna_amplicon_seq, rna_seq või scrna_seq

sample_name

*.png

dragen_*.log

sample_name.*.metrics.csv

[DNA] sample_name.*.vcf.gz

[DNA] sample_name.*.gvcf.gz – ei ole saadaval DRAGEN Bio-IT platvormi amplikoni (somaatilise) konveieri jaoks.

sample_name.*.bam või sample_name.*.cram

Logid

[RNA] sample_name.fusion_candidates.filter_info

[RNA] sample_name.fusion_candidates.final

[RNA] sample_name.quant.genes.sf

[RNA] sample_name.quant.sf

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

[RNA] DifferentialExpression

Comparison1

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

ComparisonN

logs

- *.txt
- *.csv

fastq – saadaval ainult juhul, kui suvandi KeepFastq väärtuseks on määratud tõene.

- *.fastq.gz

ora_fastq – saadaval ainult siis, kui suvandi FastqCompressionFormat väärtuseks on määratud 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** – ainult paarisotsaliste lugemiste jaoks.



 **0001**

-  dataset.json

 **0002**

-  dataset.json
-  Adapter_Metrics.csv
-  Demultiplex_Stats.csv
-  Index_Hopping_Counts.csv

 **Read1Metrics** – ainult paarisotsaliste lugemiste jaoks.


-  Adapter_Metrics.csv
-  Index_Hopping_Counts.csv

Hooldus

See jaotis kirjeldab vajalikke protseduure heas korras süsteemi säilitamiseks. Lugege, kuidas installida tarkvara uuendusi, vahetada õhufiltreid ja teha teisi perioodilisi hooldusprotseduure. Juhtimistarkvara uuendamine tagab, et teie süsteemi on installitud kõige hiljutisemad veaparandused ja funktsioonid optimaalseks toimimiseks.

Kõvakettaruumi vabastamine

Sekveneerimiskäitus nõuab ligi 200 GB kõvakettaruumi. Kui ruumi on vähe, kuvatakse hoiatusteade. Järgige alltoodud samme, et ruumi juurde teha, kustutades lõppenud käitusi ja installitud referentsgenoome ajutisest käituse kaustast.

 Kustutage käitusi, kasutades ainult NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara selle asemel, et teha seda juhtimissüsteemi kaudu käsitsi. Käituste käsitsi kustutamine võib juhtimistarkvara negatiivselt mõjutada.

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Disk Management** (Kettahaldus).
Ilmub kuva Disk Management (Kettahaldus) koos kõvakettale salvestatud käituste ja referentsgenoomide loendiga.
2. Valige kustutatava käituse juures käsk **Delete Run** (Kustuta käitus).
Käituse kustutamine kustutab käituse kohaliku kausta. Väljundkaust, mis on käituse kausta koopia, jääb alles.
3. Valige dialoogiaknas suvand **Yes, Delete Runs** (Jah, kustuta käitused), et käituse kustutamine kinnitada.
4. Korrake samme 2 ja 3 iga käituse puhul, mille soovite kustutada.
5. Valige kustutatava genoomi juures käsk **Delete Genome** (Kustuta genoom).
6. Valige dialoogiaknas suvand **Yes, Delete Genome** (Jah, kustuta genoom).
7. Korrake samme 5 ja 6 iga genoomi puhul, mille soovite kustutada.
8. Kui olete lõpetanud, sulgege funktsioon Disk Management (Kettahaldus), et naasta avakuvale.

Tarkvaravärskendused

Tarkvara värskendamine tagab, et teie süsteemil oleksid uusimad funktsioonid ja parandused. Tarkvaravärskendused on pakitud süsteemipaketti, mis hõlmab järgmist tarkvara.

- NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara
- NextSeq 1000/2000 moodused

- Universaalkoopia teenus
- Reaalajas analüüs

i | DRAGEN-i moodulid süsteemipaketis ei sisaldu. Paigaldage need vastavalt vajadusele eraldi. DRAGEN-i mooduli tarkvarale pääsete juurde kasutajatoe lehtede kaudu.

Süsteemi konfiguratsiooni järgi laaditakse tarkvaravärskendused alla kas automaatselt või käsitsi.

- **Automaatsed värskendused** – värskendused laaditakse teenusest BaseSpace Sequence Hub teile installimiseks automaatselt alla. See valik nõuab internetiühendust, kuid mitte teenuse BaseSpace Sequence Hub kontot.
- **Käsitsi värskendused** – värskendused laaditakse veebist käsitsi alla, salvestatakse kohalikult või kaasaskantavale kettale ja installitakse salvestatud asukohast. See valik ei nõua seadme jaoks internetiühendust.

Automaatse tarkvaravärskenduse installimine

1. Veenduge, et käimas ei oleks ühtegi sekveneerimiskäitust ega seadmes toimuvat sekundaarset analüüsi.
2. Logige ilmnadmini sisse.
3. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Software Update** (Tarkvaravärskendus). Automaatsete värskenduste jaoks konfigureeritud süsteemid kuvavad teate, kui tarkvaravärskendus on saadaval.
4. Värskenduse kontrollimiseks valige **Check Online for Software Update** (Otsi tarkvarauuendust veebist).
5. Tarkvara uusima versiooni allalaadimiseks valige suvand **Update Now** (Värskenda kohe). Kui allalaadimine on lõppenud, suletakse juhtimistarkvara ja kuvatakse installiviisard. Juhtimistarkvara taaskäivitub automaatselt. Mis tahes püsivaravärskendused tehakse automaatselt pärast taaskäivitamist.

i | Uuenduse tühistamine ei ole võimalik pärast installimise algust. Teil on võimalik uuendus tühistada ainult allalaadimise ajal.

Tarkvaravärskenduse käsitsi installimine

1. Logige ilmnadmini sisse.
2. Veenduge, et käimas ei oleks ühtegi sekveneerimiskäitust ega seadmes toimuvat sekundaarset analüüsi.
3. Kui saadaval on tarkvaravärskendus, laadige alla paketiinstaller (*tar.gz) [Sekveneerimissüsteemi NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 tugiteenuste lehelt](#). Salvestage installer kohalikule või teisaldatavale kettale.

4. Kui salvestate *.zip faili teisaldatavale kettale, ühendage ketas USB-pordi 3.0 kaudu, mis asuvad nii seadme küljel kui ka taga.
5. Valige juhtimistarkvara menüüst valik **Software Update** (Tarkvaravärskendus).
6. Valige käsk **Choose...** (Vali...), et installeri juurde navigeerida.
7. Installimise alustamiseks valige käsk **Update Now** (Värskenda kohe).
Juhtimistarkvara kuvab installeerimise ajal hõivatuse indikaatorit.
Juhtimistarkvara taaskäivitub automaatselt. Mis tahes püsivaravärskendused tehakse automaatselt pärast taaskäivitamist.



Uuenduse tühistamine ei ole võimalik pärast installimise algust. Teil on võimalik uuendus tühistada ainult allalaadimise ajal.

DRAGEN-i töövoog ja litsentsi uuendused

Ainult süsteemi administraatorid saavad DRAGEN-i töövooge installida ja DRAGEN-i litsentsi uuendada.

DRAGEN-i litsentsi uuendamine veebis

Kui NextSeq 1000/2000 on internetiga ühendatud, värskendage oma DRAGEN Bio-IT platvormi litsentsi järgmiselt.

1. Võtke ühendust Illumina tehnilise toega, et saada uus litsentsivõti.
2. Oodake 24 tundi, et litsents uuenduks automaatselt, või uuendage litsentsi kohe järgmiselt.
 - a. Valige juhtimistarkvara menüü ja seejärel valige **DRAGEN**.
 - b. Valige **Check Online** (Otsi võrgust), et kontrollida kas uus DRAGEN-i litsentsivõti on saadaval.
 - c. Kui see on saadaval, valige **Update** (Uuenda).

DRAGEN-i litsentsi uuendamine võrguühenduseta

Kui NextSeq 1000/2000 ei ole internetiga ühendatud, värskendage oma DRAGEN Bio-IT platvormi litsentsi järgmiselt.

1. Võtke ühendust Illumina tehnilise toega, et saada uus litsentsivõti. Salvestage kaust `license.zip` kohalikule või teisaldatavale kettale.
2. Kui salvestate *.zip faili teisaldatavale kettale, ühendage ketas USB-pordi 3.0 kaudu, mis asuvad nii seadme küljel kui ka taga. Vajaduse korral liigutage seadet ettevaatlikult, et pääseda juurde tagaküljele.
3. Valige juhtimistarkvara menüü ja seejärel valige **DRAGEN**.
4. Valige **Choose** (Vali), et liikuda *.zip faili juurde, ja seejärel valige **Open** (Ava).

DRAGEN-i töövoogude veebis installimine

Kui NextSeq 1000/2000 on ühendatud internetiga, saate installida DRAGEN-i töövood otse NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvarasse. DRAGEN-i töövoogude installimine veebis on saadaval ainult NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara versioonis 1.3.

1. Valige juhtimistarkvara menüü ja seejärel valige **Process Management** (Toiminguhaldus).
2. Veenduge, et käimas ei oleks ühtegi sekvenerimiskäitust ega seadmes toimuvat sekundaarset analüüsi.
3. Valige juhtimistarkvara menüü ja seejärel valige **DRAGEN**.
Versiooni all loetleb jaotis Available Workflows (Saadaolevad töövood) süsteemi hetkel installitud töövood.
4. DRAGEN-i töövoogude NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvarasse installimiseks valige suvand **Check Online** (Otsi võrgust).
Mitte kõik DRAGEN-i versioonid ega töövood ei ühildu veebis installimisega. Täiendavate töövoogude jaoks kasutage võrguühenduseta installimist.
5. Valige nende töövoogude märkeruudud, mille soovite installida. Kui see pole installitud, installige kindlasti esimesena BCL-i konvertimise uusim versioon.
Teavet töövoouusima versiooni kohta saate vaadata väljalaskemärkmetest.
6. Installimise alustamiseks valige käsk **Install** (Installi).
7. Sisestage süsteemi parooliks ilmnadmin ja seejärel valige **Authenticate** (Autendi).

DRAGEN-i töövoogude võrguühenduseta installimine

1. Kui DRAGEN-i töövoouuendus on saadaval, laadige alla installer (*.tar.gz) [DRAGEN-i toesaidilt](#).
Salvestage installer kohalikule või teisaldatavale kettale.
2. Kui salvestate *.zip faili teisaldatavale kettale, ühendage ketas USB-pordi 3.0 kaudu, mis asuvad nii seadme küljel kui ka taga. Vajaduse korral liigutage seadet ettevaatlikult, et pääseda juurde tagaküljele.
3. Valige juhtimistarkvara menüü ja seejärel valige **Process Management** (Toiminguhaldus).
4. Veenduge, et käimas ei oleks ühtegi sekvenerimiskäitust ega seadmes toimuvat sekundaarset analüüsi.
5. Valige juhtimistarkvara menüü ja seejärel valige **DRAGEN**.
6. Installerisse navigeerimiseks valige versioonide alt suvand **Browse for New Version** (Otsi uut versiooni).
7. Installimise alustamiseks valige käsk **Install** (Installi).
8. Sisestage süsteemi parooliks ilmnadmin ja seejärel valige **Authenticate** (Autendi).

Õhufiltri asendamine

Järgige iga 6 kuu tagant aegunud õhufiltri asendamiseks järgmisi juhiseid.

Õhufilter on ühekordselt kasutatav nelinurkne kassett, mis katab seadme paremal küljel oleva ventilaatori. See tagab vajaliku jahutuse ja väldib prahi sattumist süsteemi. Seadmel on tarnimisel paigaldatud üks õhufilter ja kaasas üks varufilter. Lisaosad sisalduvad kehtivas seadme teenuselepingus või saab need osta eraldi Illuminalt.

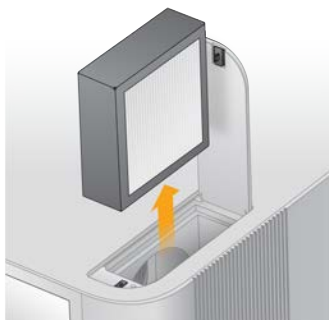
1. Vajutage seadme peal ülemise paneeli paremat serva joonisel näidatud viisil, et see vabastada.



2. Avage paneel.



3. Vajutage, et vabastada õhufiltri kassett, eemaldage see paneeli keskelt ja visake ära.



4. Sisestage uus õhufilter pistmikusse ja vajutage seda kinnitamiseks.

5. Sulgege ülemine paneel ja vajutage see oma kohale.



6. Liigutage seade tagasi algseesse asendisse.

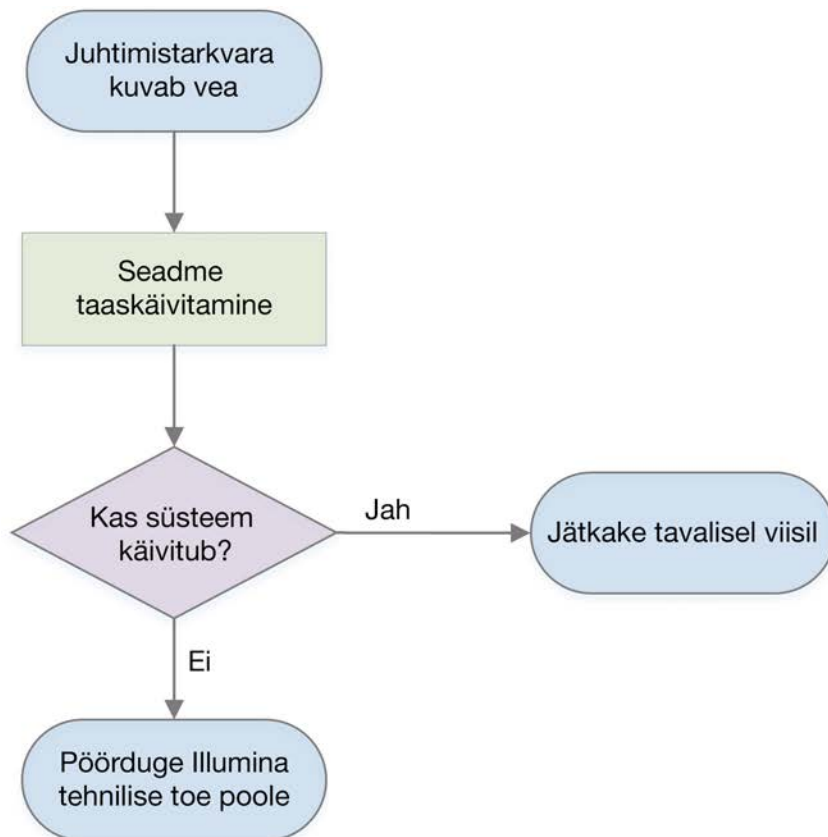
Tõrkeotsing

Selles jaotises on toodud sammsammulised suunised käituse tühistamise, seadme taaskäivitamise ja teiste tõrkeotsingu protseduuride jaoks.

Veateate lahendamine

Selles lisas on toodud üksikasjalikud juhtnöörid erinevate tõrkeotsingu sammude jaoks. Järgmisel vooskeemil on esitatud ülevaade tõrkeotsingu veateadetest, mis kuvatakse käivitamise, käituse seadistamise, käituseelsete kontrollide või sekveneerimise ajal ja mida ei saa lahendada uuesti proovimisega.

Paljud vead saab lahendada taaskäivitamisega: seadme väljalülitamise ja seejärel uuesti sisselülitamisega. Lisateabe saamiseks taaskäivitamise kohta vaadake jaotist [Seadme taaskäivitamine](#) leheküljel 80.



Kulutarvikute tagastamine hoiukohta

Kasutage järgmisi juhiseid, et hoiustada sulanud kassett ja läbivooluküvett seadme tõrke korral seadme käituseelse kontrolli ajal enne vedelikusüsteemi kontrollimist.

1. Lahutage läbivoolurakk kassetist.
 2. Eemaldage ja visake ära mahutis olev lahjendatud teek (kuni ~18 µl).
- !** Valmistage samast teegist uus lahjendus järgmise käituse jaoks, et vältida proovide ristsaastumist mahutis olevate teegi jääkide poolt.
3. Asetage kassett hoiukohta temperatuuril 2–8 °C, silt ülespoole, nii et õhk saaks liikuda kõigil külgedel.
Ärge ületage 72 tundi. Kui kasseti sulatati üleöö külmikus 12 tundi, ärge ületage 60 tunni piiri.
 4. Pange läbivooluküvett tagasi algsesse hõbedasse fooliumpakendisse koos kuivatusainega.
 5. Teipige fooliumpakend kinni ja asetage 2–8 °C juures hoiukohta.
Ärge ületage 72 tundi.

Käituse tühistamine

1. Valige suvand **End Run** (Lõpeta käitus).
2. Reaktiivikasseti automaatseks puhastamiseks valige **Purge Reagent Cartridge** (Puhasta reaktiivikassett).
Vaikimisi valik on konfigureeritud NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara sätetes.
3. Valige **Yes, end the sequencing run** (Jah, lõpeta sekveneerimise käitus).
Käituse tühistamine on lõplik. Tarkvara ei saa käituse juurde naasta ja kulutarvikuid ei saa korduvkasutada pärast käituseelsete kontrollide seadme kontrolli osa.
4. Visiiri avamiseks ja aluse väljutamiseks valige käsk **Eject Cartridge** (Väljuta kassett).
5. Eemaldage kassett aluselt.
6. Pange kassett hoiule või visake ära olenevalt sellest, millal tühistamine toimus.

Olukord	Juhtum
Tühistasite enne seadme käivituseelset kontrolli või selle ajal ja soovite kulutarvikuid taaskasutada.	Vaadake jaotist Kulutarvikute tagastamine hoiukohta leheküljel 79 .
Kõik muud olukorrad.	Vaadake jaotist Kulutarvikute mahalaadimine leheküljel 51

7. Valige käsk **Close Door** (Sule luuk), et alus uuesti laadida ja avakuvale naasta.
Andurid kinnitavad kasseti eemaldamist.

Käituse uuesti järjestamine

Kui toiminguhalduses kuvatakse sekundaarse analüüsi oleku kohta tõrge, saate käituse uuesti järjestada, et teostada uuesti genereeritud cBCL-failide DRAGEN-i analüüs seadmes. Uuesti järjestamise funktsiooni jaoks peab algne käituse kaust olema seadmes endiselt olemas. Selle uuesti järjestamise funktsiooni kasutamine ei järjestata uuesti käituse platvormil BaseSpace Sequence Hub. BaseSpace Sequence Hubis uuesti järjestamiseks vaadake BaseSpace Sequence Hubi spikrikeskuses jaotist Proovilehe parandamine.

1. Värskendage oma proovilehe v2 ja salvestage proovileht teisaldatavale või ühendatud võrgukettale.
2. Kui salvestate proovilehe teisaldatavale kettale, ühendage ketas USB-porti 3.0, mis asuvad nii seadme küljel kui ka taga. Vajaduse korral liigutage seadet ettevaatlikult, et pääseda juurde tagaküljele.
3. Valige juhtimistarkvara menüü ja seejärel valige **Process Management** (Toiminguhaldus).
4. Veenduge, et käimas ei oleks ühtegi sekvenerimiskäitust ega seadmes toimuvaid sekundaarseid analüüse.
5. Uuesti järjestamiseks valige lõpetatud käituse kõrval suvand **Requeue** (Järjesta uuesti).
6. Valige **Choose** (Vali), et liikuda värskendatud proovilehe juurde, ja seejärel valige **Open** (Ava).
7. Valige **Start Requeue** (Käivita uuesti järjestamine).

Seadme taaskäivitamine

Seadme taaskäivitamine lülitab süsteemi ohutult välja ja käivitab selle uuesti kadunud ühenduse taastamiseks, tehniliste andmetega ühtlustamiseks või lähtestamistõrke kõrvaldamiseks. Tarkvarateated annavad teada, kui vea või hoiatuse lahendamiseks on vaja seade taaskäivitada.

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **Shut Down Instrument** (Lülita seade välja).
2. Kui süsteem ei lülitu välja, hoidke seadme paremal küljel asuvat toitenuppu all, kuni tuled kustuvad.
3. Kui toitenupp pulseerib, vajutage tagapaneelil oleva lüliti väljalülituskülge (O). Toitenupp võib pärast toite väljalülitamist pulseerimist jätkata.

Joonis 8. Lüliti asukoht



4. Oodake 30 sekundit.
5. Vajutage lüliti sisselülitamise küljele (I).
6. Kui toitenupp pulseerib, oodake 30 sekundit ja seejärel vajutage seda.

Joonis 9. Toitenupu asukoht



7. Oodake umbes 5 minutit operatsioonisüsteemi laadimiseks. Kui operatsioonisüsteem on laaditud, logige süsteemi sisse.
Juhtimistarkvara käivitatakse ja süsteem lähtestatakse. Oodake umbes 5 minutit süsteemi lähtestamiseks. Kui lähtestamine on lõpule jõudnud, ilmub avakuva.

Süsteemi kontrollimine

Süsteemikontroll ei ole vajalik tavakasutamisel või seadme hooldamisel. Samas võib Illumina tehnilise toe esindaja paluda teil teha süsteemikontroll tõrkeotsingu eesmärgil.

Neljal alamsüsteemi kontrollil kulub käituseelse kontrolli vigade ja muude probleemide tõrkeotsinguks umbes 58 minutit. Testid kinnitavad, kas komponendid on õigesti joondatud ja funktsionaalsed.

Testi tulemused väljastatakse kausta `system-check` asukohas `/usr/local/illumina/system-check`.

Enne süsteemi kontrollide käitamist eemaldage kindlasti kassett.

Süsteemikontrolli tegemine

1. Valige juhtimistarkvara menüüst suvand **System Checks** (Süsteemi kontrollid).
2. Valige märkeruut kõikide järgmiste süsteemikontrollide jaoks, mille soovite teha.
 - **Network Connectivity** (Võrgu ühenduvus) – kontrollib teie internetiühenduse olekut ja jõudlust.
 - **Enclosure** (Ümbris) – kontrollib termosüsteemi ja visiiri tõstemehhanismi tööd.
 - **Motion** (Liikumine) – kontrollib liikumise piirväärtusi ja tööd Z-etapis ja XY-etapis.
 - **Optics** (Optika) – kontrollib pildindusmooduli tööd.
3. Valige suvand **Start** (Käivita).

Tehasesätete taastamine


Tarkvaraversiooni alandamiseks või ebasoovitavast konfiguratsioonist taastamiseks taastage tehase vaikesätted. Seda funktsiooni tohiks kasutada ainult Illumina esindaja.

Installitud kujutise jäädvustamine

Jäädvustage süsteemi kujutis, et varundada õigesti funktsioneeriv tarkvara uuendus. Selle süsteemikujutise saab hiljem taastada. Soovitatav on süsteemikujutis jäädvustada kohe pärast algse paigalduse lõpetamist ja muuta ära oma parool Illumina esindajaga.

1. Linuxi taaskäivitamine.
2. Kui kuvatakse operatsioonisüsteemi valiku viip, valige **Capture Installed Image** (Jäädvusta installitud kujutis).

Operatsioonisüsteemi suvandid ilmuvad ekraanile hetkeks enne automaatset jätkamist tarkvaraga iSeq Control.

 Kuna mällu saab salvestada ainult ühe kujutise, kustutab see eelnevalt salvestatud kujutise.
3. Oodake umbes 30 minutit, et süsteem saaks jäädvustada kujutise praegusest installist.

Jäädvustamise ajal võib vaja olla mitut taaskäivitust. Pärast lõpetamist süsteem taaskäivitub, praegune installikujutis on mällu salvestatud.

Jäädvustatud kujutise taastamine

Taastage süsteem eelnevalt jäädvustatud kujutisele, et taastada soovimatust konfiguratsioonist.

1. Linuxi taaskäivitamine.
2. Kui kuvatakse operatsioonisüsteemi valiku viip, valige **Restore Installed Image** (Taasta installitud kujutis).

Operatsioonisüsteemi suvandid ilmuvad ekraanile hetkeks enne automaatset jätkamist tarkvaraga iSeq Control.

- i** | Paroolid on seotud süsteemi kujutisega. Pärast taastamist kasutage süsteemi sisselogimiseks taastatud kujutise parooli.
3. Oodake umbes 30 minutit, kuni taastamine on lõpule jõudnud.
Taastamine võib hõlmata mitut algkäivitust. Pärast lõpetamist algkäivitub süsteem taastatud kujutisega.

Ressursid ja viited

Proovilehe v2 sätted

Kohalikku režiimi järgides saate kasutada proovilehe v2 failivormingut, et konfigurera oma kaituse sätteid. Looge proovileht seadme kaituse häälestamisel või redigeerides *sekveneerimissüsteemide NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 proovilehe v2 malli*. Proovilehte muutes veenduge, et järgmised jaotised ja väljad oleksid kaasatud loetletud järjekorda ja vastaksid nõuetele. Pärast muutmist kasutage teisaldatavat või paigaldatavat võrguketast, et teisaldada proovileht sekveneerimissüsteemidesse NextSeq 1000 ja NextSeq 2000. Kui te liigute proovilehele juhtimistarkvaras, kopeeritakse see seadmes eelkaituse kausta, et teisaldatav ketas oleks võimalik eemaldada.

Veenduge, et proovilehe v2 sätted vastaksid järgmistele nõuetele.

- Proovilehe BCLConvert_Data jaotises määratletud indeksi järjestused peaksid ühtima seadmes NextSeq 1000/2000 valitud indeksi komplektiga.
- Kui kasutate NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara v1.2, peab proovilehel täpsustatud DRAGEN-i versioon olema installitud ja süsteemis aktiivne. Installimise teavet vt [Tarkvaravärskendused leheküljel 72](#).
- Kui kasutate NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara v1.3, peab proovilehel täpsustatud DRAGEN-i versioon olema installitud ja süsteemis aktiivne. Juhtimistarkvara tuvastab DRAGEN-i versiooni proovilehelt automaatselt ja palub vajaduse korral aktiivseid versioone vahetada. Installimise teavet vt [Tarkvaravärskendused leheküljel 72](#).

Kui kasutate DRAGEN-it, peate konfigurera lisaätteid. Lisateavet vt [DRAGEN-i proovilehe seaded leheküljel 88](#).

Laadige sekveneerimissüsteemide NextSeq 1000 ja NextSeq 2000 tugiteenuste lehel tootefailidest alla proovilehe v2 mall. Kui koostasite proovilehe seadme kaituse häälestamist kasutades, võib proovilehe muutmise pärast algset allalaadimist põhjustada analüüsitõrke.

Failinimed ei tohi sisaldada eritärke.

Suvandi [Header] nõuded

Suvand [Header] hõlmab üldteavet teie kaituse kohta. Järgnevad on saadavaolevad suvandi [Header] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
FileFormatVersion	Jah	Proovilehe versioon. Sisestage väärtuseks 2.
RunName	Ei	Ainulaadne eelistatav käituse nimi. Suvand RunName võib sisaldada tähtnumbrilisi märke, allkriipse, sidekriipse ja punkte. Kui RunName sisaldab tühikuid või eritärke, analüüs nurjub.
RunDescription	Ei	Käituse kirjeldus.
InstrumentPlatform (Instrumendi platvorm)	Ei	NextSeq 1000/2000
InstrumentType (Instrumendi tüüp)	Ei	NextSeq 1000/2000

Suvandi [Reads] nõuded

Suvand [Reads] kirjeldab sekveneerimistsükli arvu, mida kasutatakse genoomilise indeksi 1. ja 2. lugemise jaoks. Järgnevad on saadaolevad jaotise [Reads] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
Read1Cycles	Jah	Tsükli arv esimeses lugemises. Väärtus peab olema täisarv suurem kui null.
Read2Cycles	Ei	Tsükli arv teises lugemises.
Index1Cycles	Ei	Tsükli arv esimeses indeksi lugemises. Nõutud, kui toimub rohkem kui ühe proovi sekveneerimine. 10 tsükli on maksimaalne.
Index2Cycles	Ei	Tsükli arv teises indeksi lugemises. 10 tsükli on maksimaalne.

Suvandi [Sequencing_Settings] nõuded

Kasutage suvandit [Sequencing_Settings], et määratleda kasutatav teegi ettevalmistuskomplekt.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
LibraryPrepKits (Teegi ettevalmistuskomplektid)	Ei	Teie teegi ettevalmistuskomplekt. Lubatud on ainult üks teegi ettevalmistuskomplekt. NextSeq 1000/2000 juhtimistarkvara versioonis 1.3 valitakse nõutav kohandatud meetod automaatselt, kui Illumina Stranded Total RNA ettevalmistus Ribo-Zero Plus komplektiga või Illumina Stranded mRNA ettevalmistuskomplektiga on määratud teegi ettevalmistuskomplektiks. Sisestage üks järgmistest väärtustest. <ul style="list-style-type: none"> Illumina Stranded Total RNA ettevalmistus koos Ribo-Zero Plus komplektiga – <code>ILMNStrandedTotalRNA</code> Illumina Stranded mRNA ettevalmistuskomplekt – <code>ILMNStrandedmRNA</code>

BCL-i konvertimise nõuded

BCL-i konvertimise jaotis hõlmab teavet andmete konvertimise kohta BCL-st FATSQ-ks. BCL-i konvertimise valikud hõlmavad kahte erinevat jaotist: [BCLConvert_Settings] ja [BCLConvert_Data]. BCL-i konvertimise jaotised vajavad teavet adapterijärjestuse kohta. Sobiva adapterijärjestuse tuvastamiseks iga lugemise ja indeksi jaoks vt *Illumina adapterijärjestused (dokument nr 1000000002694)*.

Järgnevad on saadaval olevad [BCLConvert_Settings] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
SoftwareVersion (Tarkvara versioon)	Jah	Praegune DRAGEN-i tarkvara versioon, mis on süsteemi installitud. Kasutage kõiki kolme täisarvu, mis sisalduvad versiooninimes. Näiteks 3.5.7.
BarcodeMismatchesIndex1	Ei	Lubatud mittevastavuste arv esimese indeksi lugemise ja indeksi järjestuse vahel. Väärtused saavad olla kas 0, 1 või 2. Vaikeväärtus on 1.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
BarcodeMismatchesIndex2	Ei	Lubatud mittevastavuste arv teise indeksi lugemise ja indeksi järjestuse vahel. Väärtused saavad olla kas 0, 1 või 2. Vaikeväärtus on 1.
FastqCompressionFormat	Ei	FASTQ-failide väljastamiseks *.gz failina, sisestage <code>gzip</code> . FASTQ-failide salvestamiseks *.ora failina ja DRAGEN-i lahtipakkimisega kasutamiseks, sisestage <code>dragen</code> .
AdapterRead1	Ei	Järjestus 1. lugemise lõpu kärpimiseks või maskimiseks. 1. lugemise adapterijärjestus, milles sisaldub A, C, G või T. AdapterRead1 kärbib tsükleid vaikimisi.
AdapterRead2	Ei	Järjestus 2. lugemise lõpu kärpimiseks või maskimiseks. 2. lugemise adapterijärjestus, milles sisaldub A, C, G või T. AdapterRead2 kärbib tsükleid vaikimisi.
OverrideCycles	Ei	String, mida kasutatakse UMI tsüklite määramiseks ja lugemise tsüklite peitmiseks. Lubatud on järgmised väärtused. <ul style="list-style-type: none"> • N – täpsustab tsükleid, mida tuleb ignoreerida. • Y – täpsustab sekveneerimistsükleid. • I – täpsustab indeksi tsükleid. • U – täpsustab UMI tsükleid, mida tuleb kärpida. Iga element on semikoolonitega eraldatud. Järgnevad on näited sisendist <code>OverrideCycles</code> . U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

Järgnevad on saadaval olevad [BCLConvert_Data] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
Sample_ID	Jah	Proovi ID. Proovi ID võib sisaldada kuni 20 tähtnumbrilist tärki, sidekriipsu ja alakriipsu. ID on tõstutundlik. Eraldage iga identifikaator sidekriipsu või alakriipsuga. Näiteks: Sample1-DQB1-022515.
Index	Ei	Prooviga seotud indeksijärjestus. Lubatud on ainult A, C, T, G. Nõutud, kui toimub rohkem kui ühe proovi sekveneerimine.
Index2	Ei	Teise indeksi järjestus, mida seostatakse prooviga. Lubatud on ainult A, C, T, G. Veenduge, et teise indeksi (i5) adapterijärjestused oleksid pärisuunalises orientatsioonis. Sekundaarse analüüsi käigus tekitab DRAGEN automaatselt i5 indeksite pöördkomplementid.
Lane (Rada)	Ei	Läbivooluküveti rada. Rajad on esindatud ühe täisarvulise väärtuse poolt.

DRAGEN-i proovilehe seaded

See jaotis kirjeldab proovilehe nõudeid iga DRAGEN-i konveieri jaoks. Lisage oma DRAGEN-i konveieri sätted oma proovilehele viimase jaotisena. Te saate kasutada ainult üht DRAGEN-i konveierit.

Iga DRAGEN-i konveier hõlmab eraldi jaotisi sätete ja andmete jaoks.

DRAGEN-i geenirea konveieri nõuded

Järgnevad on saadaolevad suvandi [DragenGermline_Settings] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
Software Version (Tarkvara versioon)	Jah	Praegune DRAGEN-i tarkvara versioon, mis on süsteemi installitud. Kasutage kõiki kolme täisarvu, mis sisalduvad versiooninimes. Näiteks 3.5.7. Tarkvara versioon peab kattuma versiooniga, mis on täpsustatud jaotises BCLConvert Settings.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
ReferenceGenomeDir	Jah	Referentsgenoomi nimi. Näiteks hg19_alt_aware. Kasutage referentsgenoomi nime, mis asub teel <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Kohandatud referentsgenoomi kasutamiseks vaadake jaotist <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> .
MapAlignOutFormat	Ei	Väljundfaili vormindamine. Lubatud väärtused on bam või cram. Kui ühtegi väärtust ei täpsustatud, on see vaikimisi Puudub.
KeepFastq	Ei	FASTQ väljundfailide salvestamiseks sisestage väärtus <code>true</code> (õige). FASTQ väljundfailide eemaldamiseks sisestage väärtus <code>false</code> (vale).

Järgnevad on saadaolevad suvandi [DragenGermline_Data] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
Sample_ID	Jah	Proovi ID. Proovi ID võib sisaldada kuni 20 tähtnumbrilist tärki. ID on tõstutundlik. Eraldage iga identifikaator kriipsuga. Näiteks: Sample1-DQB1-022515. Proovi ID-d peavad kattuma jaotises BCLConvert_Data täpsustatud ID-dega.

DRAGEN-i RNA konveieri nõuded

Järgnevad on saadaolevad suvandi [DragenRNA_Settings] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
SoftwareVersion (Tarkvara versioon)	Jah	Praegune DRAGEN-i tarkvara versioon, mis on süsteemi installitud. Kasutage kõiki kolme täisarvu, mis sisalduvad versiooninimes. Näiteks 3.5.7. Tarkvara versioon peab kattuma versiooniga, mis on täpsustatud jaotises BCLConvert Settings.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
ReferenceGenomeDir	Jah	Referentsgenoomi nimi. Näiteks hg38_noalt_with_decoy. Kasutage referentsgenoomi nime, mis asub teel /usr/local/illumina/genomes. Kohandatud referentsgenoomi kasutamiseks vaadake jaotist <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> .
RnaGeneAnnotationFile	Ei	Fail, mis sisaldab RNA geeniannotatsioone. Ainult tähtnumbrilised märgid on lubatud. Kui seda ei esitata, kasutatakse täpsustatud referentsgenoomis sisalduvat vaikumisi valitavat annotatsioonifaili.
MapAlignOutFormat	Ei	Väljundfaili vormindamine. Lubatud väärtused on bam või cram. Kui ühtegi väärtust ei täpsustatud, on see vaikumisi Puudub.
KeepFastq	Ei	FASTQ väljundfailide salvestamiseks sisestage väärtus <code>true</code> (õige). FASTQ väljundfailide eemaldamiseks sisestage väärtus <code>false</code> (vale).
DifferentialExpressionEnable	Ei	Diferentsiaalse geeniekspressiooni lubamiseks sisestage väärtus <code>true</code> (õige). Sisestage väärtus <code>false</code> (vale), et eemaldada analüüsist diferentsiaalne geeniekspressioon.

Järgnevad on saadavaolevad suvandi [DragenRna_Data] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
Sample_ID	Jah	Proovi ID. Proovi ID võib sisaldada kuni 20 tähtnumbrilist tärki. ID on tõstutundlik. Eraldage iga identifikaator kriipsuga. Näiteks: Sample1-DQB1-022515. Proovi ID-d peavad kattuma jaotises BCLConvert_Data täpsustatud ID-dega.
Võrdlus<N>	Ei	Kontroll- või võrdlusväärtus iga proovi jaoks. Kui mitte ühtegi proovi kontroll- või võrdlusväärtust ei ole, määratakse proovi väärtuseks <code>na</code> . Kõiki kontrolliga märgistatud proove võrreldakse kõikide võrdlustega märgistatud proovidega. Väärtus <code>N</code> peegeldab proovide võrdlusgruppi.

DRAGEN-i rikastamise konveieri nõuded

Järgnevad on saadaolevad suvandi [DragenEnrichment_Settings] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
SoftwareVersion (Tarkvara versioon)	Jah	Praegune DRAGEN-i tarkvara versioon, mis on süsteemi installitud. Kasutage kõiki kolme täisarvu, mis sisalduvad versiooninimes. Näiteks 3.5.7. Tarkvara versioon peab kattuma versiooniga, mis on täpsustatud jaotises BCLConvert Settings.
ReferenceGenomeDir	Jah	Referentsgenoomi nimi. Näiteks hg38_alt_aware. Kasutage referentsgenoomi nime, mis asub teel /usr/local/illumina/genomes. Kohandatud referentsgenoomi kasutamiseks vaadake jaotist <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> .
BedFile	Jah	BED-fail, mis sisaldab sihitavaid regioone.
GermlineOrSomatic	Jah	Rikastusega geenirea analüüsi tegemiseks sisestage väärtus <code>germline</code> (idutee). Rikastusega somaatilise analüüsi tegemiseks sisestage väärtus <code>somatic</code> (somaatiline).
KeepFastq	Ei	FASTQ väljundfailide salvestamiseks sisestage väärtus <code>true</code> (õige). FASTQ väljundfailide eemaldamiseks sisestage väärtus <code>false</code> (vale).
MapAlignOutFormat	Ei	Väljundfaili vormindamine. Lubatud väärtused on bam või cram. Kui ühtegi väärtust ei täpsustatud, on see vaikimisi Puudub.
AuxNoiseBaselineFile	Ei	Müra alusjoone faili nimi. Saate kasutada failivorminguid *.txt või *.gz. Müra alusjoone failid on saadaval ainult siis, kui kasutate somaatilist režiimi. Lisateabe saamiseks vt jaotist Müra alusjoone failide importimine leheküljel 17 .

Järgnevad on saadaolevad suvandi [DragenEnrichment_Data] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
Sample_ID	Jah	Proovi ID. Proovi ID võib sisaldada kuni 20 tähtnumbrilist tärki. ID on tõstutundlik. Eraldage iga identifikaator kriipsuga. Näiteks 1-DQB1-022515. Proovi ID-d peavad kattuma BCLConvert_Data jaotises täpsustatud ID-dega.

DRAGEN-i DNA konveieri nõuded

Järgnevad on saadaolevad suvandi [DragenAmplicon_Settings] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
SoftwareVersion (Tarkvara versioon)	Jah	Praegune DRAGEN-i tarkvara versioon, mis on süsteemi installitud. Kasutage kõiki kolme täisarvu, mis sisalduvad versiooninimes. Näiteks 3.5.7. Tarkvara versioon peab kattuma versiooniga, mis on täpsustatud jaotises BCLConvert Settings.
ReferenceGenomeDir	Jah	Referentsgenoomi nimi. Näiteks hg38_alt_aware. Kasutage referentsgenoomi nime, mis asub teel /usr/local/illumina/genomes. Kohandatud referentsgenoomi kasutamiseks vaadake jaotist <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i> .
DnaBedFile	Jah	BED-fail, mis sisaldab sihitavaid regioone. BED-faili saab sisestada vormingus *.txt või *.gz.
DnaGermlineOrSomatic	Jah	DNA ampliconi geenirea analüüsi tegemiseks sisestage väärtus <code>germline</code> (geenirida). DNA ampliconi somaatilise analüüsi tegemiseks sisestage väärtus <code>somatic</code> (somaatiline).
KeepFastq	Ei	FASTQ väljundfailide salvestamiseks sisestage väärtus <code>true</code> (õige). FASTQ väljundfailide eemaldamiseks sisestage väärtus <code>false</code> (vale).
MapAlignOutFormat	Ei	Väljundfaili vormindamine. Lubatud väärtused on <code>bam</code> või <code>cram</code> . Kui ühtegi väärtust ei täpsustatud, on see vaikimisi Puudub.

Järgnevad on saadaolevad suvandi [DragenAmplicon_Data] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
Sample_ID	Jah	Proovi ID. Proovi ID võib sisaldada kuni 20 tähtnumbrilist tärki. ID on tõstutundlik. Eraldage iga identifikaator kriipsuga. Näiteks 1-DQB1-022515. Proovi ID-d peavad kattuma BCLConvert_Data jaotises täpsustatud ID-dega.
DnaOrRna	Jah	Teostatav amplikoni analüüsi tüüp. DRAGEN v3.8 korral on toetatud ainult DNA analüüs. Sisestage dna.

DRAGEN-i üksikraku RNA konveieri nõuded

Järgnevad on saadaolevad suvandi [DragenSingleCellRNA_Settings] väljad ja kirjeldused. Kolmanda osapoole komplekti sobivuse kohta teabe saamiseks vaadake lehte DRAGEN-i Bio-IT Platform Product Compatibility support.

Üksikraku teegikomplekt 1–5

Järgnevad proovilehe sätted kehtivad teekide ettevalmistuskomplektidele, millel on sama geneetiline struktuur kui DRAGEN-i üksikraku teegikomplektidel 1–5. Oma komplekti geneetilise struktuuri kontrollimiseks kasutage DRAGEN-i Bio-IT Platform Product Compatibility toelehte.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
SoftwareVersion (Tarkvara versioon)	Jah	<p>Praegune DRAGEN-i tarkvara versioon, mis on süsteemi installitud. Kasutage kõiki kolme täisarvu, mis on sisalduvad versiooninimes. Näiteks 3.5.7.</p> <p>Tarkvara versioon peab kattuma versiooniga, mis on täpsustatud jaotises BCLConvert Settings.</p>
ReferenceGenomeDir	Jah	<p>Referentsgenoomi nimi. Näiteks hg38_alt_aware. Kasutage referentsgenoomi nime, mis asub teel /usr/local/illumina/genomes. Selleks et kasutada kohandatud referentsgenoomi, vaadake jaotist <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i>.</p>
RnaLibraryType	Ei	<p>Sisestage üks järgmistest väärtustest.</p> <ul style="list-style-type: none"> • SF – pärisuunaline ahel. SF on vaikeväärtus. • SR – pöördsuunaline ahel. • U – ahelata.
RnaGeneAnnotationFile	Ei	<p>Fail, mis sisaldab RNA geeniannotatsioone. Ainult tähtnumbrilised märgid on lubatud. Kui seda ei esitata, kasutatakse täpsustatud referentsgenoomis sisalduvat vaikimisi valitavat annotatsioonifaili.</p>
BarcodeRead	Ei	<p>Asukoht sekveneerimise käituse vöökoodi lugemise sees, mis sisaldab nii vöötkoodi kui ka UMI-d. Väärtused võivad sisaldada lugemit1 või lugemit2. Vaikeväärtus on lugem1.</p>
BarcodePosition	Jah	<p>Aluste asukoht, mis vastab vöötkoodile väärtuses, mis sisestati väljale BarcodeRead. Aluste positsioonid on indekseeritud, alustades nullpositsioonist. Sisestage vöötkoodi väärtus järgmises vormingus:</p> <pre>0_<barcode end position></pre> <p>Näiteks, kui vöötkood sisaldab 16 alust, on väärtus 0_15.</p>

Väli	Nõutud	Kirjeldus
UmiPosition	Jah	Aluste asukoht, mis vastavad UMI-le väärtuses, mis sisestati väljale BarcodeRead. Sisestage suvandi UmiPosition väärtus järgmises vormingus: <UMI start position>_<UMI end position> Näiteks kui UMI sisaldab 10 alust ja vöökood sisaldab 16, on väärtuseks 16_25.
BarcodeSequenceWhitelist	Ei	Failinimi, mis sisaldab kaasatavaid vöökoodi järjestusi. Faili nimi võib sisaldada ainult tähtnumbrilisi märke, sidekriipse, allkriipse ja punkte.
KeepFastq	Ei	FASTQ väljundfailide salvestamiseks sisestage väärtus <code>true</code> (õige). FASTQ väljundfailide eemaldamiseks sisestage väärtus <code>false</code> (vale).
MapAlignOutFormat	Ei	Väljundfaili vormindamine. Lubatud väärtused on <code>bam</code> või <code>cram</code> . Kui ühtegi väärtust ei täpsustatud, on see vaikimisi Puudub.

Järgnevad on saadavaolevad suvandi [DragenSingleCellRNA_Data] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
Sample_ID	Jah	Proovi ID. Proovi ID võib sisaldada kuni 20 tähtnumbrilist tärki. ID on tõstutundlik. Eraldage iga identifikaator kriipsuga. Näiteks 1-DQB1-022515. Proovi ID-d peavad kattuma BCLConvert_Data jaotises täpsustatud ID-dega.

Üksikraku teegikomplekt 6

Järgnevad proovilehe sätted kehtivad teegi ettevalmistuskomplektidele, millel on sama geneetiline struktuur DRAGEN-i üksikraku teegi komplektiga nr 6. Oma komplekti geneetilise struktuuri kinnitamiseks kasutage DRAGEN-i Bio-IT Platform Product Compality toelehte.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
Tarkvara versioon	Jah	<p>Praegune DRAGEN-i tarkvara versioon, mis on süsteemi installitud. Kasutage kõiki kolme täisarvu, mis sisalduvad versiooninimes. Näiteks 3.5.7.</p> <p>Tarkvara versioon peab kattuma versiooniga, mis on täpsustatud jaotises BCLConvert Settings.</p>
ReferenceGenomeDir	Jah	<p>Referentsgenoomi nimi. Näiteks hg38_alt_aware. Kasutage referentsgenoomi nime, mis asub teel <code>/usr/local/illumina/genomes</code>. Kohandatud referentsgenoomi kasutamiseks vaadake jaotist <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 App Online Help</i>.</p>
RnaLibraryType	Ei	<p>Sisestage üks järgmistest väärtustest.</p> <ul style="list-style-type: none"> • SF – pärisuunaline ahel. • SR – pöördsuunaline ahel. • U – ahelata.
RnaGeneAnnotationFile	Ei	<p>Fail, mis sisaldab RNA geeniannotatsioone. Ainult tähtnumbrilised märgid on lubatud. Kui seda ei esitata, kasutatakse täpsustatud referentsgenoomis sisalduvat vaikimisi valitavat annotatsioonifaili.</p>
BarcodeRead	Ei	<p>Asukoht sekveneerimise käituse vöökoodi lugemise sees, mis sisaldab nii vöötkoodi kui ka UMI-d. Väärtused võivad sisaldada <code>lugemit1</code> või <code>lugemit2</code>. Vaikeväärtus on <code>lugem1</code>.</p>

Väli	Nõutud	Kirjeldus
BarcodePosition	Jah	<p>Aluste asukoht, mis vastab vöotkoodile väärtuses, mis sisestati väljale BarcodeRead. Aluste positsioonid on indekseeritud, alustades nullpositsioonist. Sisestage vöotkoodi väärtus järgmises vormingus:</p> <pre>0_<first barcode end position>+<second barcode start position>_<second barcode end position>+<third barcode start position>_<third barcode end position></pre> <p>Näiteks järgmine struktuur võrduks väärtusega 0_8+21_29+43_51:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 9 alust esimeses vöotkoodis (0_8). • 12 alust esimese ja teise vöotkoodi vahel. • 9 alust teises vöotkoodis (21_29). • 13 alust teise ja kolmanda vöotkoodi vahel. • 9 alust kolmandas vöotkoodis (43_51).
UmiPosition	Jah	<p>Aluste asukoht, mis vastavad UMI-le täpsustatud väärtuses BarCodeRead. Sisestage string järgmises vormingus:</p> <pre><UMI start position>_<UMI end position></pre> <p>Näiteks, kui UMI sisaldab alust ja aluste arv enne UMI-d on kokku 51, on väärtus 52_59.</p>
BarcodeSequenceWhitelist	Ei	<p>Failinimi, mis sisaldab lubatavaid vöotkoodi järjestusi (nn valge nimekiri). Faili nimi võib sisaldada ainult tähtnumbrilisi märke, sidekriipse, allkriipse ja punkte.</p>
KeepFastq	Ei	<p>FASTQ väljundfailide salvestamiseks sisestage väärtus <code>true</code> (õige). FASTQ väljundfailid eemaldamiseks sisestage väärtus <code>false</code> (vale).</p>
MapAlignOutFormat	Ei	<p>Väljundfaili vormindamine. Lubatud väärtused on <code>bam</code> või <code>cram</code>. Kui ühtegi väärtust ei täpsustatud, on see vaikimisi Puudub.</p>

Järgnevad on saadavaolevad suvandi [DragenSingleCellRNA_Data] väljad ja kirjeldused.

Väli	Nõutud	Kirjeldus
Sample_ID	Jah	Proovi ID. Proovi ID võib sisaldada kuni 20 tähtnumbrilist tärki. ID on tõstutundlik. Eraldage iga identifikaator kriipsuga. Näiteks 1-DQB1-022515. Proovi ID-d peavad kattuma BCLConvert_Data jaotises täpsustatud ID-dega.

Tumeda tsükli sekvenerimine

See jaotis kirjeldab, kuidas kasutada mooduses tumeda tsükli sekveerimist.

Tumeda tsükli sekveerimist kasutatakse ainult keemiasammude lõpetamiseks sekveerimistsükli. Kontrollige sobivate toodete loendit oma teekide ettevalmistuskomplekti puhul [Illumina toe veebilehelt](#), et näha, kas tumeda tsükli sekvenerimine on nõutud.

Järgige järgmiseid samme tumeda tsükli sekveerimiseks.

Moodusefaili kohandamine

- Laadige [Illumina toe veebilehelt](#) alla mooduse XML-fail.
- Kohandage XML-i moodusefaili.
 - Tuvastage sobiv protokoll jaotis, mis põhineb teie lugemise ja indeksi sekvenerimise konfiguratsioonil. Iga kohandatud mooduse kohta saab kohandada saab kuut erinevat võimalikku protokollit. Näiteks protokoll üksiku 1. lugemise jaoks ilma indeksi sekvenerimise konfiguratsioonita oleks `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
 - Sisestage enne `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` ja `<ReadRef ReadName="Read 2"/>` järgmine tumeda tsükli samm järgmisele reale. `<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />`.
 - Sisestage iga nõutud tumeda tsükli jaoks uuele reale tumeda tsükli samm.
- Salvestage mooduse XML-fail.

Järgnev on näidismoodus tumeda tsükliga.

```
6<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" />
  ...
```

Lisage moodus käitusele

1. Käituse häälestamiseks juhtimistarkvaras valige kohandatud mooduste alt käsk **Choose** (Vali).
2. Liikuge uuendatud mooduse XML-faili juurde.
3. Valige **Open** (Ava).
4. Naaske valikusse Initiating a Sequencing Run ([Sekveneerimiskäituse alustamine leheküljel 45](#)).

Register

%

%PF 57

A

abi, tehniline 104
aegumiskuupäevad 76
alkoholiga lapid 27
aluse nimetamisfailid 53
aluse nimetuse failid 59
aluste nimetamine 5
aluste nimetusfailid 8
analüüs
 meetodid 5, 8
andmete kvaliteet 57
arvuti nimi 5
arvutusmootor 53
automaatvärskendused 72

B

BaseSpace Sequence Hub 1
 dokumentatsioon 13
 sätted 13
BCL-failid 6
bcl2fastq 53

C

CBCL-failid 57
CE 53

D

D-ketas 72
denatureerimine 8
dokumendid 104
domeenid 13

E

Enterprise'i tellimus 13
eradomeen 13
esmakordne häälestus 82
esmakordne seadistamine 76
Etherneti kaabel 4
Etherneti port 4

F

faasimine ja eelfaasimine 55
FASTQ teisendus 53
filtrifailid 53, 59

G

garantii 27

H

helisätted, heli sätted 19
hiir 4
hoiatused 6, 80
hosti asukoht 13
hüüdnimi 20

I

ikoonid 6
Illumina proaktiivne tugi 13
imipadjad 27
indeks
 tsükliid 30
intensiivsuse väärtused 55
internetiühendus 13
InterOp-failid 53, 59
IP-aadress 5

J

jõudlusandmed 13

K

- kaamerad 54
- kadunud ühendused 80
- kahekanaline sekveneerimine 56
- käituse häälestamine
 - näited 30
- käituse kaust 72
- käituse olek 6
- käituse suurus 72
- käitused
 - möödikud 53
- käitusparameetrid
 - redigeerimine 48
- käitusparameetrite redigeerimine 48
- käituste arv 5
- käituste kustutamine 6, 72
- käsitsi tarkvaravärskendused 72
- kassett
 - laadimise suund 49
- katalooginumbrid 26
- kettaruum 6, 72
- klatri asukohad 59
- klatri intensiivsused 55
- klatri asukohad 53
- klatri filtreerimine 57
- klaviatuurid 4
- klienditugi 104
- kohalik analüüs 1
- komplektid 26
 - katalooginumbrid 27
- kõvaketas 6, 72
- kujutise hõivamine 53-54
- kujutised 53
- külmiku spetsifikatsioonid 27
- kulutarvikud
 - jälgimine 1
 - skannimine 49
- kulutarvikute jälgimine 1
- kulutarvikute sektsioon 2
- kvaliteedi tabel 58

L

- läbipääsufilter (PF) 57
- lähtestamine 81
 - ebaõnnestumine 80
- liigutamine 4
- lisatsükliid 30
- Local Run Manager 5
- logifailid 54
- lugemispikkused 30
- lugemistsükliid 30
- lüüti 4, 80
- luugid
 - sulgemine 49

M

- malli genereerimine 55
- märguanded 72
- meetodid 72
- monitor 2
- mooduselõigud 5

N

- nanosüvendid 55-56
- NextSeq 1000/2000 reaktiivid 26
- nimetamine
 - arvuti nimi 5
 - seadme nimi 19-20

O

- õhufiltrid
 - asukoht 76
 - varuosad 27
- olekuriba 2
- operatsioonisüsteem 81

P

- paani nummerdamine 54
- paanid 53

paaristulemus 48
PhiX 27
 joondamine 53
PhiX Control ver 3 26
Phredi algorütm 58
pildi analüüs 5
pilvepõhine analüüs 1
pinna nummerdamine 54
pisipildid 59
Process Management 72
proovikomplekt 27
puhtuse filter 57
punane kanal 56
puuduvad nimetused 55-56

Q

Q-skoor 57-58

R

read 54
registreerimise nurjumised 55
Resuspensioonipuhver 26
roheline kanal 56
RSB 26
RunInfo.xml 59

S

seadme jõudlusandmed 13
seerianumber 5
sekveneerimisanalüüsi vaatur 53
Sekveneerimisanalüüsi vaatur 55
serveri asukoht 13
sügavkülmiku spetsifikatsioonid 27
süsteemi kontrollid 78
System Suite'i installer 72

T

taaskäivitamine 78
tarkvara
 installimine 72

värskendamise teated 21
 versioonialandus, taaskäivitamine 82
tarkvara installimine 72
tarkvara versioonialandus 82
tarkvarakomplekt 1
tarkvarapakett 5
teegid
 denatureerimine 8
teekide lahjendamine 8
tehase vaikesätted 82
tehniline abi 104
tehniliste andmetega ühtlustamine 80
tilkumisalus
 imipadjad 27
toelehed 72
toitejuhe 4
toitenupp 2, 80
tsüklinumbrid 30

U

üksiklugemine 48
UNC-teed, kaardistatud draivid 48
Universal Copy Service 5, 72
USB-pordid 4

V

vaalud 54
vahelduvvoolutoide
 sisend 4
vaikimisi väljundkaust 48
valged paberid 58
valgendilapid 27
valgusriba 2
väljalülitamine 80
väljundkaust 48, 72
varuosad 76
vead 6, 80
 teated 78
 tõenäosus 57-58
vealogid 54
ventilaatorid 76

võimendus 8

W

Windows

sisselogimine 81

Tehniline tugi

Tehnilise abi saamiseks pöörduge Illumina tehnilise toe poole.

Veebisait: www.illumina.com
E-post: techsupport@illumina.com

Illumina tehnilise toe telefoninumbrid

Piirkond	Tasuta	Rahvusvaheline
Ameerika Ühendriigid	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Austraalia	+61 1800 775 688	
Austria	+43 800 006249	+43 1 9286540
Belgia	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
Filipiinid	+63 1800 1651 0798	
Hiina		+86 400 066 5835
Hispaania	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Holland	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Hongkong, Hiina	+852 800 960 230	
Iirimaa	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
India	+91 800 6500 375	
Indoneesia		00 7803 651 0048
Itaalia	+39 800 985513	+39 236 003 759
Jaapan	+81 0800 111 5011	
Kanada	+1 800 809 4566	
Lõuna-Korea	+82 80 234 5300	
Malaisia	+60 1800 80 6789	
Norra	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Prantsusmaa	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Rootsi	+46 2 0088 3979	+46 8 5061 9671
Saksamaa	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Singapur	1 800 5792 745	

Piirkond	Tasuta	Rahvusvaheline
Soome	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
Šveits	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Taani	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
Tai	+66 1800 011 304	
Taiwan, Hiina	+886 8 0665 1752	
Uus-Meremaa	+64 800 451 650	
Vietnam	+84 1206 5263	
Ühendkuningriik	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197

Ohutuse andmelehed (SDS-id): saadaval Illumina veebisaidil support.illumina.com/sds.html.

Toote dokumendid: allalaaditavad veebisaidilt support.illumina.com.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 USA

+ 1 800 809 ILMN (4566)

+1 85 8202 4566 (väljaspool Põhja-Ameerikat)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Kasutamiseks ainult teadusuuringutes. Mitte kasutada diagnostilistes menetlustes.

© 2021 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

illumina[®]