

# NextSeq 1000 ja 2000

## Sekvenaattorin ohje

Tämä asiakirja ja sen sisältö ovat Illumina, Inc:n ja sen tytäryhtiöiden ("Illumina") omaisuutta, ja ne on tarkoitettu ainoastaan Illuminan asiakkaiden sopimukseenmukaiseen käyttöön tässä kuvattujen tuotteiden käyttöön liittyen eikä mihinkään muuhun tarkoitukseen. Tätä asiakirjaa ja sen sisältöä ei saa käyttää tai jakaa missään muussa tarkoituksessa ja/tai välittää, paljastaa tai jäljentää millään muulla tavoin ilman Illuminalta ennakkoon saatua kirjallista lupaa. Illumina ei tällä asiakirjalla luovuta mitään käyttöoikeuksia sen patentti-, tavaramerkki-, tekijänoikeus- tai tapaoikeuksien nojalla eikä vastaavien kolmansien osapuolten oikeuksien nojalla.

Tässä kuvattuja tuotteita saa käyttää vain pätevä ja asianmukaisesti koulutettu henkilökunta noudattamalla täsmällisesti tässä asiakirjassa annettuja ohjeita, jotta tuotteiden asianmukainen ja turvallinen käyttö voidaan taata. Asiakirjan sisältö on luettava ja ymmärrettävä kokonaisuudessaan ennen näiden tuotteiden käyttöä.

MIKÄLI TÄSSÄ ANNETTUJA OHJEITA EI LUETA JA TÄSMÄLLISESTI NOUDATETA, SEURAUKSENA VOI OLLA TUOTTEIDEN VAURIOITUMINEN, HENKILÖVAHINKOJA JOKO KÄYTTÄJILLE TAI MUILLE JA MUITA OMAISUUSVAHINKOJA, MINKÄ LISÄKSI TUOTTEITA MAHDOLLISESTI KOSKEVAT TAKUUT MITÄTÖITYVÄT.

ILLUMINA EI OLE VASTUUSSA TÄSSÄ KUVATTUJEN TUOTTEIDEN VÄÄRINKÄYTÖSTÄ (MUKAAN LUKIEN TUOTTEEN OSAT JA OHJELMISTO).

© 2021 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

Kaikki tavaramerkit ovat Illumina, Inc:n tai niiden vastaavien omistajien omaisuutta. Tarkemmat tavaramerkkitiedot annetaan osoitteessa [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

# Versiohistoria

Asiakirjanumero	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
1000000109376 v04	Huhtikuu 2021	Lisätty ohjeet lähtötasotiedostojen tuontiin. Lisätty DRAGEN DNA Amplicon -työnkulku. Lisätty ominaisuuksia NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistoversioon v1.3. Lisätty tietoja välityspalvelimen valintaan. Päivitetty RSB Tween 20 -lähetyksellä ja säilytyslämpötilalla. Päivitetty DRAGEN RNA -työnkulku lisäämällä differentiaalinen geenin ilmentymä. Päivitetty sekvensoinnin tulostuskansion rakenne. Päivitetty näytetiedoston v2 formatointisuositukset.
1000000109376 v03	Marraskuu 2020	Korjatut luettelonumerot. Lisätty uusien käyttäjien lisäämistä koskevat tiedot.

Asiakirjanumero	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
1000000109376 v02	Lokakuu 2020	Lisätty NextSeq 1000/2000 P3 -reagenssisarja. Lisätty DRAGEN yksisolu-RNA-työnkulku. Lisätty DRAGEN-rikastustyönkulku. Lisätty FASTQ-kompressiovaihtoehdot. Lisätty ohjeet DRAGEN-jakson ja käyttöoikeuspäivitysten asennukseen. Lisätty ohjeet mukautettujen viitegenomien tuontiin. Päivitetty kirjastotyyppien lataustilavuus ja pitoisuudet. Päivitetty kirjaston laimennusohjeet. Lisätty ohjeet reagenssikasetin automaattiseen tyhjennykseen. Päivitetty jaksojen tukimäärää koskevat tiedot. Päivitetty instrumentin mukautusvaihtoehdot. Päivitetty laiteajon asettamisohjeet. Päivitetty DRAGEN-sekvensoinnin tulostusrakenne. Lisätty DRAGEN QC -raportteja koskevat tiedot. Lisätty tiedot mukautettujen viitegenomien poistamisesta kiintolevyiltä. Lisätty järjestelmätarkistusten suorittamista koskevat tiedot. Päivitetyn näytetiedoston v2 asetukset.

Asiakirjanumero	Päivämäärä	Muutoksen kuvaus
1000000109376 v01	Kesäkuu 2020	<p>Päivitetty NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston ohjelmistokuvaukset. Selkiytetty eroa pilvi- ja hybriditilan sekä paikallisen tilan ja erillistilan välisiä eroja koko oppaassa. Päivitetty kasetin säilytystä ja sulatusta koskevia ohjeita. Päivitetty tuettua jaksomäärää koskevia tietoja. Päivitetty toissijaisen analyysin määrittämistä koskevat tiedot. Päivitetty reagenssisarjan luettelonumerot. Päivitetty sekvensointiprotokollan kaavio. Päivitetty ohjeet verkkoaseman määrittämiseksi oletusarvoiseksi tulostuskansioksi. Päivitetty tuettujen kirjastotyyppeiden taulukko. Lisätty ohjeet mukautetun viitegenomin tuontiin. Lisätty ohjeet ajon määrittämiseen mukautetulla indeksisarjalla ja mukautetulla kirjaston valmisteluserjalla. Päivitetty käyttäjätilejä ja salasanoja koskevia vaatimuksia. Lisätty DRAGEN-tulostuskansiorakenteen yksityiskohtia. Selkiytetty ohjeita käytettyjen reagenssien tyhjentämiseksi kasetista. Lisätty taustatietoja Q-taulukosta. Lisätty ohjeita ohjausohjelmistopäivitysten asentamisesta. Lisätty ohjeet ajon asettamiseksi uudelleen jonoon. Lisätty ohjeet DRAGEN-jaksojen ja käyttöoikeuden päivitykseen. Lisätty instrumentin mukautusohjeet. Päivitetty kuvitusta uusien merkintöjen esittämiseksi. Muutettu ovi visiiriksi koko oppaassa. Lisätty kahden Ethernet-portin kuvaus.</p>
1000000109376 v00	Maaliskuu 2020	Ensimmäinen versio.

# Sisällysluettelo

Järjestelmän yleiskatsaus .....	1
Muut apumateriaalit .....	1
Instrumentin laitteisto .....	3
Integroitu ohjelmisto .....	5
Prosessin hallinta .....	6
Sekvensointiprotokollan kaavio .....	8
Sekvensoinnin toiminta .....	8
Järjestelmän kokoonpano .....	11
Käyttäjätilin vaatimukset .....	11
BaseSpace Sequence Hubin määrittäminen ja ennakoiva tuki .....	13
Määritä oletusarvoisen tulostuskansion sijainti .....	15
Mukautettujen viitegenomien tuonti .....	18
Melun lähtötasotiedostojen luonti .....	18
Ajotilan määrittäminen .....	20
Laitteen mukauttaminen .....	21
Tarvikkeet ja laitteet .....	23
Sekvensointitarvikkeet .....	23
Lisäkulutustarvikkeet .....	27
Lisälaitteet .....	28
Protokolla .....	30
Sekvensointinäkökohdat .....	30
Sekvensointiajon suunnittelu BaseSpace Sequence Hubissa .....	31
Pussitetun kasetin ja virtauskyvetin sulattaminen .....	39
Kirjastojen laimennus .....	42
Tarvikkeiden lataaminen kasettiin .....	44
Sekvensointiajon alustaminen .....	46
Sekvensoinnin tulos .....	54
Real-Time Analysis -ohjelmiston yleiskatsaus .....	54
Real-Time Analysis -ohjelmiston työnkulku .....	56
Sekvensoinnin tuotostiedostot .....	60
DRAGENin toissijaisen analyysin tulostustiedostot .....	61
DRAGENin toissijaisen analyysin tulostuskansion rakenne .....	70
Huolto .....	74
Kiintolevyaseman levytilan tyhjentäminen .....	74
Ohjelmistopäivitykset .....	74
DRAGEN-työnkulku ja käyttöoikeuspäivitykset .....	76

Ilmansuodattimen vaihtaminen .....	77
Vianmääritys .....	79
Virheviestien ratkaiseminen .....	79
Tarvikkeiden palauttaminen varastoon .....	80
Ajon peruuttaminen .....	80
Ajon asettaminen uudelleen jonoon .....	81
Virran katkaiseminen laitteesta ja kytkeminen uudelleen laitteeseen .....	81
Järjestelmätarkistuksen suorittaminen .....	82
Tehdasasetusten palautus .....	83
Kaappaa asennettu kuva .....	83
Kuvakaappauksen palauttaminen .....	83
Resurssit ja viitteet .....	85
Näytetiedoston v2 asetukset .....	85
Pimeään jakson sekvensointi .....	99
Hakemisto .....	101
<b>Tekninen tuki .....</b>	<b>105</b>

# Järjestelmän yleiskatsaus

Illumina® NextSeq™ 1000- ja Illumina® NextSeq™ 2000 -sekvensointijärjestelmä tarjoaa kohdistetun lähestymistavan NGS:ään<sup>1</sup>. Tämä sovelluksiin keskittynyt järjestelmä pakkaa Illumina-sekvensointitekniikan kustannustehokkaaksi pöytälaitteeksi, jossa on seuraavat ominaisuudet.

- **Käytettävyys ja luotettavuus** — NextSeq 1000/2000:een kuuluu paikallinen DRAGEN-analyysi ja sisäänrakennettu denaturointi ja laimennus. Järjestelmässä on sisäänrakennettu kuvantamismoduuli, ja kulutustarvikkeessa on sisäänrakennettuja fluidistoriosia, jotka tekevät laitteen huollosta yksinkertaista.
- **Yksivaiheinen tarvikkeen lataus** – Kertakäyttöiseen kasettiin on esitötetty kaikki ajossa tarvittavat reagenssit. Kirjasto ja virtauskyvetti ladataan kasettiin, joka ladataan sitten laitteeseen. Sisältyvä tunnistusominaisuus tekee tarkan seurannan mahdolliseksi.
- **NextSeq 1000/2000 -ohjelmisto** – Integroitu ohjelmistopaketti ohjaa laitteen toimintoja, käsittelee kuvia ja luo emästen tunnistamisia.
  - **Pilvitila** — Suunnittele ajosi Instrument Run Setup (Laitteajon asettaminen) -toiminnolla BaseSpace Sequence Hubissa. Valittu analyysityönkulku alustetaan automaattisesti pilvessä. Aiotiedot ja analyysitulokset ilmoitetaan myös pilvessä.
  - **Hybriditila** — Suunnittele ajosi Instrument Run Setup (Laitteajon asettaminen) -toiminnolla BaseSpace Sequence Hubissa. Valittu analyysityönkulku alustetaan sen jälkeen instrumentin DRAGENin välityksellä.
  - **Paikallinen tila** — Suunnittele ajosi näytetiedoston v2-tiedostomuodolla paikallisesti. Valittu analyysityönkulku alustetaan automaattisesti instrumentin DRAGENilla.
  - **Erillistila** — Suunnittele ajo ilman näytetiedostoa.

Tässä osiossa annetaan yleiskatsaus järjestelmästä, muun muassa laitteistoa, ohjelmistoa ja tietoanalyysia koskevat tiedot. Siihen on myös koottu keskeisiä käsitteitä ja terminologiaa, jota käytetään asiakirjoissa kaikkialla. Katso yksityiskohtaiset tiedot, tietolomakkeet, sovellukset ja aiheeseen liittyvät tuotteet [NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmän tuotesivulta](#) Illumina-verkkosivustolla.

## Muut apumateriaalit

Lisää järjestelmiä koskevia apumateriaaleja on Illuminan verkkosivuston [NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmien tukisivuilla](#). Materiaalit sisältävät ohjelmistoa, koulutusta ja yhteensopivia tuotteita käsittelevää dokumentaatiota ja seuraavat asiakirjat. Katso aina asiakirjojen uusimmat versiot tukisivuilta.

---

<sup>1</sup>seuraavan sukupolven sekvensointia

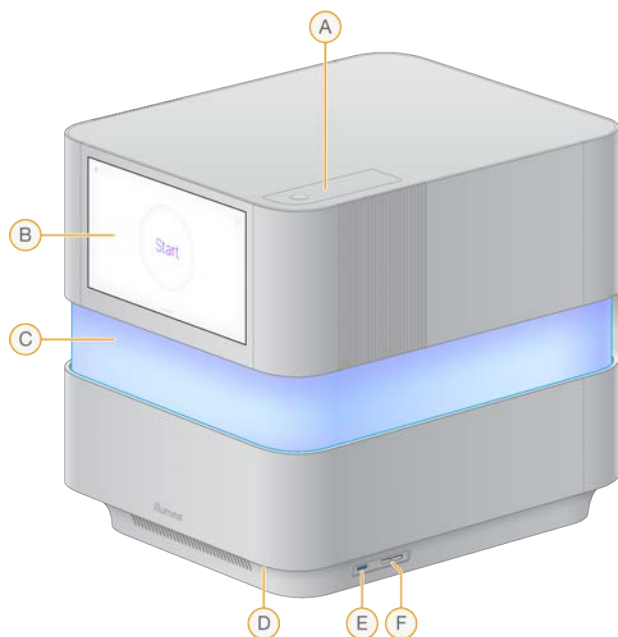


<b>Materiaali</b>	<b>Kuvaus</b>
<a href="#">Custom Protocol Selector (Yksilöllisen käytännön valitsin)</a>	Työkalu päästä päähän -ohjeiden luomiseen, joka on räätälöity kirjaston valmistamismenetelmän, ajoparametrien ja analyysimenetelmän mukaan, ja joka sisältää vaihtoehdot yksityisyyskohtaisuuden tason määrittämiseen.
<i>NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 - sekvensointijärjestelmän turvallisuus- ja vaatimustenmukaisuusohje (asiakirjanro 1000000111928)</i>	Sisältää tietoja toiminnallisista tietoturvakysymyksistä, vaatimustenmukaisuuslausekkeista ja laitteen tuotemerkinnöistä.
<i>RFID-lukijamoduulin vaatimustenmukaisuusohje (asiakirjanro 1000000002699)</i>	Sisältää tietoja laitteen RFID-lukijasta, vaatimustenmukaisuusilmoitukset ja turvallisuuskysymykset.
<i>NextSeq 1000:n ja 2000:n denaturointia ja laimentamista koskeva kirjaston ohje (asiakirjanro 1000000139235)</i>	Sisältää ohjeita valmistettujen kirjastojen manuaaliseen denaturointiin ja laimentamiseen sekvensointiajaoa varten sekä ohjeita valinnaisen PhiX-kontrollin valmisteluun.
<i>NextSeq 1000:n ja 2000:n mukautettujen alukkeiden ohje (asiakirjanro 1000000139569)</i>	Sisältää tietoja Illumina-sekvensointialukkeiden vaihtamisesta mukautettuihin sekvensointialukkeisiin.
<i>NextSeq 2000 - sekvensointijärjestelmän valmisteluohje (asiakirjanro 1000000109378)</i>	Sisältää teknisiä tietoja laboratoriotilasta, sähköasennuksia koskevista vaatimuksista ja ympäristö- ja verkkokysymyksistä.
<i>BaseSpace-ohje (help.basespace.illumina.com)</i>	Sisältää tietoja BaseSpace™ Sequence Hubin käytöstä ja saatavilla olevista analyysivaihtoehdoista.
<i>Indeksin sovittimien yhdistämisen opas (asiakirjanro 1000000041074)</i>	Sisältää yhdistämisen ohjeita ja toimintamalleja kaksoisindeksointiin.
<i>Illumina-sovitinsekvenssit (asiakirjanro 1000000002694)</i>	Sisältää luettelot Illuminan kirjaston valmistelusarjojen sovitinsekvensseistä.

## Instrumentin laitteisto

NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmissä on virtapainike, näyttö, tilapalkki, tarvikelokero ja USB-portit.

Kuva 1 Ulkoiset järjestelmän osat



- A. **Ilmansuodatinlokero** — Antaa pääsyn käsittelemään vaihdettavaa ilmansuodatinta.
- B. **Kosketusnäyttö** – Sallii määrittämisen ja instrumentissa tehtävän käyttöönoton ohjausohjelmistoliittymän avulla.
- C. **Tilapalkki** — Valon väri muuttuu sitä mukaa kuin järjestelmä siirtyy eteenpäin työnkulussa. Sinisellä ja violetilla viitataan vuorovaikutteisuuteen (esim. ajoa edeltävät tarkistukset) ja monivärisyydellä viitataan merkittäviin tapahtumiin ja tietoihin (esim. sekvensoinnin valmistuminen). Merkinä ratkaisevan tärkeistä virheistä on punainen valo.
- D. **Virtapainike** – Ohjaa laitteen virransyöttöä ja ilmaisee, onko järjestelmä päällä (hehkuu), pois päältä (pimeä) vai pois päältä mutta vaihtovirta on päällä (sykkii).
- E. **3.0 USB -portit** — Ulkoisen kannettavan aseman kytkentään tiedonsiirtoa varten.
- F. **2.0 USB -portit** — Hiiren ja näppäimistön kytkentään.

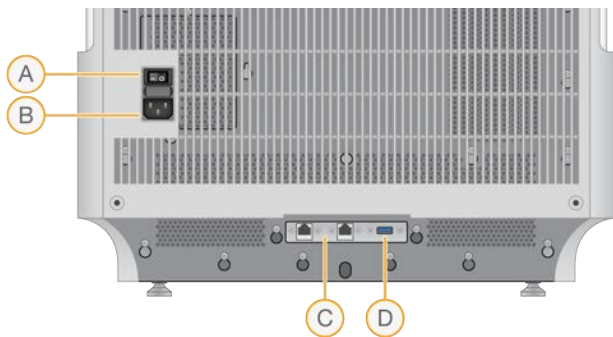
## Virta- ja apuliitännät

Voit varoen siirtää instrumenttia päästäksesi käsiksi virtakytkimeen, USB-porttiin ja muihin lisäliitännöihin instrumentin takana.

Laitteen takaosassa on kytkin ja tuloaukko, joka syöttää virtaa laitteelle, ja kaksi Ethernet-porttia valinnaista Ethernet-liitäntää varten. 3.0 USB-portti tarjoaa vaihtoehdon ulkoisen kannettavan aseman kytkentään tiedonsiirtoa varten (Linux-pohjaisella alustalla ei tueta exFATia).

NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmät on varustettu kahdella Ethernet-portilla järjestelmän kapasiteetin ja joustavuuden laajentamiseksi. Yksi Ethernet-portti voidaan esimerkiksi varata viestinnälle sisäisen verkkoaseman kanssa ja toinen ulkoiselle viestinnälle, kuten BaseSpace Sequence Hubille tai Proactive Support -tuelle.

Kuva 2 Takapaneelin osat

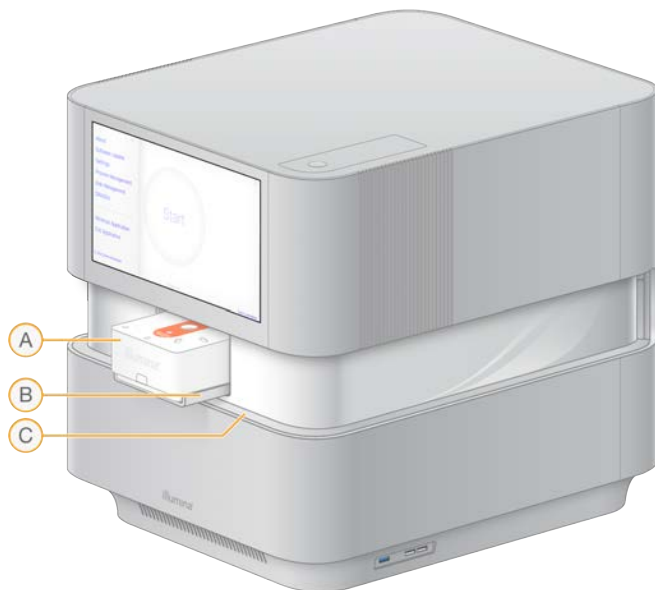


- A. **Vipukytkin** – Laitteen virran kytkemiseksi päälle ja pois päältä.
- B. **Virtaliitäntä** – Virtajohdon liitäntä.
- C. **Ethernet-portit (2)** – Valinnainen Ethernet-kaapeliliitäntä.
- D. **3.0 USB -portti** — Ulkoisen kiintoaseman kytkentään tiedonsiirtoa varten.

## Tarvikelokero

Tarvikelokerossa on kasetti, jossa on virtauskyvetti ja laimennettu kirjasto sekvenssiajtoa varten.

Kuva 3 Täytetty tarvikelokero



- A. **Kasetti** – Sisältää virtauskyvetin, kirjaston ja reagenssit ja kerää käytetyt reagenssit ajon aikana.
- B. **Alusta** – Pitää kasettia sekvensoinnin aikana.
- C. **Visiiri** – Aukeaa, jotta sen kautta päästään käsiksi tarvikelokeroon.

## Integroitu ohjelmisto

Järjestelmäohjelmistopaketti sisältää integroituja sovelluksia, jotka suorittavat sekvensointiajoja ja analyysia.

- **NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmisto** – Ohjaa laitteen toimintoja ja sisältää liittymän järjestelmän määrittämiseksi, sekvensointiajon käyttöönottamiseksi ja ajotilastojen valvomiseksi sekvensoinnin edistyessä.
- **Real-Time Analysis (RTA3)** – Suorittaa kuva-analyysin ja emäksen tunnistamisen ajon aikana. Lisätietoja annetaan kohdassa [Sekvensoinnin tulos sivulla 54](#).
- **Universal Copy Service** – Kopioi sekvensoinnin tulostustiedostot ajokansiosta BaseSpace Sequence Hubiin (soveltuvisissa tapauksissa) ja tulostuskansioon, josta saat ne käyttöösi.

Ohjausohjelmisto on vuorovaikutteinen ja ajaa automatisoituja taustaprosesseja. Real-Time Analysis ja Universal Copy Service suorittavat vain taustaprosesseja.

## Järjestelmätiedot

Valitsemalla ohjausohjelmiston valikon vasemmasta yläkulmasta voit avata About (Tietoja) -osion. About (Tietoja) -osiossa on Illuminan yhteystiedot ja seuraavat järjestelmätiedot:

- Laitteen sarjanumero
- Tietokone
- Järjestelmäpakettiversio
- Image OS -versio
- Ajojen määrä yhteensä

## Ilmoitukset ja hälytykset

Ilmoituskuvake sijaitsee oikeassa yläkulmassa. Kun annetaan varoitus tai ilmenee virhe, oikea paneeli liukuu ulos merkiksi ilmoituksista. Valitse milloin tahansa kuvake, jotta voit tarkastella Current (Nykyiset)- tai Historic (Historia) -ilmoituksia varoituksista ja virheistä.

- Varoituksiin on kiinnitettävä huomiota, mutta ne eivät pysäytä ajoa tai vaadi muuta toimenpidettä kuittausta lukuun ottamatta.
- Virheet edellyttävät toimenpiteitä ennen ajon käynnistämistä tai jatkamista.

## Ohjausohjelmiston ikkunan pienentäminen

Voit pienentää ohjausohjelmiston ikkunan, jotta voit käyttää muita sovelluksia. Näin voit esimerkiksi selata tulostuskansioon resurssienhallinnassa tai etsiä näytetiedoston.

1. Valitse ohjausohjelmiston valikosta **Minimize Application** (Pienennä sovellus). Ohjausohjelmiston ikkuna pienenee.
2. Voit maksimoida ohjausohjelmiston valitsemalla **NextSeq 1000/2000 Control Software (NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmisto)** työkalupalkista.

## Prosessinhallinta

Process Management (Prosessinahallinta) -näytöllä näytetään väliaikaisia ajoja, jotka tallennetaan kohtaan `/usr/local/illumina/runs`. Jokainen ajo tunnistetaan ajopäivämäärästä, nimestä ja tunnuksesta. Jokaisen ajon kohdalla näytetään myös Run (Ajo)-, Secondary Analysis (Toissijainen analyysi)-, Output Folder (Tulostuskansio)- ja Cloud (Pilvi) -tilojen kaltaiset tiedot. Valitsemalla voit tarkastella lisätietoja, muun muassa seuraavia: Workflow (Työnkulku), Average % Q30 (Keskimääräinen % Q30), Total Reads PF (PF-readit yhteensä) sekä Total Yield (Kokonaistuotos). Voit poistaa ajoja ja tyhjentää tilaa tutustumalla kohtaan [Kiintolevyaseman levytilan tyhjentäminen sivulla 74](#). Voit asettaa instrumenttianalyysin uudelleen jonoon tutustumalla kohtaan [Ajon asettaminen uudelleen jonoon sivulla 81](#).

## Ajon tila

Tässä osiossa näytetään sekvensointiajon tila:

- **In Progress (Käynnissä)** — Sekvensointiajo käynnissä.
- **Complete (Valmis)** — Sekvensointiajo on valmis.
- **Stopped (Keskeytetty)** — Sekvensointiajo keskeytettiin.
- **Errored (Virheellinen)** — Sekvensointiajossa on virhe.

## Toissijaisen analyysin tila

Tässä osiossa näytetään instrumentin toissijaisen DRAGEN-analyysin tila. Tässä kohdassa näytetään N/A, mikäli BaseSpace Sequence Hubissa on käynnissä analyysi.

- **Not Started (Ei käynnistetty)** — DRAGEN-analyysiä ei vielä ole käynnistetty.
- **In Progress (Käynnissä)** — DRAGEN-analyysi käynnissä.
- **Stopped (Keskeytetty)** — DRAGEN-analyysi on keskeytetty.
- **Errored (Virheellinen)** — DRAGEN-analyysissä on virhe.
- **Complete (Valmis)** — DRAGEN-analyysi on valmis.

## Tulostuskansion tila

Tässä osiossa näytetään tulostuskansioon kopioitavien tiedostojen tila:

- **In Progress (Käynnissä)** —Tiedostoja kopioidaan tulostuskansioon.
- **Complete (Valmis)** — Tiedostojen kopiointi tulostuskansioon onnistui.

## Pilven tila (BaseSpace Sequence Hub)

Osiossa näytetään BaseSpace Sequence Hubiin pilven kautta ladattavien tiedostojen tila:

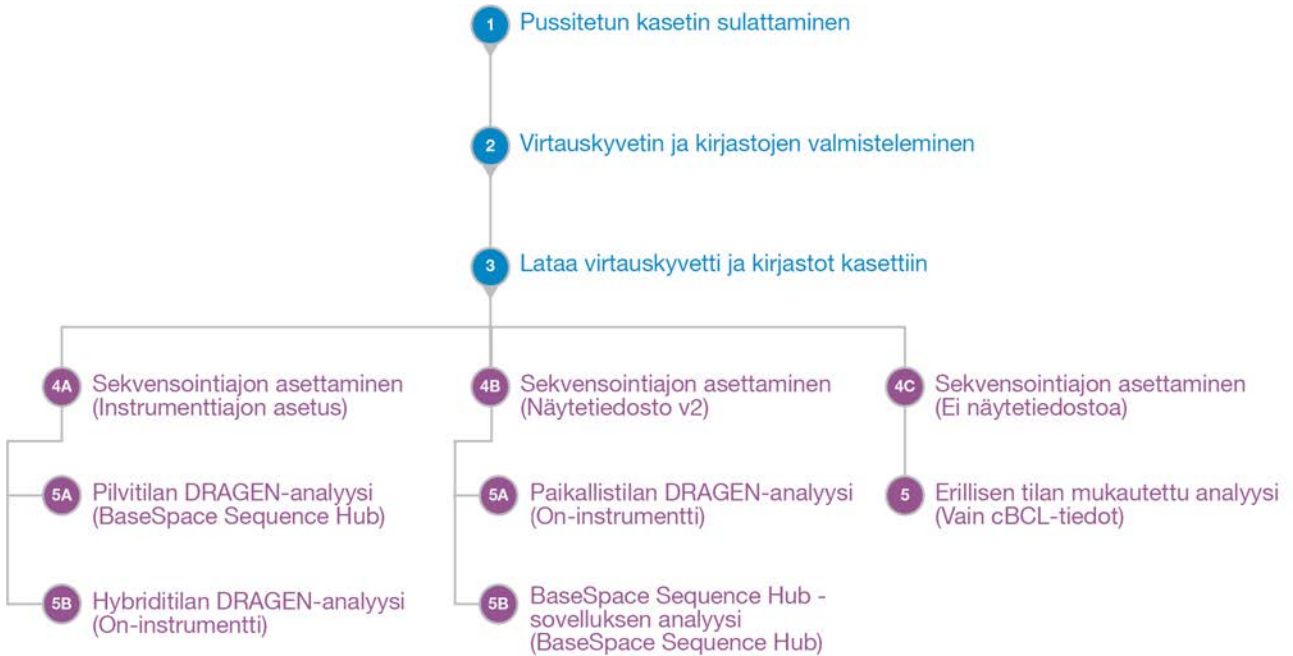
- **In Progress (Käynnissä)** – Ohjausohjelmisto lataa tiedostoja BaseSpace Sequence Hubiin.
- **Complete (Valmis)** – Tiedostojen lataus BaseSpace Sequence Hubiin onnistui.

## Tilaan liittyvän ongelman vianmääritys

- Jos ajo on käynnissä, sulje prosessinhallintaruutu, odota noin viisi minuuttia ja avaa se sitten uudelleen.
- Jos ajo ei ole käynnissä, katkaise laitteesta virta ja kytke se laitteeseen uudelleen ja avaa sitten Process Management (Prosessinhallinta) -näyttö. Katso [Virran katkaiseminen laitteesta ja kytkeminen uudelleen laitteeseen sivulla 81](#).

# Sekvensointiprotokollan kaavio

Seuraavassa kaaviossa esitetään NextSeq 1000/2000:n avulla suoritettava sekvensointiprotokolla.



## Sekvensoinnin toiminta

NextSeq 1000 and NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmissä sekvensointi sisältää klusterin luomisen, sekvensoinnin ja analyysin. Jokainen vaihe suoritetaan automaattisesti sekvensointiajon aikana. Järjestelmän kokoonpanosta riippuen lisäanalyysi suoritetaan laitteen ulkopuolella ajon suorittamisen jälkeen.

### Klusterin luonti

Kirjasto<sup>1</sup> denaturoidaan automaattisesti yksittäisiksi säikeiksi ja laimennetaan edelleen laitteessa. Klusterin luomisen aikana yksittäiset DNA-molekyylit ovat sitoutuneena virtauskyvetin pintaan ja niitä monistetaan klustereiden<sup>2</sup> muodostamista varten. Klusterin luominen kestää ~4 tuntia.

<sup>1</sup>DNA- tai RNA-näyte, jossa on adapterit sekvensointia varten. Valmistelumenetelmät vaihtelevat.

<sup>2</sup>Klooniryhmä DNA-säikeitä virtauskyvetissä, joka tuottaa yhden sekvenssi-readin. Jokainen virtauskyvetin DNA-säie seedaa mallin, jota monistetaan, kunnes klusteri koostuu sadoista tai tuhansista kopioista. Esimerkiksi 10 000 klusterin virtauskyvetti tuottaa 10 000 yksiosaista readia tai 20 000 pariliitettyä readia.

## Sekvensointi

Klusterit kuvataan kaksikanavaisella kemialla, yhdellä vihreällä kanavalla ja yhdellä sinisellä kanavalla neljän nukleotidin tietojen koodausta varten. Kun yksi virtauskyvetin ruutu on kuvattu, siirrytään kuvaamaan seuraava ruutu. Prosessi toistetaan jokaiselle sekvensointijaksolle (~5 minuuttia jaksoa kohti). Kuvien analysoinnin jälkeen Real-Time Analysis -ohjelmisto suorittaa emästen tunnistamisen<sup>1</sup>, suodatuksen ja laatupisteityksen.<sup>2</sup>

## Ensisijainen analyysi

Ohjausohjelmisto siirtää ajon etenemisen aikana emäksen tunnistamisen tiedostot<sup>3</sup> (\*.cbcl) määritettyyn tietanalyysin tulostuskansioon. Sekvensointiajon aikana Real-Time Analysis (RTA3) -ohjelmisto suorittaa kuva-analyysin, emästen tunnistamisen ja demultipleksointi-toiminnon<sup>4</sup>. Kun sekvensointi on päättynyt, toissijainen analyysi alkaa. Toissijaisen tietanalyysin menetelmä määräytyy sovelluksen ja järjestelmän kokoonpanon mukaan.

## Toissijainen analyysi

Sekvensoinnin työnkulku on integroitu BaseSpace Sequence Hubiin, joka on Illuminan pilvipalveluympäristö ajon valvontaa, tietanalyysia, tallentamista ja yhteistyötä varten. Se isännöi DRAGENia ja BaseSpace Sequence Hub -sovelluksia, jotka tukevat sekvensoinnin yleisiä analysointimenetelmiä.

Kun alustava sekvensointianalyysi on valmis, DRAGEN suorittaa toissijaisen analyysin yhdellä käytettävissä olevalla analyysijaksolla.

Mikäli käytetään pilvi- tai hybriditilaa, DRAGEN noutaa näytetiedoston, viitegenomin ja ajon syötetiedostot BaseSpace Sequence Hubin Instrument Run Setup (Laitteajon asetukset) -kohdasta. Pilvitilassa cBCL-tiedot ladataan automaattisesti BaseSpace Sequence Hubiin, ja BaseSpace Sequence Hub alustaa toissijaisen DRAGEN-analyysin. Hybriditilassa toissijainen DRAGEN-analyysi suoritetaan instrumentissa, ja tulostustiedostot voidaan tallentaa valittuun kansioon tai pilveen.

Mikäli käytetään paikallista tilaa, DRAGEN noutaa toimitetun näytetiedoston, viitegenomin ja ajon syötetiedostot NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmistä. Toissijainen DRAGEN-analyysi suoritetaan instrumentissa, ja tulostustiedostot voidaan tallentaa valittuun tulostuskansioon. Mikäli Proactive, Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) on valittu, analyysi voidaan myös alustaa BaseSpace Sequence Hub -sovelluksen kautta sekvensoinnin valmistuttua.

---

<sup>1</sup>Emäksen (A, C, G tai T) määrittäminen jokaiselle ruudun klusterille tietyssä syklissä.

<sup>2</sup>Laskee kullekin emäsmääritykselle laatuennustejoukon ja käyttää sitten ennustearvoa Q-pisteen etsimiseen.

<sup>3</sup>Sisältää kunkin sekvensointijakson jokaisen klusterin emäsmäärityksen ja siihen liittyvät laatupisteet.

<sup>4</sup>Analyysiprosessi, joka erottaa kunkin poolin kirjaston readit.



Jos käytetään erillistilaa, määritä ajo ilman näytetiedostoa. Tätä työkulkua suositellaan mukautetuille analyysityönkuluille, jotka alkavat cBCL-tiedoista.

- Lisätietoja BaseSpace Sequence Hubista on [BaseSpace Sequence Hub -verkko-ohjeessa](#).
- Lisätietoja DRAGENista on [DRAGEN Bio-IT Platform -tukisivulla](#).
- Katso yleiskatsaus kaikista sovelluksista kohdasta [BaseSpace-sovellukset](#).

# Järjestelmän kokoonpano

Tässä osiossa annetaan ohjeet järjestelmäasetusten määrittämiseksi, ohjelmistoasetusten kuvaukset mukaan lukien.

Näissä ohjeissa kuvataan pääasiassa ohjausohjelmistoa ja annetaan tietoja verkoston ja käyttöjärjestelmän määrittämisestä.

**i** Mikäli instrumentissa käytetään Google Chromea, sinua kehoitetaan vapauttamaan sisäänkirjautumisavaimenperä. Voit turvallisesti ohittaa ja peruuttaa kehotuksen.

## Käyttäjätilin vaatimukset

Linux-käyttöjärjestelmässä on kolme tiliä:

- päätoimija (super-järjestelmänvalvoja)
- ilmnadmin (järjestelmänvalvoja)
- ilmnuser (käyttäjä)

Järjestelmänvalvojan tili on tarkoitettu vain järjestelmäpäivitysten käyttöönottoon, esimerkiksi NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston päivittämiseen, tai IT -henkilöstön käyttöön pysyvän verkkoaseman asentamiseksi.

Suorita kaikki muut toiminnot, mukaan lukien sekvensointi, käyttäjätililtä.

### Salasana-vaatimukset

Kenttähuoltoteknikko alustaa salasanan vaihdon kaikilla kolmella tilillä instrumentin asennuksen päättämisen jälkeen. Päivitä molemmat salasanat 180 päivän välein kehotteen mukaan.

Taulukko 1 Oletusarvoiset salasana-käytännöt

Käytäntö	Asetus
Enforce password history (Pakota salasanan historia)	Five passwords remembered (Viiden salasanan muisti)
Lockout threshold (Uloskirjauskynnys)	Ten invalid logon attempts (Kymmenen väärää kirjautumisyritystä)
Minimum password length (Salasanan pituus vähintään)	Ten characters (Kymmenen merkkiä)

Käytäntö	Asetus
Minimum character variety (Merkkien vähimmäisvaihtoehdot)	Three each of: number, upper case letter, lower case letter, and symbol (Kolme kutakin: numero, suuraakkonen, pienaakkonen ja symboli)
Maximum repeating characters (Toistuvia merkkejä enintään)	Three characters (Kolme merkkiä)
Password must meet complexity requirements (Salasanan on täytettävä monimutkaisuusvaatimukset)	Disabled (Ei käytössä)
Store passwords using reversible encryption (Tallenna salasanat kääntösuuntaisen salauksen avulla)	Disabled (Ei käytössä)

## Add a New User (Lisää uusi käyttäjä)

- Kirjaudu kohteeseen ilmnadmin.
- Valitse virtapainike ja avaa sen jälkeen avattava ilmnadmin-valikko.
- Valitse **Account Settings** (Tilin asetukset).
- Valitse **Unlock** (Avaa lukitus) ja syötä sen jälkeen ilmnadmin-salasana.
- Valitse **Add User** (Lisää käyttäjä).
- Valitse Standard-tilityyppi ja syötä sen jälkeen uusi käyttäjätunnus.
- Valitse **Set password now** (Aseta salasana nyt) ja syötä sitten salasana.
- Valitse **Add** (Lisää).  
Uusi käyttäjä lisätään Users (Käyttäjät) -luetteloon.
- Myönnä käyttäjälle NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston käyttöoikeus seuraavasti.
  - Avaa pääte.
  - Syötä seuraavat tiedot:  
`$ sudo usermod -a -G ilmnusers <uusi käyttäjätunnus>`
  - Syötä kehotettaessa ilmnadmin-salasana.
- Voit vahvistaa käyttäjälupien onnistuneen määrityksen toimimalla seuraavasti.
  - Kirjaudu uudelle käyttäjätilille.
  - Navigoi NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistoon.
  - Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).
  - Varmista Default Output Folder (Oletusarvoinen tulostuskansio) -kohdassa, että voit valita ja tallentaa tulostuskansiopolun.  
Jos voit valita ja tallentaa tulostuskansiopolun virheittä, lupien määrittäminen onnistui.

## Salasanan nollaaminen

Tässä osiossa esitetään yksityiskohtaisesti ilmnuser-, ilmnadmin- tai pääsalasanan nollaus. Salasanan palautus ei ole saatavilla. Salasanan nollauksella ei voida ohittaa tililtä uloskirjausta liian monen virheellisen salasanan syöttöyrityksen jälkeen. Sinun on odotettava 10 minuuttia, ennen kuin voit nollata salasanasi tai yrittää sisäänkirjautumista.

### ilmnuser-salasanan nollaus

Voit nollata ilmnuser-salasanan, jos ilmnadmin- tai pääsalasana on tiedossasi.

1. Kirjaudu kohteeseen ilmnadmin.
2. Avaa pääte.
3. Syötä `sudo-salasana ilmnuser`.
4. Syötä kehotettaessa ilmnadmin-salasana.
5. Syötä kehotettaessa uusi ilmnuser-salasana.
6. Kirjoita kehotettaessa uusi ilmnuser-salasana, jotta voit vahvistaa uuden salasanan.

### ilmnadmin-salasanan nollaus

Voit nollata ilmnadmin-salasanan, jos pääsalasana on tiedossasi.

1. Kirjaudu pääkohtaan.
2. Avaa pääte.
3. Syöttämällä `ilmnadmin-salasanan` voit muuttaa `ilmadmin-salasanan` tai syöttää `ilmnuser-salasanan` muuttaaksesi `ilmnuser-salasanan`.
4. Syötä kehotettaessa uusi salasana.
5. Kirjoita kehotettaessa uusi salasana uuden salasanan vahvistamiseksi.

### Pääsalasanan nollaaminen

Voit nollata pääsalasanan suorittamalla yhden seuraavista vaihtoehdoista:

- Jos salasana on tiedossasi edellisen käyttöjärjestelmäkuvakaappauksen jäljiltä, suorita palautus kyseiseen tallennettuun kuvaan.
- Jos et muista salasanaa, ota yhteys Illuminan tekniseen tukipalveluun.

## BaseSpace Sequence Hubin määrittäminen ja ennakoiva tuki

Voit määrittää BaseSpace Sequence Hubin ja Proactive Support -palvelun järjestelmään noudattamalla seuraavia ohjeita. Voit luoda BaseSpace Sequence Hub -tilin tutustumalla [BaseSpace Sequence Hub -verkko-ohjeeseen](#).

1. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).

2. Valitse yksi seuraavista vaihtoehtoista BaseSpace Sequence Hubin ja Proactive Support -palvelun asetuksia varten:

Vaihtoehto	Kuvaus ja vaatimukset
<b>Pelkkä Proactive Support -palvelu*</b>	Lähetä instrumentin suoritustiedot Illuminalle nopeampaa vianmäärittystä varten. Vaatii internetyhteyden.
<b>Ennakoiva valvonta ja ajovalvonta</b>	Lähetä InterOp ja lokitiedostot BaseSpace Sequence Hubiin ajon etävalvontaa varten. Tämä asetusta on oletusarvoinen. Vaatii BaseSpace Sequence Hub -tilin ja internetyhteyden.
<b>Ennakoiva valvonta ja ajovalvonta sekä tallennus</b>	Lähetä InterOp-tiedostot, lokitiedostot ja ajotiedot BaseSpace Sequence Hubiin etävalvontaa ja analyysia varten. Edellyttää BaseSpace Sequence Hub -tiliä, internetyhteyttä sekä näytetiedostoa.
<b>None (Ei mitään)</b>	Ajot erotetaan BaseSpace Sequence Hub -tileistä ja Illumina Proactive Support -palvelun laitesuoritustietoja ei lähetetä.

\* Tämän asetuksen nimi ohjelmiston käyttöliittymässä voi erota tässä oppaassa esitetystä nimestä sen mukaan, mikä ohjausohjelmiston versio on kyseessä.

Kun valitaan jokin muu vaihtoehto kuin None (Ei mitään), Proactive Support -palvelu otetaan käyttöön. Tämä on ilmainen palvelu, jonka avulla näet suoritustietosi MyIllumina Customer Dashboard -koontinäytöllä ja jonka avulla Illuminan palvelutiimit voivat suorittaa vianmäärittelyn nopeammin.

**i** | Ennakoiva valvonta ja ajovalvonta on oletusarvoisesti päällä. Poista palvelu valitsemalla **None** (Ei mitään).

- Jos valitsit None (Ei mitään) vaiheessa 2, lopeta valitsemalla **Save** (Tallenna). Muussa tapauksessa jatka vaiheeseen 6.
- Valitse Hosting Location (Isännöintisijainti) -luettelosta sen BaseSpace Sequence Hub -palvelimen sijainti, johon tiedot ladataan.  
Varmista, että käytät Hosting Location (Isännöintisijainti) -sijaintia, joka on alueellasi tai lähinnä sitä.
- Jos sinulla on yritystilaus, anna verkkotunnuksen (URL) nimi, jota käytetään BaseSpace Sequence Hub -tiliä varten.  
Esimerkiksi: <https://yourlab.basespace.illumina.com>.
- Valitse **Save** (Tallenna).

## Määritä oletusarvoisen tulostuskansion sijainti

Valitse oletusarvoinen tulostuskansion sijainti tämän osion ohjeiden avulla. Voit muuttaa kunkin ajon kohdalla tulostuskansiota ajon määrittämisen aikana. Ohjelmisto tallentaa cBCL -tiedostot<sup>1</sup> ja muut ajotiedot tulostuskansioon.

Tarvitaan tulostuskansio, ellei BaseSpace Sequence Hubiin ole määritetty ennakkointia, ajon valvontaa ja tallennusta. Käytä vain ulkoista tai verkkoasemaa oletusarvoisena tulostuskansiona. Instrumentin tulostuskansion käyttö vaikuttaa kielteisesti sekvensointiajoon.

### Ulkoisen aseman tulostuskansion määrittäminen

Valitse seuraavien ohjeiden avulla ulkoinen siirrettävä asema oletusarvoiseksi tulostuskansioksi. Suositellaan omaa virtalähdettä käyttävää asemaa, joka on formatoitu NFS:ksi tai GPT/EXTA:ksi.

1. Kytke ulkoinen siirrettävä asema, jossa käytetään 3.0 USB -porttia instrumentin sivulla tai takana. Varmista, että ulkoisessa siirrettävässä asemassa sallitaan kirjoitusluvat. Jos sen asetukseksi on määritetty Read Only (Vain luku), ohjausohjelmisto ei pysty tallentamaan siihen tietoja.
2. Luo uusi kansio ulkoiseen kannettavaan asemaan. Tästä kansioista tulee oletusarvoinen tulostuskansion sijainti.  
NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmisto edellyttää vähintään kahta sisäkkäistä kansiotasoa, jotta sijainti tunnistetaan ulkoiseksi siirrettäväksi asemaksi.
3. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).
4. Valitse oletusarvoisesta tulostuskansiosta olemassaoleva kansiopolku ja navigoi uuteen kansioon ulkoisessa siirrettävässä asemassa.
5. **[Valinnainen]** Jos olet valinnut **Online Run Setup** (Verkkoajoasetukset) ajotilassa, valitse vaihtoehto avattavasta **Hosting Location** (Isäntäsijainti) -valikosta.
6. Valitse **Save** (Tallenna).

### Verkkoaseman oletusarvoisen tulostuskansion määrittäminen

Voit asentaa pysyvän verkkoaseman ja määrittää oletusarvoisen tulostuskansiosijainnin noudattamalla seuraavia ohjeita. Server Message Block (SMB)/Common Internet File Systems (CIFS) ja Network File System (NFS) ovat ainoat menetelmät, joita tuetaan verkkoaseman asentamisessa NextSeq 1000:aan/2000:aan.

#### SMB/CIFS-asennusohjeet

1. Jos NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmisto on avoinna, valitse **Minimize Application** (Pienennä sovellus).
2. Kirjautu kohteeseen ilmnadmin.

---

<sup>1</sup>Sisältää kunkin sekvensointijakson jokaisen klusterin emäsmäärittämisen ja siihen liittyvät laatuasteet.

3. Valitse **Applications** (Sovellukset).
4. Valitse Favorites (Suosikit) -kohdasta **Terminal** (Pääte).
5. Syötä `sudo touch /root/.smbcreds` ja valitse sitten **Enter**.
6. Kirjoita kehotettaessa `ilmnadmin`-salasana.  
ilmnadmin-salasana tarvitaan aina, kun käytetään `sudo`-komentoa.
7. Syötä `sudo gedit /root/.smbcreds` ja valitse sitten **Enter**, jotta voit avata tekstitiedoston nimeltä `smbcreds`.
8. Kun `.smbcreds`-tekstitiedosto avataan, syötä verkkokirjautumistunnukset seuraavassa muodossa.  

```

käyttäjätunnus=<user name>
salasana=<password>
toimialue=<domain_name>

```

 Käyttäjätunnuksen, salasanan ja toimialueen tunnuksissa ei tarvita hakasulkeita. Toimialueen tunnusta tarvitaan vain, jos etätili on osa toimialuetta.
9. Valitse **Save** (Tallenna) ja poistu tiedostosta.
10. Määritä palvelimen nimi ja SMB/CIFS-palvelimen jakonimi.  
Palvelimen nimessä ja jakonimessä ei voi olla välilyöntejä esimerkiksi seuraavasti:  
Palvelimen nimi: `192.168.500.100` tai `Myserver-myinstitute-03`  
Jakonimi: `/share1`
11. Syötä päätteessä `sudo chmod 400 /root/.smbcreds` ja valitse sitten **Enter**, jotta voit myöntää lukuoikeuden `.smbcreds`-tekstitiedostoon.
12. Syötä `sudo mkdir /mnt/<paikallinen nimi>`.  
<paikallinen nimi> on verkkoaseman uuden hakemiston nimi, ja se voi sisältää välilyöntejä. Tämä hakemisto näytetään laitteessa.
13. Valitse **Enter**.
14. Syötä `sudo gedit /etc/fstab` ja valitse sitten **Enter**.
15. Kun `fstab`-tiedosto avataan, syötä seuraava tiedoston loppuun ja valitse sitten **Enter**.  

```

//<Palvelimen nimi>/<Jakonimi> /mnt/<paikallinen nimi> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0

```
16. Valitse **Save** (Tallenna) ja poistu tiedostosta.
17. Syötä päätteessä `sudo mount -a -vvv` ja valitse sitten **Enter**.  
Verkkoasema on nyt asennettu nimellä `/mnt/<paikallinen nimi>`.
18. Voit vahvistaa, onnistuiko asennus syöttämällä `<df | grep <paikallinen nimi>>` ja valitsemalla sitten **Enter**.  
Jaettujen tiedostojen nimen pitäisi tulla näkyviin.
19. Syöttämällä `sudomkdir /mnt/<local name>/<output directory>` voit luoda alikansion paikalliseen hakemistoon. <Tulostushakemisto> edustaa oletusarvoista tulostuskansiosijaintia.

NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmisto edellyttää vähintään kahta sisäkkäistä kansiotasoa, jotta sijainti tunnistetaan asennetuksi verkkoasemaksi.

20. Katkaise laitteesta virta ja kytke se uudelleen. Katso [Virran katkaiseminen laitteesta ja kytkeminen uudelleen laitteeseen sivulla 81](#).
21. Määritä pysyvästi asennettu verkkoasema oletusarvoiseksi tulostuskansioksi. Katso [Pysyvän verkkoaseman määrittäminen oletusarvoiseksi tulostuskansioksi sivulla 17](#).

## NFS-asennusohjeet

1. Jos NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmisto on avoinna, valitse **Minimize Application** (Pienennä sovellus).
2. Kirjautu kohteeseen ilmnadmin.
3. Määritä NFS-palvelimen nimi.  
Palvelimen nimessä ei voi olla välilyöntejä esimerkiksi seuraavasti:  
Palvelimen nimi: 192.168.500.100 tai Myserver-myinstitute-03
4. Valitse **Applications** (Sovellukset).
5. Valitse Favorites (Suosikit) -kohdasta **Terminal** (Pääte).
6. Syötä `sudo mkdir /mnt/<paikallinen nimi>` ja valitse sitten **Enter**.  
<Paikallinen nimi> on verkkoaseman uuden hakemiston nimi.
7. Syötä `sudo gedit /etc/fstab` ja valitse sitten **Enter**.
8. Kun fstab-tiedosto avataan, syötä seuraava ja valitse sitten **Enter**.  

```
Palvelimen nimi:/share //mnt/<paikallinen nimi> nfs x-  
systemd.automount,defaults 0 0
```
9. Valitse **Save** (Tallenna) ja poistu tiedostosta.
10. Syötä päätteessä `sudo mount -a -vvv` ja valitse sitten **Enter**.  
Verkkoasema on nyt asennettu kohtaan `/mnt/directory <paikallinen nimi>` -kansiossa.
11. Luo uusi `<alikansio> <paikallinen nimi>` -kansiossa. Alikansio edustaa oletusarvoista tulostuskansiosijaintia.  
NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmisto edellyttää vähintään kahta sisäkkäistä kansiotasoa, jotta sijainti tunnistetaan asennetuksi verkkoasemaksi.
12. Katkaise laitteesta virta ja kytke se uudelleen. Katso [Virran katkaiseminen laitteesta ja kytkeminen uudelleen laitteeseen sivulla 81](#).
13. Määritä pysyvästi asennettu verkkoasema oletusarvoiseksi tulostuskansioksi. Katso [Pysyvän verkkoaseman määrittäminen oletusarvoiseksi tulostuskansioksi sivulla 17](#).

## Pysyvän verkkoaseman määrittäminen oletusarvoiseksi tulostuskansioksi

1. Kirjautu kohteeseen ilmnuser.
2. Valitse NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).



3. Valitse oletusarvoisesta tulostuskansiosta pysyvän verkkoaseman asennus, joka sijaitsee kohdassa `/mnt/<paikallinen nimi>/<tulostushakemisto>`.
4. **[Valinnainen]** Jos olet valinnut **Online Run Setup** (Verkkoajoasetukset) ajotilassa, valitse vaihtoehto avattavasta **Hosting Location (Isäntäsijainti)** -valikosta.
5. Valitse **Save** (Tallenna).

## Mukautettujen viitegenomien tuonti

Uudet mukautetut viitegenomit voidaan tuoda vain järjestelmänvalvojan tilin avulla. Saat luettelon kaikista yhteensopivista viitegenomeista vierailemalla NextSeq 1000/2000 -tuoteyhteensopivuussivulla.

1. Luo viitegenomi Reference Builder for Illumina Instruments BaseSpace Sequence Hub -sovelluksen avulla. Lisätietoja saat *Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 -sovelluksen verkko-ohjeesta*.
2. Valitse ohjausohjelmiston valikko ja valitse sitten **Process Management** (Prosessinhallinta).
3. Varmista, että käynnissä ei ole sekvensointiajoja tai instrumentin toissijaisia analyysejä.
4. Valitse ohjausohjelmiston valikosta **Minimize Application** (Pienennä sovellus).
5. Kirjaudu kohteeseen ilmnadmin.
6. Valitse ohjausohjelmiston valikko ja valitse sitten **DRAGEN**.
7. Valitse Genome (Genomi) -osiossa **View Installed Genomes** (Tarkastele asennettuja genomeja), jotta voit tarkastella luetteloita kaikista kulloinkin asennetuista Illumina-genomeista ja mukautetuista genomeista.
8. Sulje modaali.
9. Valitse **Choose** (Valitse) kohdasta Import New Reference Genomes (Tuo uudet viitegenomit), navigoi viitegenomitiedostoon (\*.tar.gz) siirrettävässä tai asennetussa levyasemassa ja valitse sitten **Open** (Avaa).
10. Valitse **Import** (Tuo).

## Melun lähtötasotiedostojen luonti

Jos käytetään DRAGEN-rikastustyönkulkua somaattisessa tilassa, voit suodattaa sekvensointimelua tai järjestelmällistä melua melun lähtötasotiedoston avulla. Voit ladata vakiomallisia mukautettuja melutiedostoja [Illumina-tukisivustolta](#) tai luoda mukautetun melun lähtötasotiedoston.

### Luo mukautettu melun lähtötasotiedosto

Mikäli käytetään somaattista tilaa, voit luoda mukautetun melun lähtötasotiedoston. Melun lähtötasotiedosto rakennetaan normaaleilla näytteillä, jotka eivät vastaa kohdetta, josta näytteet ovat lähtöisin. Normaalien näytteiden suositeltava määrä on 50.

Voit luoda mukautetun melun lähtötasotiedoston yhdellä seuraavista menetelmistä:

- Käytä DRAGEN Bio-IT Platform -palvelinta. Katso *ohjeet DRAGEN Bio-IT Platform -verkko-ohjeesta*.
- Käytä DRAGEN Baseline Builder -sovellusta BaseSpace Sequence Hubissa. Luo FASTQ-tiedostot BaseSpace Sequence Hubin Instrument Run Setup (Laitteajon asettaminen) -kohdassa olevan BCL-konverttijakson avulla. Sekvensointiajon jälkeen, kun saatavilla on 50 näytettä, syötä FASTQ-tiedostot DRAGEN Baseline Builder -sovellukseen.

## Lähtötason tiedostojen tuonti käyttöliittymän avulla

Lähtötasotiedoston tuonnin jälkeen voit määrittää sekvensointiajon käyttämällä DRAGEN-rikastustyönkulkua somaattisessa tilassa.

1. Lataa vakiomallinen lähtötason tiedosto [illumina-tukisivustolta](#) tai lataa mukautettu lähtötason tiedosto DRAGEN-palvelimelta tai DRAGENin Baseline Builder -sovelluksesta.
2. Valitse ohjausohjelmiston valikosta **Minimize Application** (Pienennä sovellus).
3. Kirjaudu kohteeseen ilmnadmin.
4. Valitse **Applications** (Sovellukset) ja sitten **Favorites** (Suosikit).
5. Valitse **+Other Locations** (+Muut sijainnit) ja sitten **Computer** (Tietokone).
6. Kaksoisnapsauta **usr** ja sen jälkeen **local** (paikallinen).
7. Kaksoisnapsauta **illumina**-kohtaa ja sen jälkeen **aux\_files**-kohtaa.
8. Vedä melun lähtötasotiedosto kohtaan **aux\_files**.

## Lähtötasotiedostojen tuonti päätteen avulla

Lähtötasotiedoston tuonnin jälkeen voit määrittää sekvensointiajon käyttämällä DRAGEN-rikastustyönkulkua somaattisessa tilassa.

1. Lataa vakiomallinen lähtötason tiedosto [illumina-tukisivustolta](#) tai lataa mukautettu lähtötason tiedosto DRAGEN-palvelimelta tai DRAGENin Baseline Builder -sovelluksesta.
2. Valitse ohjausohjelmiston valikosta **Minimize Application** (Pienennä sovellus).
3. Kirjaudu kohteeseen ilmnadmin.
4. Valitse **Applications** (Sovellukset).
5. Valitse Favorites (Suosikit) -kohdasta **Terminal** (Pääte).
6. Syötä seuraava komento.

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

## Ajotilan määrittäminen

Ajotila koskee kaikkia ajoja ja määrittää, mihin ajoparametrit syötetään ja miten tiedot analysoidaan:

### Pilvi- tai hybriditila

1. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).
2. Valitse **Online Run Setup** (Verkkoajon asettaminen) BaseSpace Sequence Hub -palvelut- ja Proactive Support -palvelun kohdalta.
3. Määritä lisäasetukset asianmukaisesti valitsemalla seuraava:
  - a. **Proactive and Run Monitoring** (Ennakoiva valvonta ja ajovalvonta) tai **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus).
  - b. Avattava **Hosting Location** (Isännöintisijainti) -valikko.
  - c. **[Valinnainen]** Syötä **Private Domain Name** (Yksityinen toimialue nimi).
4. Valitse **Save** (Tallenna).

### Paikallinen tai erillistila

1. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).
2. Valitse **Local Run Setup** (Paikallisen ajon asettaminen) BaseSpace Sequence Hub -palvelut- ja Proactive Support -palvelun kohdalta.
3. Määritä lisäasetukset asianmukaisesti valitsemalla seuraava:
  - a. **Proactive Support Only** (Pelkkä ennakoiva tuki), **Proactive and Run Monitoring** (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) tai **None** (Ei mitään).



BaseSpace Sequence Hub sallii toiminnon asettamisen uudelleen jonoon vain, jos **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) on valittu. Mikäli näytetiedosto on viallinen, tämän avulla voit tehdä korjauksia näytetiedostoon ja asettaa demultipleksointi-analyysin uudelleen jonoon. Katso instrumentin uudelleen jonoon asettamista koskeva toiminto kohdasta [Ajon asettaminen uudelleen jonoon sivulla 81](#).

- b. Avattava **Hosting Location** (Isännöintisijainti) -valikko.
  - c. **[Valinnainen]** Syötä **Private Domain Name** (Yksityinen toimialue nimi).
4. Valitse **Save** (Tallenna).

### Näytetiedostoa koskevat näkökohdat paikallisessa tai erillistilassa

Sinun on käytettävä näytetiedoston v2-tiedostomuotoa, jotta voit suorittaa analyysin DRAGENilla. Näytetiedoston v2-tiedostomuoto on myös yhteensopiva sellaisten BaseSpace Sequence Hub -sovellusten kanssa, jotka eivät ole DRAGEN -yhteensopivia. Tietoja näytetiedoston luomisesta v2-

tiedostomuodossa on kohdassa [Näytetiedoston v2 asetukset sivulla 85](#).

## Laitteen mukauttaminen

Tämä osio sisältää tietoja saatavilla olevien mukautusasetusten määrittämisestä. Voit määrittää oletusarvoisen tulostuskansion [Määritä oletusarvoisen tulostuskansion sijainti sivulla 15](#) kohdan tietojen avulla.

### Laitteen nimeäminen

1. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).
2. Valitse Instrument Nickname (Laitteen kutsumanimi) ja syötä kenttään haluttu laitteen nimi. Nimi näkyy jokaisen näytön yläosassa.
3. Valitse **Save** (Tallenna).

### Denaturointi- ja laimennusmieltymysten määrittäminen

1. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).
2. Valitse, haluatko automaattisesti denaturoida ja laimentaa kirjastoja instrumentissa. Asetuksella palautetaan oletusvaihtoehto, joka valittiin edellistä ajoa varten.
  - Jotta voit denaturoida ja laimentaa kirjastoja automaattisesti laitteessa, poista **Denature and Dilute On Board** (Denaturoi ja laimenna levyllä) -valintaruudun valinta.
  - Jotta voit manuaalisesti denaturoida ja laimentaa kirjastoja, poista **Denature and Dilute On Board** (Denaturoi ja laimenna levyllä) -valintaruudun valinta.Katso kirjastojen manuaalista denaturointia ja laimennusta koskevat ohjeet *NextSeq 1000- ja 2000 -denaturointi- ja laimennusoppaasta kirjastoille (asiakirjanro 1000000139235)*.

### Aseta automaattista reagenssityhjennystä koskeva mieltymys

1. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).
2. Valitse, onko järjestelmän tyhjennettävä automaattisesti käyttämättömät reagenssit käytettyjen reagenssien lokeroon jokaisen ajon jälkeen reagenssijätteen hävittämisen virtaviivaistamiseksi ajon valmistumisen jälkeen:
  - Voit suorittaa tyhjennyksen automaattisesti valitsemalla **Purge Reagent Cartridge** (Tyhjennä reagenssikasetti) -valintaruudun.
  - Voit ohittaa automaattisen tyhjennyksen poistamalla **Purge Reagent Cartridge** (Tyhjennä reagenssikasetti) -valintaruudun valinta (tämä on oletusasetus).Käyttämättömien reagenssien tyhjennys lisää jopa 2 tuntia työnkulkuun.
3. Valitse **Save** (Tallenna).

## Ohjelmistopäivitysten määrittäminen

1. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).
2. Valitse, tarkistaako järjestelmä ohjelmistopäivitykset automaattisesti:
  - Valitse automaattista tarkistusta varten **Autocheck for software updates** (Ohjelmistopäivitysten automaattinen tarkistus) -valintaruutu.
  - Poista manuaalista tarkistusta varten **Autocheck for software updates** (Ohjelmistopäivitysten automaattinen tarkistus) -valintaruudun valinta.

Ohjelmistopäivitysten tarkistaminen automaattisesti edellyttää internetyhteyttä. Lisätietoja ohjelmistopäivitysten asentamisesta annetaan kohdassa [Ohjelmistopäivitykset sivulla 74](#) (Ohjelmistopäivitykset).

3. Valitse **Save** (Tallenna).

## Muuta LCD-näytön kirkkautta

1. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).
2. Liu'uta LCD-näytön kirkkauden liukusäädintä halutun prosenttiluvun kohdalle.
3. Valitse **Save** (Tallenna).

## Aseta välityspalvelin

Välityspalvelimen tuki on saatavilla vain NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistoversiossa v1.3.

1. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Settings** (Asetukset).
2. Valitse kulloisetkin välityspalvelinasetukset, jotta voit avata Proxy Settings (Välityspalvelinasetukset) -näytön.
3. Valitse **Enable Proxy** (Ota välityspalvelin käyttöön) -valintaruutu ja syötä sen jälkeen palvelimen IP-portin osoite.
4. **[Valinnainen]** Mikäli välityspalvelin edellyttää todennusta, valitse **Requires Username and Password** (Edellyttää käyttäjätunnusta ja salasanaa) -valintaruutu ja syötä sen jälkeen käyttäjätunnus ja salasana.
5. Valitsemalla **Save** (Tallenna) voit tallentaa ja vahvistaa välityspalvelimen tiedot.
6. Valitse yksi seuraavista vaihtoehdoista:
  - Valitsemalla **Yes, I'm Finished** (Kyllä, olen valmis) voit käynnistää järjestelmän uudelleen ja ottaa uudet välityspalvelinasetukset käyttöön.
  - Valitsemalla **No, Take Me Back** (Ei, haluan takaisin) voit palata Settings (Asetukset) -näytölle. Uudet välityspalvelinasetukset tallennetaan, mutta niitä ei oteta käyttöön ennen järjestelmän uudelleenkäynnistystä.

# Tarvikkeet ja laitteet

Tässä osiossa luetellaan koko reagenssisarjan sisältö säilytysolosuhteissa. Näet myös, mitkä lisätarvikkeet ja laitteet on hankittava protokollan saattamiseksi päätökseen sekä huolto- ja vianmääritystoimenpiteiden suorittamiseksi.


## Sekvensointitarvikkeet

Sekvensointi NextSeq 1000/2000:ssa edellyttää yhtä kertakäyttöistä Illumina NextSeq 1000/2000 P2 -reagenssisarjaa tai yhtä kertakäyttöistä Illumina NextSeq 1000/2000 P3 -reagenssisarjaa. NextSeq 1000/2000 P2 -reagenssiraja on saatavilla kolmessa koossa (100 jaksoa, 200 jaksoa, 300 jaksoa), ja NextSeq 1000/2000 P3 -reagenssisarja on saatavilla neljässä koossa (50 jaksoa, 100 jaksoa, 200 jaksoa, 300 jaksoa).

NextSeq 1000 -sekvensointijärjestelmä on yhteensopiva vain Illumina NextSeq 1000/2000 P2 -reagenssisarjan kanssa.

Reagenssisarja sisältää kasetin ja virtauskyvetin sekvensointia varten. Kun saat NextSeq 1000/2000 P2- tai Illumina NextSeq 1000/2000 P3 -reagenssisarjan:

- Varastoi tarvikkeet viipymättä niihin merkittyihin lämpötiloihin oikean suorituskyvyn varmistamiseksi.
- Älä avaa foliopussia, ennen kuin se kehoitetaan tekemään.
- Säilytä kasetteja rasiassaan, jotta foliopussi ei repeydy tai puhkea.
- Säilytä kasetteja nuolet ylöspäin.

 Ellei kasetin etiketti ole ylöspäin, se vaikuttaa kielteisesti sekvensointitietoihin.

Taulukko 2 Sarjojen osat

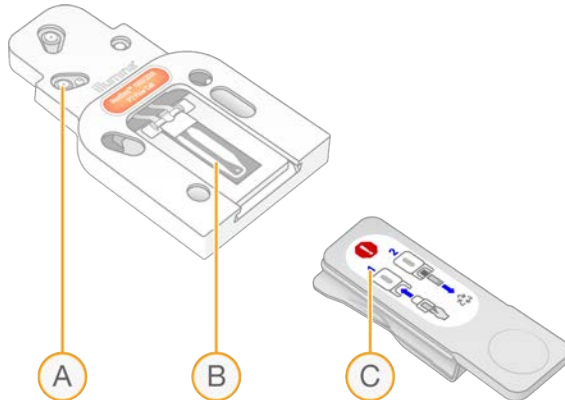
Tarvike	Määrä	Säilytyslämpötila	Mitat
Kasetti	1	-25...-15 °C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm (11,5 tuumaa × 7 tuumaa × 5 tuumaa)
Virtauskyvetti	1	2-8 °C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm (8,5 tuumaa × 5 tuumaa × 0,75 tuumaa)
RSB, jossa on Tween 20	1	-25...-15 °C	4 cm x 6,6 cm x 5 cm) (1,6 tuumaa x 2,6 tuumaa x 2 tuumaa)

\*Kuljetetaan huoneenlämpötilassa.

Molemmissa tarvikkeissa on tunnistimet seuranta- ja yhteensopivuuden varmistamista varten. Kasetin ja virtauskyvetin käyttö RFID<sup>1</sup>.

## Virtauskyvetti

Virtauskyvetti on kuvioitu, yksikaistainen virtauskyvetti. Muovinen kasetti sulkee lasipohjaisen virtauskyvetin sisäänsä. Harmaa liuska peittää virtauskyvetin ja työnnyttää esiin siitä turvallisen käsittelyn varmistamiseksi.



- A. Muovikasetti
- B. Virtauskyvetti
- C. Harmaa liuska

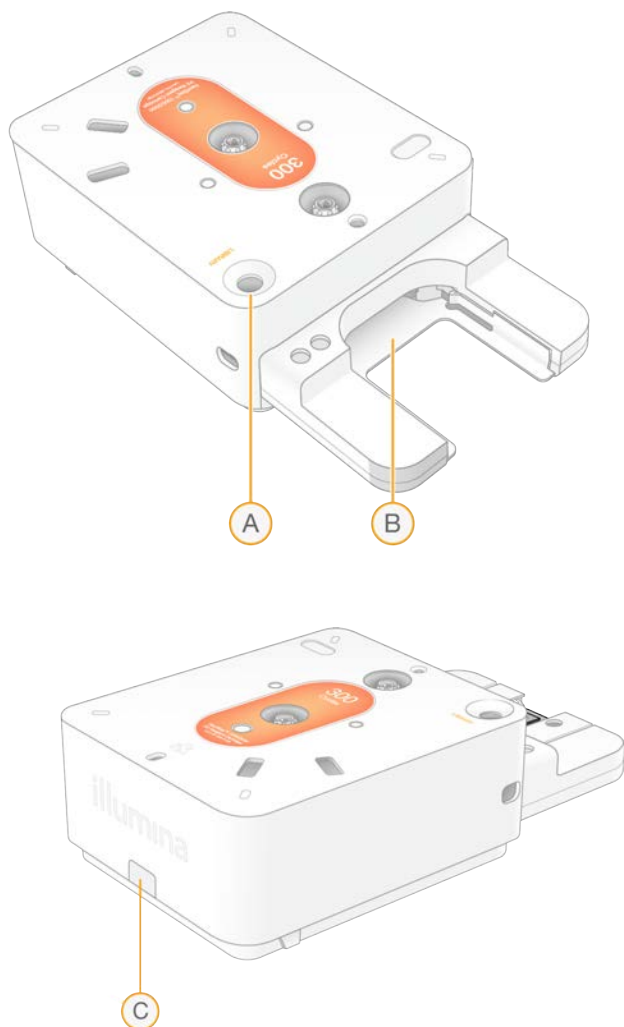
Virtauskyvetin sisäpinta on miljoonien nanokaivojen peittämä. Klustereita luodaan nanokaivoihin, joista sekvensointireaktio suoritetaan. Nanokaivojen kuvioitu järjestely lisää tuotos-readeja ja -tietoja.

---

<sup>1</sup>radiotaajuinen tunnistus

## Kasetti

Sekvensoinnin reagenssin kasetti esitetytään klusterointi-, sekvensointi-, PE (paired-end)- ja indeksointireagensseillä. Foliolla tiivistetty säiliö on varattu kirjastoille ja edessä oleva rako on varattu virtauskyvetille.



- A. Kirjastosäiliö
- B. Virtauskyvetin rako
- C. Tyhjennystulppa

Kasetti sisältää kaikki tarvikkeet ajoa varten: reagenssit, kirjaston ja virtauskyvetin. Kirjasto ja virtauskyvetti ladataan sulatettuun kasettiin, joka sitten ladataan laitteeseen. Ajon alettua reagenssit ja kirjasto siirretään automaattisesti kasetista virtauskyvettiin.



Kasetissa on pumput, venttiilit ja koko fluidistorijärjestelmä, mukaan lukien kasetin alapuolella oleva säiliö käytettyjen reagenssien keräämistä varten. Kasetti hävitetään ajon jälkeen, joten laitteen peseminen ei ole tarpeellista.

## Tuettu jaksojen määrä



Merkintä kasetissa osoittaa, kuinka monta jaksoa analysoidaan, ei kuinka monta jaksoa suoritetaan. Virtauskyvetti on yhteensopiva riippumatta jaksojen määrästä ja read-tyypistä.

Kaikkiin 100 ja 200 jakson kasetteihin sisältyy 38 ylimääräistä jaksoa. 300 jakson kasettiin sisältyy 27 ylimääräistä jaksoa. Esimerkiksi 300 jakson kasetin reagenssit riittävät enintään 327 sekvensointijaksoon. Sekvensoitavien jaksojen määrästä annetaan lisätietoja kohdassa [Jaksojen määrä readissa sivulla 31](#) (Jaksojen määrä readissa).

## Symbolien kuvaukset

Seuraavassa taulukossa on esitetty tarvikkeisiin ja tarvikkeiden pakkauksiin merkityt symbolit.

Symboli	Kuvaus
	Tarvikkeen vanhenemispäivämäärä. Parhaan tuloksen saamiseksi käytä tarvike ennen tätä päivämäärää.
	Ilmoittaa valmistajan (Illumina).
	Tarkoitettu käyttö on Research Use Only (RUO) (Vain tutkimuskäyttöön).
	Ilmoittaa osanumeron, jotta tarvike voidaan tunnistaa. <sup>1</sup>
	Ilmoittaa eräkoodin, jotta voidaan tunnistaa tarvikkeen valmistuserä. <sup>1</sup>

Symboli	Kuvaus
	Ilmoittaa terveysvaarasta.
	Säilytyslämpötila ilmoitetaan celsius-asteina. Säilytä tarvike ilmoitetun lämpötila-alueen sisällä. <sup>2</sup>

## Lisäkulutustarvikkeet

Hanki seuraavat kulutustarvikkeet sekvensointia ja ylläpitoa varten.

### Tarvikkeet sekvensointia varten

Taulukko 3 Tarvikkeet sekvensointia varten

Tarvike	Toimittaja	Tarkoitus
Kertakäyttökäsineet, puuterittomat	Yleinen laboratoriotoimittaja	Yleiskäyttöön
NextSeq 1000/2000 P2 (v3) - reagenssisarja	Illumina: luettelonumero 20046811 (100 jaksoa) luettelonumero 20046812 (200 jaksoa) luettelonumero 20046813 (300 jaksoa)	Sisältää reagenssikasetin ja virtauskyvetin sekä NextSeq 1000/2000 RSB:n (uudelleensuspensiopuskurin), jossa Tween 20 yhtä ajoa varten. Yhteensopiva NextSeq 1000:n ja NextSeq 2000:n kanssa.
NextSeq 2000 P3 - reagenssisarja	Illumina: luettelonumero 20046810 (50 jaksoa) luettelonumero 20040559 (100 jaksoa) luettelonumero 20040560 (200 jaksoa) luettelonumero 20040561 (300 jaksoa)	Sisältää reagenssikasetin ja virtauskyvetin sekä NextSeq 1000/2000 RSB:n (uudelleensuspensiopuskurin), jossa Tween 20 yhtä ajoa varten. Yhteensopiva vain NextSeq 2000:n kanssa.

Tarvike	Toimittaja	Tarkoitus
Mikroputket, 1,5 ml	Fisher Scientific, luettelonumero 14-222-158, tai vastaavat putket, jotka minimoivat sitoutumisen putkeen	Kirjastojen laimennus latauspitoisuuteen
Pipetin kärjet, 10 µl	Yleinen laboratoriotuottaja	Kirjastojen laimennus.
Pipetin kärjet, 20 µl	Yleinen laboratoriotuottaja	Kirjaston laimennus ja lataus
Pipetin kärjet, 200 µl	Yleinen laboratoriotuottaja	Kirjastojen laimennus.
Pipetin kärjet, 1 000 µl	Yleinen laboratoriotuottaja	Kirjaston säiliön folion puhkaiseminen.
[Valinnainen] PhiX Control v3	Illumina, tuotenro FC-110-3001	Vain-PhiX-ajon suorittaminen tai lisääminen PhiX-kontrolliin.
[Valinnainen] Paperipyyhkeet	Yleinen laboratoriotuottaja	Kasetin kuivaamiseen vesipesun jälkeen

## Huoltotarvikkeet

Taulukko 4 Huoltotarvikkeet

Tarvike	Toimittaja	Tarkoitus
Kertakäyttökäsineet, puuterittomat	Yleinen laboratoriotuottaja	Yleiskäyttöön
NextSeq 1000/2000:n ilmansuodatin vaihtoa varten*	Illumina, tuotenro 20029759	Ilmansuodattimen vaihtamiseen kuuden kuukauden välein

\* Laite toimitetaan niin, että yksi suodatin on asennettuna ja yksi varalla. Kun laitteen takuu ei ole voimassa, varaosat ovat käyttäjän hankittavia. Säilytä pakkauksessa ennen käyttöä.

## Lisälaitteet

Hanki seuraavat laitteet sekvensointitarkoituksiin.

Laite	Toimittaja	Tarkoitus
Pakastin, -25...-15 °C	Yleinen laboratoriotuottaja	Kasetin säilytystä varten
Jääastia	Yleinen laboratoriotuottaja	Kirjastojen asettamiseksi sivuun sekvensointiin saakka

Laite	Toimittaja	Tarkoitus
Pipetti, 10 µl	Yleinen laboratoriotuottaja	Kirjastojen laimennus latauspitoisuuteen
Pipetti, 20 µl	Yleinen laboratoriotuottaja	Kirjastojen laimentaminen latauspitoisuuteen ja kirjastojen lataaminen kasettiin
Pipetti, 200 µl	Yleinen laboratoriotuottaja	Kirjastojen laimennus latauspitoisuuteen
Jääkaappi, 2–8 °C	Yleinen laboratoriotuottaja	Virtauskyvetin säilyttämiseen tai kasetin sulattamiseen
[Valinnainen] Jokin seuraavista lämpötilasäädelyistä vesihauteista tai vastaava, joka voidaan säilyttää 25 °C:n lämpötilassa:	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermo Fisher Scientific, luettelonro TSCIR 35</li> <li>• Shel Lab, luettelonumero SWBC22</li> </ul>	Kasetin sulattaminen
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermo Scientific Precision 35L kiertävän veden vesihaude (samanaikaisesti enintään 5 kasetille)</li> <li>• SHEL LAB 22L digitaalinen kiertävän veden vesihaude (samanaikaisesti enintään 3 kasetille)</li> </ul>		

# Protokolla

Tässä osiossa annetaan vaiheittaiset ohjeet tarvikkeiden valmisteluun, kirjastojen laimennukseen ja sekvensointiajon määrittämiseen yhdessä neljästä ajotilasta (pilvi-, hybridi- ja paikallisessa tilassa käytetään DRAGENia tai BaseSpace Sequence Hubia, kun taas erillistila on erillinen ajo, joka on tarkoitettu cBCL-tietojen luontiin ainoastaan mukautettuja analyysityönkulkua varten).

Kun käsittelet reagensseja ja muita kemikaaleja, käytä suojalaseja, laboratoriotakkia ja puuterittomia suojakäsineitä.

Varmista, että käytössäsi on kaikki vaaditut tarvikkeet ja laitteet ennen protokollan aloittamista. Katso [Tarvikkeet ja laitteet sivulla 23](#).

Noudata protokollia esitetystä järjestyksessä käyttämällä määritettyjä määriä, lämpötiloja ja kestoja.

## Sekvensointinäkökohdat

Tarkista ennen protokollan käynnistämistä seuraavat tiedot kirjastojen laimennuksen valmistelua ja ajon määrittämistä varten. Optimaalisen latauspitoisuuden aikaansaanti on ratkaisevan tärkeää onnistuneen sekvensoinnin ja analyysin kannalta. Readin oikean jaksomäärän syöttäminen auttaa varmistamaan optimaalisen tietojen tulostuksen.

### Lataustilavuus ja -pitoisuudet

Lataustilavuus on 20 µl. Latauspitoisuus vaihtelee kirjastotyypin mukaan:

Kirjastotyyppi	Latauspitoisuus (pM)
AmpliSeq™ for Illumina Library PLUS	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep rikastuksella	1000
Illumina Stranded Total RNA ja Ribo-Zero Plus	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA PCR-Free	1000
100 % PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1200
TruSeq DNA Nano 550	1500
TruSeq Stranded mRNA	1000

Muiden kirjastotyyppien tapauksessa suositeltu aloituslatauspitoisuus on 650 pM. Tämä pitoisuus tulee optimoida myöhemmissä ajoissa, jotta tunnistetaan latauspitoisuus, joka tuottaa johdonmukaisesti vaatimukset täyttäviä tietoja.



Voit optimoida latauspitoisuuden käyttämällä % Loading Concentration (% latauspitoisuus) -mittausta `PrimaryAnalysisMetrics.csv` -tulostustiedostossa, joka on saatavilla ajon valmistumisen jälkeen. Mikäli % Loading Concentration (% latauspitoisuus) on < 95 %, lisää latauspitoisuutta 100 pM:n askelin myöhemmissä ajoissa.

## Jaksojen määrä readissa

Jokaisessa readissa vähintään 26 jakson ja enintään 151 jakson syöttäminen auttaa varmistamaan tietojen laadun. Jaksojen tarkka määrä riippuu kokeesta. NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmisto edellyttää vähintään 1 jakson Read 1 -kohteelle, muuta kun Read 1 -jaksojen määrä on alle 26, näytetään varoitus.

Read 1-, Index 1-, Index 2- ja Read 2 -jaksojen kokonaismäärä ei voi olla suurempi kuin sarjan tukema jaksojen määrä sekä 38 jaksoa 100 ja 200 jakson sarjoja varten ja 27 jaksoa P3 300 jakson sarjoja varten. NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistossa näytetään varoitus, kun Index 1- ja Index 2 -jaksojen määrä on alle 6. Varoitusta ei näytetä, mikäli Index 1- tai Index 2- jaksojen määrä on 0.

Pienimpään ja suurimpaan jaksonumeroon sisältyy ylimääräinen jakso. Lisää aina yksi jakso haluttuun read-pituuteen phasing- ja prephasing-virheiden vaikutusten korjaamiseksi. Read-pituus on **sekvensointijaksojen** määrä Read 1:ssä ja Read 2:ssa lisäjaksoja ja indeksijaksoja lukuun ottamatta. Lisätietoja on [Real-Time Analysis -ohjelmiston työnkulku sivulla 56](#) -kohdan Phasing-korjauksessa.

Esimerkkiajon käyttöönotto:


- Kun read-pituus on 35 (single-read), syötä **36** Read 1 -kenttään.
- Kun read-kohtainen read-pituus on 150 (paired-end), syötä **151** Read 1 -kenttään ja **151** Read 2 -kenttään.

## Sekvensointiajon suunnittelu BaseSpace Sequence Hubissa

Käytä BaseSpace Sequence Hubin Instrument Run Setup (Laitteajon asettaminen) -toimintoa ajoasetusten luontia ja määrittystä varten. Jos määrität ajon pilvi- tai hybridi-tilassa, lähetä ajomääritys BaseSpace Sequence Hub -tilisi suunniteltujen ajojen luetteloon Planned Runs (Suunnitellut ajot) -välilehdellä. NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmissä sekvensointiin saatavilla olevat ajot näytetään Planned Runs (Suunnitellut ajot) -välilehdellä. Jos määrität ajon paikallisessa tilassa, luo Instrument Run Setup (Laitteajon asettaminen) -toiminnolla näytetiedosto ja vie se v2-tiedostomuotoon. Katso vaihtoehtoisesti [Näytetiedoston v2 asetukset sivulla 85](#), jotta voit luoda näytetiedoston ilman BaseSpace Sequence Hubia tarjolla olevan mallineen avulla.

BaseSpace Sequence Hubin Instrument Run Setup (Laitteajon asettaminen) tukee enintään 1 536 näytettä.

## Ajon määrittäminen

1. Navigoi BaseSpace Sequence Hubiin.
2. Syötä sähköpostiosoitteesi ja BaseSpace Sequence Hubin salasana ja valitse sitten **Sign in** (Kirjaudu sisään).
3. Valitse **Runs** (Ajot) -välilehti ja valitse sitten avattava **New Run** (Uusi ajo) -valikko.
4. Valitse **NextSeq 1000/2000**.
5. Syötä Run Name (Ajon nimi) -kenttään haluamasi yksilöllinen nimi nykyisen ajon tunnistamista varten.  
Ajon nimessä voi olla enintään 225 aakkosnumeerista merkkiä, välilyöntiä, ajatusviivaa ja alaviivaa.
6. Valitse yksi seuraavista analyysisijainneista.
  - **BaseSpace** — Analysoi sekvensointitiedot pilvessä.
  - **Paikallinen** — Analysoi sekvensointitiedot instrumentissa tai luo näytetiedosto v2 paikalliselle tai hybriditilalle.
7. Valitse analyysityyppi ja -versio.  
Lisätietoja toissijaisista analyyseistä on [DRAGENin toissijaisen analyysin tulostustiedostot sivulla 61](#) tai BaseSpace Sequence Hub -sovelluksen asiakirjoissa. Jos valitset DRAGEN yksisolu-RNA-analyysin, katso NextSeq 1000/2000 -tuotetiedostosisivulta tiedot kolmannen tahon yksisolu-RNA-kirjaston valmistelutarjan yhteensopivuudesta.  
 Instrumentissa tehtävässä analyysissä valitun version on vastattava instrumenttiin asennettavaa DRAGEN-versiota. Voit vahvistaa instrumenttiin asennetun DRAGEN-version [DRAGEN-työnkulku ja käyttöoikeuspäivitykset sivulla 76](#).
8. **[Valinnainen]** Määritä mukautetut indeksisarjat seuraavasti.  
Jos käytät useampia kirjastoja, kirjastojen indeksireadien pituuden on oltava sama.
  - a. Valitse **Add Custom Index Adapter Kit** (Lisää mukautettu indeksisovitinsarja) avattavasta Index Adapter Kit (Indeksisovitinsarja) -valikosta.
  - b. Valitse mallinetyyppi ja syötä sarjan nimi, sovitinsekvenssi, indeksistrategiat sekä indeksisekvenssit.  
Varmista, että toisen indeksin (i5) sovitinsekvenssit on suunnattu eteenpäin.
  - c. Valitse **Create New Kit** (Luo uusi sarja).
9. **[Valinnainen]** Määritä mukautetut indeksisarjat seuraavasti.
  - a. Valitse **Add Custom Library Prep Kit** (Lisää mukautettu kirjaston valmistelutarja) avattavasta Library Prep Kit (Kirjaston valmistelutarja) -valikosta.
  - b. Syötä nimi, read-tyypit, oletusarvoiset read-jaksot ja yhteensopivat indeksisovitinsarjat mukautettua kirjaston valmistelutarjaa varten.
  - c. Valitse **Create New Kit** (Luo uusi sarja).

10. Valitse seuraavat instrumenttiasetukset. Kirjaston valmistelutarjan mukaan valitaan automaattisesti suositellut vaihtoehdot. Joissakin kirjaston valmistelutarjoissa on vahvasti koodattu indeksireadien ja read-tyyppien määrä, jota ei voida muuttaa.

- Kirjaston valmistelutarja
- Indeksisovitinsarja
- Indeksireadien määrä
- Read-tyyppi
- Sekvensointijaksojen määrä readia kohti

**i** Mikäli kirjaston valmistelutarjassa valitaan Not Specified (Ei määritetty), indeksireadien määrä päivitetään vasta, kun indeksisekvenssit syötetään Sample Data (Näytetiedot) -osioon.

11. Syötä näytetiedot Sample Data (Näytetiedot) -laskentataulukkoon käyttämällä yhtä seuraavista vaihtoehdoista. Voit ryhmitellä tietojen yhdistämisenäytteet jälkikäsitteilyanalyysin aikana määrittämällä ryhmälle nimen Project (Projekti) -sarakkeessa.

- Valitse **Import Data** (Tuo tiedot) ja valitse sitten näytetiedosto. Varmista, että näytetiedosto vastaa formatointivaatimuksia. Katso [Näytetiedoston v2 asetukset sivulla 85](#). Näytetiedoston muuttaminen alustavan latauksen jälkeen saattaa johtaa analyysin epäonnistumiseen.
- Liitä näytetunnukset ja joko indeksilevyn kaivojen asemat tai i7- ja i5-indeksit suoraan ulkoisesta tiedostosta. Syötä ennen liittämistä näyterivien määrä Rows (Rivit) -kentässä ja valitse +. Näytetunnukset voivat sisältää enintään 20 alfanumeerista merkkiä, ajatusviivaa ja alaviivaa.

**i** Asetteluun kiinteät indeksilevyt edellyttävät kaivojen asemien merkintöjä. Indeksit, joiden asettelu ei ole kiinteä, edellyttävät merkintöjä i7- ja i5-indekseille. i5-indeksit on syötettävä eteenpäin suuntautuen.

- Syötä manuaalisesti näytetunnukset ja vastaavat kaivojen asemat tai indeksit. Mikäli kirjaston valmistelutarjan kohdalla valitaan Not Specified, syötä Index 2 (i5) -sekvenssit eteenpäin suuntautuen.

12. Valitse **Next** (Seuraava).

## Toissijaisen analyysin määrittäminen

Määritä ajoa varten valitun analyysityypin asetukset. Lisätietoja DRAGEN-analyysin työnkuluista on [DRAGENin toissijaisen analyysin tulostustiedostot sivulla 61](#)

### Illumina DRAGEN BCL -konvertti

Voit määrittää Illumina DRAGEN BCL -konvertin analyysin suorittamalla seuraavat vaiheet.

1. Syötä seuraavat valinnaiset asetukset.



Asetus	Kuvaus
AdapterRead1	Sovitinsekvenssi readille 1. Mikäli käytetään Illumina-kirjaston valmistelusarjaa, jätä AdapterRead1-kenttä tyhjäksi.
AdapterRead2	Sovitinsekvenssi readille 2. Mikäli käytetään Illumina-kirjaston valmistelusarjaa, jätä AdapterRead2-kenttä tyhjäksi.
BarcodeMismatchesIndex1	Sallittujen yhteensopimattomuuksien määrä ensimmäisen indeksireadin ja indeksisekvenssin välillä. Oletusarvo on 1. Jos viivakoodi on 6 bp, suositeltava arvo on 0.
BarcodeMismatchesIndex2	Sallittujen yhteensopimattomuuksien määrä toisen indeksireadin ja indeksisekvenssin välillä. Oletusarvo on 1. Jos viivakoodi on 6 bp, suositeltava arvo on 0.
OverrideCycles	Komentosarja, jota käytetään UMI-jaksojen määrittämiseen ja readin jaksojen peittämiseen. Seuraavat arvot sallitaan: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N — Määrittää huomiotta jätettävät jaksot.</li> <li>• Y — Määrittää sekvensointijaksot.</li> <li>• I — Määrittää indeksijaksot.</li> <li>• U — Määrittää leikattavat UMI-jaksot.</li> </ul> Elementit on erotettu toisistaan puolipisteillä. Seuraavassa on esimerkkejä OverrideCycles-syötteestä. U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

- Valitse, haluatko tallentaa kopion FASTQ-tiedostoista. FASTQ-tiedostot luodaan vain, jos päätät säilyttää FASTQ-tiedostot.
- Valitse yksi seuraavista FASTQ-tulostusmuotovaihtoehdoista:
  - **gzip** — Tallenna FASTQ-tiedostot gzip-muodossa.
  - **DRAGEN** — Tallenna FASTQ-tiedostot ora-muodossa.
- Suorita ajon määrittäminen loppuun.
  - Voit lähettää ajon määrittäminen BaseSpace Sequence Hub -tilillesi valitsemalla **Submit Run** (Lähetä ajo). BaseSpace Sequence Hubiin lähetetyt ajot tulevat näkyviin suunniteltujen ajojen luettelossa, ja ne ovat saatavilla järjestelmissä, joissa käytetään pilvi- tai hybriditilaa.

- Voit tallentaa ajon määrittämisen näytetiedostoksi v2-tiedostomuodossa valitsemalla **Export Sample Sheet** (Vie näytetiedosto) avattavasta **Submit Run** (Lähetä ajo) -valikosta. Näytetiedostoa tarvitaan ajojen alustamiseen paikallista tilaa käyttävissä järjestelmissä. Tämä vaihtoehto on saatavilla vain, jos analyysin sijainniksi valittiin Local (Paikallinen).

## Illumina DRAGEN -rikastus

Voit määrittää Illumina DRAGEN -rikastusanalyysin suorittamalla seuraavat vaiheet.

1. Valitse viitegenomi.  
Käytä mahdollisuuksien mukaan viitegenomia alt awaren kanssa.
2. Valitse \*.bed-tiedosto, joka sisältää alueet, jotka ovat kohteenasi tai joihin haluat ladata uuden mukautetun tiedoston.  
Varmista, että BED-tiedoston viitegenomi vastaa viitegenomia, joka valittiin vaiheessa 1. Käytä uuden mukautetun BED-tiedoston kohdalla seuraavaa nimeämismuotoa: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.
  - **Paikallinen tila** — Valitse **Select Custom File (Local)** (Valitse mukautettu tiedosto (paikallinen)), jotta voit ladata yksittäisen ajon, tai **Upload Custom File (BaseSpace)** (Lataa mukautettu tiedosto (BaseSpace)) toistuvaan käyttöön.
  - **Pilvi- tai hybriditila** — Valitse **Upload Custom File (BaseSpace)** (Lataa mukautettu tiedosto (BaseSpace)). Mukautettu BED -tiedosto on saatavilla vain työryhmässä, johon se on ladattu.
3. Valitse joko sukusolulinja- tai somaattinen varianttitunnistin.
4. **[Valinnainen]** Mikäli käytetään somaattista varianttitunnistinta, valitse melun lähtötasotiedosto. Katso lisätietoja kohdasta [Melun lähtötasotiedostojen luonti sivulla 18](#).
5. Valitse kartta / kohdista tulostusmuoto.
6. Valitse, haluatko tallentaa kopion FASTQ-tiedostoista. FASTQ-tiedostot luodaan vain, jos päätät säilyttää FASTQ-tiedostot.
7. Valitse yksi seuraavista FASTQ-tulostusmuotovaihtoehdoista:
  - **gzip** — Tallenna FASTQ-tiedostot gzip-muodossa.
  - **DRAGEN** — Tallenna FASTQ-tiedostot ora-muodossa.
8. Suorita ajon määrittäminen loppuun.
  - Voit lähettää ajon määrittämisen BaseSpace Sequence Hub -tilillesi valitsemalla **Submit Run** (Lähetä ajo). BaseSpace Sequence Hubiin lähetetyt ajot tulevat näkyviin suunniteltujen ajojen luettelossa, ja ne ovat saatavilla järjestelmissä, joissa käytetään pilvi- tai hybriditilaa.

- Voit tallentaa ajon määrittämisen näytetiedostoksi v2-tiedostomuodossa valitsemalla **Export Sample Sheet** (Vie näytetiedosto) avattavasta **Submit Run** (Lähetä ajo) -valikosta. Näytetiedosto ja toissijaisen analyysin tukitiedostot ladataan \*.zip-kansioon, ja niitä tarvitaan ajojen alustamiseen järjestelmissä, joissa käytetään paikallista tilaa. Tämä vaihtoehto on saatavilla vain, jos analyysin sijainniksi valittiin Local (Paikallinen).

## Illumina DRAGEN -sukusolulinja

Voit määrittää Illumina DRAGEN -sukusolulinja-analyysin suorittamalla seuraavat vaiheet.

1. Valitse viitegenomi.  
Käytä mahdollisuuksien mukaan viitegenomia alt awaren kanssa.
2. Valitse kartta / kohdista tulostusmuoto.
3. Valitse, haluatko tallentaa kopion FASTQ-tiedostoista. FASTQ-tiedostot luodaan vain, jos päätät säilyttää FASTQ-tiedostot.
4. Valitse yksi seuraavista FASTQ-tulostusmuotovaihtoehdoista:
  - **gzip** — Tallenna FASTQ-tiedostot gzip-muodossa.
  - **DRAGEN** — Tallenna FASTQ-tiedostot ora-muodossa.
5. Suorita ajon määrittäminen loppuun.
  - Voit lähettää ajon määrittämisen BaseSpace Sequence Hub -tilillesi valitsemalla **Submit Run** (Lähetä ajo). BaseSpace Sequence Hubiin lähetetyt ajot tulevat näkyviin suunniteltujen ajojen luettelossa, ja ne ovat saatavilla järjestelmissä, joissa käytetään pilvi- tai hybriditilaa.
  - Voit tallentaa ajon määrittämisen näytetiedostoksi v2-tiedostomuodossa valitsemalla **Export Sample Sheet** (Vie näytetiedosto) avattavasta **Submit Run** (Lähetä ajo) -valikosta. Näytetiedosto ja toissijaisen analyysin tukitiedostot ladataan \*.zip-kansioon, ja niitä tarvitaan ajojen alustamiseen järjestelmissä, joissa käytetään paikallista tilaa. Tämä vaihtoehto on saatavilla vain, jos analyysin sijainniksi valittiin Local (Paikallinen).

## Illumina DRAGEN RNA

Voit määrittää Illumina DRAGEN RNA -analyysin suorittamalla seuraavat vaiheet.

1. Valitse viitegenomi.  
Käytä mahdollisuuksien mukaan viitegenomia ilman alt awarea.
2. Valitse kartta / kohdista tulostusmuoto.
3. Valitse, haluatko tallentaa kopion FASTQ-tiedostoista. FASTQ-tiedostot luodaan vain, jos päätät säilyttää FASTQ-tiedostot.
4. Valitse yksi seuraavista FASTQ-tulostusmuotovaihtoehdoista:
  - **gzip** — Tallenna FASTQ-tiedostot gzip-muodossa.
  - **DRAGEN** — Tallenna FASTQ-tiedostot ora-muodossa.

5. **[Valinnainen]** Lataa RNA Annotation -huomautustiedosto Gene Transfer Format (GTF) -muodossa.
  - **Paikallinen tila** — Valitse **Select Custom File (Local)** (Valitse mukautettu tiedosto (paikallinen)), jotta voit ladata yksittäisen ajon, tai **Upload Custom File (BaseSpace)** (Lataa mukautettu tiedosto (BaseSpace)) toistuvaan käyttöön.
  - **Pilvi- tai hybriditila** — Valitse **Upload Custom File (BaseSpace)** (Lataa mukautettu tiedosto (BaseSpace)). GTF -tiedosto on saatavilla vain työryhmässä, johon se on ladattu.

Kun GTF-tiedosto on ladattu BaseSpace Sequence Hub -työryhmään, valitse RNA-huomautustiedosto avattavasta valikosta.
6. Valitse, otetaanko differentiaalinen ilmentyminen käyttöön.
7. Jos differentiaalinen ilmentyminen otettiin käyttöön, valitse kontrolli- tai vertailuarvo kullekin näytteelle.

Kussakin vertailuryhmässä kaikkia kontrolleiksi merkittyjä näytteitä verrataan kaikkiin näytteisiin, jotka on merkitty vertailunäytteiksi. Mikäli näytteeseen ei sisälly kontrolli- tai vertailuarvoa, valitse arvoksi **na**.
8. Suorita ajon määrittäminen loppuun.
  - Voit lähettää ajon määrittäksen BaseSpace Sequence Hub -tilillesi valitsemalla **Submit Run** (Lähetä ajo). BaseSpace Sequence Hubiin lähetetyt ajot tulevat näkyviin suunniteltujen ajojen luettelossa, ja ne ovat saatavilla järjestelmissä, joissa käytetään pilvi- tai hybriditilaa.
  - Voit tallentaa ajon määrittäksen näytetiedostoksi v2-tiedostomuodossa valitsemalla **Export Sample Sheet** (Vie näytetiedosto) avattavasta **Submit Run** (Lähetä ajo) -valikosta. Näytetiedosto ja toissijaisen analyysin tukitiedostot ladataan \*.zip-kansioon, mikäli mukana on valinnainen GTF-tiedosto, ja niitä tarvitaan ajojen alustamiseen järjestelmissä, joissa käytetään paikallista tilaa. Tämä vaihtoehto on saatavilla vain, jos analyysin sijainniksi valittiin Local (Paikallinen).

## Illumina DRAGEN -yksisolu-RNA

Voit määrittää Illumina DRAGEN -yksisolu-RNA-analyysin suorittamalla seuraavat vaiheet.

1. Valitse viitegenomi.

Käytä mahdollisuuksien mukaan viitegenomia ilman alt awarea.
2. **[Valinnainen]** Lataa RNA Annotation -huomautustiedosto Gene Transfer Format (GTF) -muodossa.
  - **Paikallinen tila** — Valitse **Select Custom File (Local)** (Valitse mukautettu tiedosto (paikallinen)), jotta voit ladata yksittäisen ajon, tai **Upload Custom File (BaseSpace)** (Lataa mukautettu tiedosto (BaseSpace)) toistuvaan käyttöön.
  - **Pilvi- tai hybriditila** — Valitse **Upload Custom File (BaseSpace)** (Lataa mukautettu tiedosto (BaseSpace)). GTF -tiedosto on saatavilla vain työryhmässä, johon se on ladattu.

Kun GTF-tiedosto on ladattu BaseSpace Sequence Hub -työryhmään, valitse RNA-huomautustiedosto avattavasta valikosta.

3. Valitse kartta / kohdista tulostusmuoto.
4. Valitse, haluatko tallentaa kopion FASTQ-tiedostoista. FASTQ-tiedostot luodaan vain, jos päätät säilyttää FASTQ-tiedostot.
5. Valitse yksi seuraavista FASTQ-tulostusmuotovaihtoehdoista:
  - **gzip** — Tallenna FASTQ-tiedostot gzip-muodossa.
  - **DRAGEN** — Tallenna FASTQ-tiedostot ora-muodossa.
6. Valitse kokoonpano, joka vastaa tarkalleen kirjaston valmistelusarjan tyyppiä.  
Jos esimerkiksi valitsit Single Cell RNA Library Kit 1 -sarjan kirjaston valmistelusarjaksi, valitse määrittystyyppi Type 1.
7. Valitse viivakoodin read.
8. **[Valinnainen]** Muokkaa emästen määrää viivakoodeissa ja UMI:ssa. Arvot täytetään automaattisesti kirjaston valmistelusarjan ja valitsemasi määrittystyyppin perusteella.
9. Valitse säikeen suuntaus.
10. **[Valinnainen]** Valitse tiedosto, joka sisältää viivakoodisekvenssit tai lataa uusi mukautettu tiedosto.
11. Mikäli käytetään edistynyttä/mukautettua määrittystyyppiä, syötä ohitusjaksojen määrän, viivakoodin aseman sekä UMI:n aseman arvot.
12. Suorita ajon määrittäminen loppuun.
  - Voit lähettää ajon määrittäksen BaseSpace Sequence Hub -tilillesi valitsemalla **Submit Run** (Lähetä ajo). BaseSpace Sequence Hubiin lähetetyt ajot tulevat näkyviin suunniteltujen ajojen luettelossa, ja ne ovat saatavilla järjestelmissä, joissa käytetään pilvi- tai hybriditilaa.
  - Voit tallentaa ajon määrittäksen näytetiedostoksi v2-tiedostomuodossa valitsemalla **Export Sample Sheet** (Vie näytetiedosto) avattavasta **Submit Run** (Lähetä ajo) -valikosta. Näytetiedosto ja toissijaisen analyysin tukitiedostot ladataan \*.zip-kansioon, mikäli mukana on valinnainen GTF-tiedosto, ja niitä tarvitaan ajojen alustamiseen järjestelmissä, joissa käytetään paikallista tilaa. Tämä vaihtoehto on saatavilla vain, jos analyysin sijainniksi valittiin Local (Paikallinen).

## Illumina DRAGEN Amplicon

Käytä seuraavia vaiheita Illumina DRAGEN Amplicon -analyysin määrittämiseen.

1. Valitse viitegenomi.
2. Valitse \*.bed-tiedosto, joka sisältää alueet, jotka ovat kohteenasi tai joihin haluat ladata uuden mukautetun tiedoston.  
Varmista, että BED-tiedoston viitegenomi vastaa viitegenomia, joka valittiin vaiheessa 1. Käytä uuden mukautetun BED-tiedoston kohdalla seuraavaa nimeämismuotoa: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.

- **Pilvi- tai hybriditila** — Valitse **Upload Custom File (BaseSpace)** (Lataa mukautettu tiedosto (BaseSpace)). Mukautettu BED -tiedosto on saatavilla vain työryhmässä, johon se on ladattu.
  - **Paikallinen tila** — Valitse **Select Custom File (Local)** (Valitse mukautettu tiedosto (paikallinen)), jotta voit ladata yksittäisen ajon, tai **Upload Custom File (BaseSpace)** (Lataa mukautettu tiedosto (BaseSpace)) toistuvaan käyttöön.
3. Valitse joko sukusolulinja- tai somaattinen varianttitunnistin.
  4. Valitse kartta / kohdista tulostusmuoto.
  5. **[Paikallinen]** Valitse, haluatko tallentaa kopion FASTQ-tiedostoista. FASTQ-tiedostot luodaan vain, jos päätät säilyttää FASTQ-tiedostot.
  6. Valitse, haluatko tallentaa kopion FASTQ-tiedostoista. FASTQ-tiedostot luodaan vain, jos päätät säilyttää FASTQ-tiedostot.
  7. Valitse yksi seuraavista FASTQ-tulostusmuotovaihtoehdoista:
    - **gzip** — Tallenna FASTQ-tiedostot gzip-muodossa.
    - **DRAGEN** — Tallenna FASTQ-tiedostot ora-muodossa.
  8. Suorita ajon määrittäminen loppuun.
    - Voit lähettää ajon määrittäksen BaseSpace Sequence Hub -tilillesi valitsemalla **Submit Run** (Lähetä ajo). BaseSpace Sequence Hubiin lähetetyt ajot tulevat näkyviin suunniteltujen ajojen luettelossa, ja ne ovat saatavilla järjestelmissä, joissa käytetään pilvi- tai hybriditilaa.
    - **[Paikallinen]** Voit tallentaa ajon määrittäksen näytetiedostoksi v2-tiedostomuodossa valitsemalla **Export Sample Sheet** (Vie näytetiedosto) avattavasta **Submit Run** (Lähetä ajo) -valikosta. Näytetiedosto ja toissijaisen analyysin tukitiedostot ladataan \*.zip-kansioon, ja niitä tarvitaan ajojen alustamiseen järjestelmissä, joissa käytetään paikallista tilaa. Tämä vaihtoehto on saatavilla vain, jos analyysin sijainniksi valittiin Local (Paikallinen).

## Pussitetun kasetin ja virtauskyvetin sulattaminen

Tällä vaiheella sulatetaan kasetti *avaamattomassa pussissa* ja valmistellaan virtauskyvetti. Sulata pussitettu kasetti yhdellä kolmesta menetelmästä: hallittu vesihaude, jääkaappisulatus tai huoneenlämpötilassa sulattaminen. Käytä kasetti välittömästi sulatuksen jälkeen äläkä pakasta sitä uudelleen. Jos et pysty käyttämään kasettia heti sulatuksen jälkeen, katso [Tarvikkeiden palauttaminen varastoon sivulla 80](#).

Kuva 4 Pussitettu kasetti




### Sulata kasetti hallitussa vesihauteessa


1. Pue uudet puuterittomat käsineet ja poista kasetti varastosta.
2. Poista kasetti rasiasta, mutta **älä avaa hopeanväristä foliopussia**.
- ! Repeytyneen tai puhjonneen pussin sulattaminen vesihauteessa saattaa johtaa sekvensointihäiriöön. Suorita sulatus sen sijaan huoneenlämpötilassa tai jääkaapissa.
3. Sulata pussitettua kasettia hallitussa 25 °C:n vesihauteessa 6 tuntia:
  - Varmista, että veden syvyys on jatkuvasti vähintään 9,5–10 cm riippumatta siitä, kuinka monta kasettia sulatetaan.
  - Aseta lämpötilan suhteen kontrolloidun vesihauteen lämpötilaksi 25 °C.
  - Pitele pussia etiketti ylöspäin ja laita se vesihauteeseen upottamatta sitä veteen.
  - ! Älä yritä painaa kasettia alas, jotta se uppoaa nesteeseen. Ellei pussin etiketti ole ylöspäin tai jos kasetti kääntyy toisin päin sulatuksen aikana, se vaikuttaa kielteisesti sekvensointitietoihin.
  - Älä jätä pussia yli 8 tunniksi vesihauteeseen.
  - Älä sulata samaan aikaan niin paljon kasetteja, että ne eivät mahdu vesihauteeseen. Tarkista yhteensopivat vesihauteet kohdasta [Lisälaitteet sivulla 28](#).
  - Älä pinno kasetteja päällekkäin.
4. Poista kasetti vesihauteesta ja kuivaa se paperipyyhkeillä.

## Kasetin sulattaminen jääkaapissa

1. Pue uudet puuterittomat suojakäsineet.
2. Poista kasetti vuorokautta ennen odotettavissa olevaa ajoa säilytyksestä  $-25...-15$  °C:n lämpötilasta.
3. Poista kasetti rasiasta, mutta *älä avaa hopeanväristä foliopussia*.
4. Aseta kasetti huoneenlämpötilassa siten, että etiketti on ylöspäin ja ilma pääsee kiertämään kasetin sivuilta ja yläpuolelta.

 Ellei pussin etiketti ole ylöspäin, se vaikuttaa kielteisesti sekvensointitietoihin.


5. Sulata huoneenlämmössä 6 tuntia.
6. Aseta kasetti jääkaappiin  $2-8$  °C:n lämpötilassa siten, että etiketti on ylöspäin ja ilma pääsee kiertämään kasetin sivuilta.

 Ellei pussin etiketti ole ylöspäin, se vaikuttaa kielteisesti sekvensointitietoihin.

7. Sulata jääkaapissa 12 tuntia. Sulatus ei saa ylittää 72 tuntia.

## Kasetin sulatus huoneenlämpötilassa

1. Pue uudet puuterittomat suojakäsineet.
2. Ota kasetti  $-25...-15$  °C:n säilytyspaikasta.
3. Poista kasetti rasiasta, mutta *älä avaa hopeanväristä foliopussia*.
4. Aseta kasetti siten, että etiketti on ylöspäin ja ilma pääsee kiertämään kasetin sivuilta ja yläpuolelta.

 Ellei pussin etiketti ole ylöspäin, se vaikuttaa kielteisesti sekvensointitietoihin.

5. Sulata huoneenlämmössä 9 tuntia. Sulatus ei saa ylittää 16 tuntia.

## Valmistele virtauskyvetti ja kasetti

1. Valmistele virtauskyvetti seuraavasti.
  - a. Ota uusi virtauskyvetti  $2-8$  °C:n säilytyksestä.
  - b. Aseta avaamaton pakkaus sivuun huoneenlämpötilassa 10–15 minuutiksi kondensaation estämiseksi, kun virtauskyvetti poistetaan pakkauksesta. Virtauskyvetin valmistelulla tässä vaiheessa varmistetaan, että se saavuttaa huoneenlämpötilan ajoissa.
2. Mikäli sulatus suoritetaan jääkaapissa:
  - a. Ota sulanut kasetti  $2-8$  °C:n säilytyspaikasta.
  - b. Aseta avaamaton kasetti huoneenlämpötilassa sivuun vähintään 15 minuutiksi ennen sekvensointia. Odota enintään 1 tunti.



## Kirjastojen laimennus

Mikäli käytetään onboard-denaturointia ja laimennusta, tässä vaiheessa laimennetaan kirjastot sovellettavaan latauspitoisuuteen. Valinnainen 2 %:n PhiX<sup>1</sup> spike-in tarjoaa käyttöön lisämittareita, emästen monimuotoisuuden tai positiivisen kontrollin. PhiX spike-in -prosenttiosuutta on lisättävä sellaisten kirjastojen kohdalla, joiden emästen monimuotoisuus on alhaisempi.

Mikäli kirjastojen denaturointi ja laimennus suoritetaan manuaalisesti, käytä *NextSeq 1000- ja 2000 -denaturointi- ja laimennusopasta kirjastoille (asiakirjanro 1000000139235)*. Tämä vaihe koskee vain onboard-denaturointia ja laimennusta.

### Kirjaston laimentaminen 2 nM:iin

- [Valinnainen] Ota 10 nM:n PhiX-kanta –25...–15 °C:n säilytyspaikasta. PhiX on tarpeen vain valinnaista spike-iniä tai pelkkää PhiX-ajoa varten.
- [Valinnainen] Sulata PhiXiä huoneenlämpötilassa 5 minuuttia ja kvantifioi sitten Qubitin kaltaisella fluoresenssipohjaisella menetelmällä PhiX pitoisuuden vahvistamiseksi. Mikäli kvantifiointi ei ole mahdollista, jatka 10 nM:n pitoisuudella.
- Vorteksoi kirjasto tai PhiX lyhyesti ja linkoa sitten 280 × g:llä yksi minuutti.
- Käytä RSB:tä, jossa on Tween 20 laimennusaineena ja valmista vähintään 24 µl 2 nM:n kirjasto mikroputkessa, jossa sitoutuminen putkeen on minimoitu. Katso PhiX spike-in -ohjeet kohdasta [PhiX Controlin lisääminen \(valinnainen\) sivulla 43](#).
- Vorteksoi lyhyesti ja linkoa sitten 280 × g:llä yksi minuutti.

### 2 nM:n kirjaston laimentaminen latauspitoisuuteen

- Valmista sopivaan latauspitoisuuteen laimennettu 24 µl:n kirjasto yhdistämällä seuraavat määrät mikroputkessa, jossa sitoutuminen putkeen on minimoitu:

Kirjastotyyppi*	Latauspitoisuus (pM)	2 nM:n kirjastomäärä (µl)	RSB, jossa Tween 20, määrä (µl)
Ampliseq for Illumina Library PLUS	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15
Illumina DNA Prep rikastuksella	1000	12	12

<sup>1</sup>PhiX on pieni, käyttövalmis Illumina-kirjasto, jossa on tasapainotettu nukleotidiedustus.

Kirjastotyyppi*	Latauspitoisuus (pM)	2 nM:n kirjastomäärä (µl)	RSB, jossa Tween 20, määrä (µl)
Illumina Stranded Total RNA ja Ribo-Zero Plus	750	9	15
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA PCR-Free	1000	12	12
TruSeq DNA Nano 350	1200	14,4	9,6
TruSeq DNA Nano 550	1500	18	6
TruSeq Stranded mRNA	1000	12	12
100 % PhiX	650	7,8	16,2

\* Luettelemattomien kirjastotyyppien tapauksessa aloita 650 pM:n latauspitoisuudella ja optimoi pitoisuus seuraavien ajojen aikana.

Tässä taulukossa on esimerkkejä latauspitoisuuksista. NextSeq 1000/2000 -järjestelmä on yhteensopiva kaikkien Illumina-kirjaston valmisteluserjojen kanssa, mutta optimaalinen latauspitoisuus voi vaihdella.

- Vorteksoi lyhyesti ja linkoa sitten 280 × g:llä yksi minuutti.
- Aseta laimennettu kirjasto jäihin, kunnes se on valmis sekvensointiin. Sekvensointikirjastot laimennetaan latauspitoisuuteen samana päivänä, jona ne laimennetaan.
- Menettele seuraavasti.
  - Jos lisäät PhiX:n, katso kohta [PhiX Controlin lisääminen \(valinnainen\) sivulla 43](#).
  - Jos et lisää PhiXiä tai suoritat pelkän PhiX-ajon, katso kohta [Tarvikkeiden lataaminen kasettiin sivulla 44](#).

### PhiX Controlin lisääminen (valinnainen)

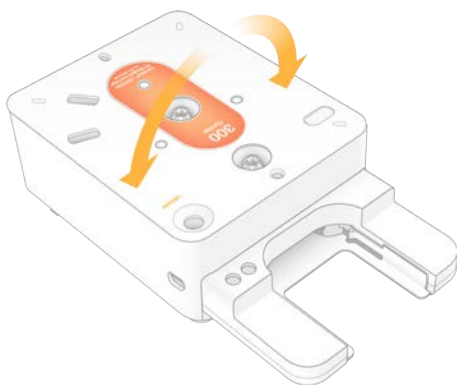
- Valmista 20 µl 1 nM:n PhiX:ää yhdistämällä seuraavat määrät mikroputkessa, jossa sitoutuminen putkeen on minimoitu:
  - 10 nM PhiX (2 µl)
  - RSB, jossa on Tween 20 (18 µl)
- Vorteksoi lyhyesti ja linkoa sitten 280 × g:llä yksi minuutti.
- Lisää 1 µl 1 nM PhiXiä 24 µl:n kirjastoon, joka on laimennettu lopulliseen laimennuspitoisuuteen. Näiden tilavuuksien tuloksena on ~2 %:n PhiX spike-in. Todellinen prosenttiosuus vaihtelee kirjaston laadun ja määrän mukaan.
- Aseta kirjasto sivuun pitäen PhiX-spike-iniä jäissä, kunnes se on valmis sekvensointiin. Sekvensoi kirjastot, joissa on PhiX spike-in, samana päivänä kuin ne on laimennettu.

## Tarvikkeiden lataaminen kasettiin

Tällä vaiheella kasetti valmistellaan sekvensointia varten sekoittamalla ennalta sekoitetut reagenssit ja lataamalla laimennetut kirjastot ja virtauskyvetti.

### Kasetin valmistelu

1. Avaa kasettipussi repimällä tai leikkaamalla saksilla ylälovesta molemmilta puolilta.
2. Poista kasetti pussista. Hävitä pussi ja kuivausaine.
3. Käännä kasettia 10 kertaa reagenssien sekoittamiseksi.  
Sisäisistä ainesosista voi lähteä ääntä kääntämisen aikana, mikä on normaalia.



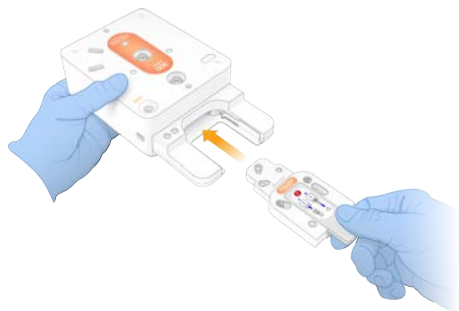
### Virtauskyvetin lataus

1. Avaa hopeanväriinen foliopakkaus repimällä tai leikkaamalla saksilla yläviillosta molemmilta puolilta. Jos et pysty käyttämään virtauskyvettä heti sulatuksen jälkeen, katso [Tarvikkeiden palauttaminen varastoon sivulla 80](#).
2. Vedä virtauskyvetti ulos pakkauksesta. Siirrä foliopakkaus ja kuivausaine syrjään siltä varalta, että virtauskyvetti on palautettava varastoon. Kuivausaine on pussissa foliopakkauksen pohjalla. Hävitä ne, kun sekvensointi alkaa.

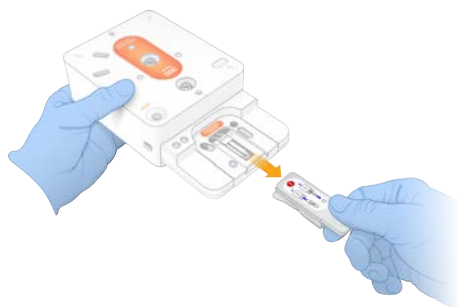


3. Pidä kiinni virtauskyvetin harmaasta liuskasta niin, että liuskan merkinnät ovat ylöspäin.

4. Työnnä virtauskyvetti kasetin etuosassa olevaan aukkoon.  
Kuultava loksahdus ilmoittaa, että virtauskyvetti on oikein paikoillaan. Kun lataus on suoritettu oikein, harmaa liuska työntyy esiin kasetista.



5. Vedä sitä taaksepäin ja poista harmaa liuska, jotta virtauskyvetti tulee esiin. Kierrätä liuska.



## Kirjastojen lataaminen

1. Puhkaise uudella P1000-pipetinkärjellä kirjaston säiliö ja työnnä folio kulmiin aukon suurentamiseksi.
2. Hävitä pipetinkärki kontaminaation estämiseksi.

3. Lisää 20 µl laimennettua kirjastoliuosta säiliön *pohjaan* laskemalla pipetin kärki hitaasti säiliön pohjaan ennen annostelua. Vältä koskemasta folioon.



## Sekvensointiajon alustaminen


Tällä vaiheella alustetaan sekvensointiajo yhdessä neljästä tilasta:

- **Pilvilita** — Ajo valitaan suunniteltujen ajojen luettelosta NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistossa. Sekvensoinnin aikana cBCL-tiedot ladataan BaseSpace Sequence Hubiin. Sekvensoinnin jälkeen DRAGEN käynnistyy automaattisesti BaseSpace Sequence Hubissa.
- **Hybriditila** — Ajo valitaan NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistossa suunniteltujen ajojen luettelosta. Sekvensoinnin jälkeen instrumenttianalyysi käynnistetään automaattisesti. cBCL-tietoja ja DRAGENin toissijaisen analyysin tulostustiedostoja säilytetään valitussa tulostuskansiossa.
- **Paikallinen tila** — Näytetiedosto, joka on v2-tiedostomuodossa, tuodaan manuaalisesti NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistoon. Sekvensoinnin jälkeen instrumenttianalyysi käynnistetään automaattisesti. cBCL-tietoja ja DRAGENin toissijaisen analyysin tulostustiedostoja säilytetään valitussa tulostuskansiossa. Mikäli Proactive, Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) on valittu, analyysi voidaan myös alustaa BaseSpace Sequence Hub -sovelluksen kautta sekvensoinnin valmistuttua.
- **Erillistila** — Määritä ajo ja noudata NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston ohjeita cBCL-tietojen luomiseksi.

⚠ | Visiirin avaaminen ajoa edeltävän tarkistuksen tai ajon aikana voi aiheuttaa ajon epäonnistumisen.

⚠ | Pidä kädet poissa instrumentista visiirin avauksen ja sulkemisen aikana vammojen välttämiseksi.

## Pilvi- tai hybridiajon alustaminen

1. Määritä ajotila niin kuin on kuvattu kohdassa [Ajotilan määrittäminen sivulla 20](#).
  2. Valitse **Start** (Aloita).
  3. Syötä BaseSpace Sequence Hub -tunnuksesi ja valitse sitten **Sign In** (Kirjaudu sisään).
  4. Mikäli valitsit Proactive, Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) -vaihtoehdon, valitse Workgroup (Työryhmä), joka sisältää BaseSpace Sequence Hubin Instrument Run Setup (Laitteajon asetukset) -kohdassa luodun ajon.
-  Työryhmä on valittava virheiden välttämiseksi. Varmista ennen jatkamista, että työryhmä on valittu.
5. Valitse **Next** (Seuraava).
  6. Valitse ajo.
  7. Vahvista, että Analysis (Analyysi)-, Run Length (Ajon pituus)- ja Secondary Analysis (Toissijainen analyysi) -versio vastaa oikeaa ajoa.  
Analyysissä näytetään Cloud\_ merkiksi siitä, että analyysi suoritetaan BaseSpace Sequence Hubissa.
  8. Valitse **Review** (Tarkista).
  9. **[Valinnainen]** Syötä mukautettu readin alue ja mukautetun indeksin alukkeen sijainnit.  
Tietoja mukautettujen alukkeiden valmistelusta ja lisäämisestä on *NextSeq 1000:n ja 2000:n mukautetut alukkeet -oppaassa (asiakirjanro 1000000139569)*. Suosittelemme kirjaston valmisteluserjan kohdalla ehdottomasti vierailua Yhteensopivat tuotteet -sivulla, jotta voit tarkistaa, tarvitaanko Illuminan mukautettuja alukkeita.
  10. **[Valinnainen]** Valitse mukautettu resepti. Lisätietoja on kohdassa [Pimeän jakson sekvensointi sivulla 99](#) (Pimeän jakson sekvensointi)  
Mikäli käytetään NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston versiota v1.3 ja Illumina Stranded Total RNA Prep -valmistetta sekä Ribo-Zero Plus -sarjaa tai Illumina Stranded mRNA Prep -sarjaa, mukautettu resepti valitaan automaattisesti.
  11. **[Valinnainen]** Jotta voit manuaalisesti denaturoida ja laimentaa kirjastoja, poista **Denature and Dilute On Board** (Denaturoi ja laimenna levyllä) -valintaruudun valinta. Katso *NextSeq 1000- ja 2000 -denaturointi- ja laimennusopas kirjastoille (asiakirjanro 1000000139235)*.  
Oletusarvoinen valinta määritetään NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston asetuksissa.
  12. **[Valinnainen]** Voit muuttaa tulostuskansiota valitsemalla Output Folder (Tulostuskansio) -kentän ja syöttämällä uuden sijainnin.  
Output Folder (Tulostuskansio) -kenttä täytetään automaattisesti oletusasetuksista, ja se on pakollinen, ellei **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) ole valittuna.  
Jos valittiin Proactive and Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus), Save to BaseSpace Sequence Hubissa näytetään Disabled (Pois käytöstä).

Jos valittiin Proactive and Run Monitoring (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta), Save to BaseSpace Sequence Hubissa näytetään Disabled (Pois käytöstä).

13. Tarkista ajotietosi ja valitse sen jälkeen **Prep** (Valmistelu).

## Paikallisen ajon alustaminen

1. Määritä ajotila niin kuin on kuvattu kohdassa [Ajotilan määrittäminen sivulla 20](#).
2. Valitse **Start** (Aloita).
3. Jos valittiin Proactive and Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) tai Proactive and Run Monitoring (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta), syötä tunnuksesi BaseSpace Sequence Hubissa ja valitse sitten **Sign In** (Kirjaudu sisään).
4. Mikäli valitsit Proactive, Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) -vaihtoehdon, valitse BaseSpace Sequence Hub -työryhmä ajon tallentamiseen ja valitse sitten **Next** (Seuraava).



Työryhmä on valittava virheiden välttämiseksi. Varmista ennen jatkamista, että työryhmä on valittu.

5. Valitse **Choose...** (Valitse...) kohdasta Start With Sample Sheet (Aloita näytetiedostolla) ja navigoi v2-muotoiseen näytetiedostoon NextSeq 1000/2000 -instrumentissa, siirrettävässä asemassa tai asennetussa verkkoasemassa. Näytetiedoston nimissä ei saa olla erikoismerkkejä. NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston versio v1.3 havaitsee automaattisesti DRAGEN-version näytetiedostosta ja kehottaa sinua tarvittaessa vaihtamaan versiota. DRAGEN-version on oltava asennettuna järjestelmään. Katso asennustiedot kohdasta [Ohjelmistopäivitykset sivulla 74](#) (Ohjelmistopäivitykset).
  - **Instrument Run Setup Used** (Laitteajon asetuksia käytetty) — Valitse .zip-kansio, johon sisältyy näytetiedosto v2 ja soveltuvin osin tukitiedostot. Valitse muussa tapauksessa näytetiedosto v2.
  - **Instrument Run Setup Not Used** (Laitteajon asetuksia ei käytetty) — Varmista, että toissijaisen analyysin tukitiedosto sijaitsee samassa hakemistossa kuin näytetiedosto v2.



Valitun näytetiedoston on oltava v2-muodossa. Voit luoda näytetiedoston v2 lataamalla luodun näytetiedoston BaseSpace Sequence Hubin Instrument Run Setup (Laitteajon asetukset) -kohdasta tai muokata näytetiedoston v2 mallinetta, joka on tarjolla NextSeq 1000/2000 -tukisivulla. Lisätietoja näytetiedoston v2 formatoinnista ja vaatimuksista on [Näytetiedoston v2 asetukset sivulla 85](#) -kohdassa. Varmista, että kaikki näytetiedostossa viitattut tiedostot sijaitsevat samassa kansiossa kuin näytetiedosto.

6. Valitse **Review** (Tarkista).
7. **[Valinnainen]** Syötä mukautettu readin alue ja mukautetun indeksin alukkeen sijainnit.

Tietoja mukautettujen alukkeiden valmistelusta ja lisäämisestä on *NextSeq 1000:n ja 2000:n mukautetut alukkeet -oppaassa (asiakirjanro 1000000139569)*. Suosittelemme kirjaston valmistelusarjan kohdalla ehdottomasti vierailua Yhteensopivat tuotteet -sivulla, jotta voit tarkistaa, tarvitaanko Illuminan mukautettuja alukkeita.

8. **[Valinnainen]** Valitse mukautettu resepti. Lisätietoja on kohdassa [Pimeän jakson sekvensointi sivulla 99](#)  
Mikäli käytetään NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston versiota v1.3 ja Illumina Stranded Total RNA Prep -valmistetta sekä Ribo-Zero Plus -sarjaa tai Illumina Stranded mRNA Prep -sarjaa, mukautettu resepti valitaan automaattisesti.
9. **[Valinnainen]** Jotta voit manuaalisesti denaturoida ja laimentaa kirjastoja, poista **Denature and Dilute On Board** (Denaturoi ja laimenna levyllä) -valintaruudun valinta. Katso *NextSeq 1000- ja 2000 -denaturointi- ja laimennusopas kirjastoille (asiakirjanro 1000000139235)*.  
Oletusarvoinen valinta määritetään NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston asetuksissa.
10. **[Valinnainen]** Voit muuttaa tulostuskansiota valitsemalla Output Folder (Tulostuskansio) -kentän ja syöttämällä uuden sijainnin.  
Output Folder (Tulostuskansio) -kenttä täytetään automaattisesti oletusasetuksista, ja se on pakollinen, ellei Proactive, Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) ole valittuna.  
Jos valittiin Proactive and Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus), Save to BaseSpace Sequence Hubissa näytetään Disabled (Pois käytöstä).  
Jos valittiin Proactive and Run Monitoring (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta), Save to BaseSpace Sequence Hubissa näytetään Disabled (Pois käytöstä).
11. Tarkista ajotietosi ja valitse sen jälkeen **Prep** (Valmistelu).

## Erillisen ajon alustaminen

1. Määritä ajotila niin kuin on kuvattu kohdassa [Ajotilan määrittäminen sivulla 20](#).
2. Valitse **Start** (Aloita).
3. Jos valittiin Proactive and Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) tai Proactive and Run Monitoring (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta), syötä tunnuksesi BaseSpace Sequence Hubissa ja valitse sitten **Sign In** (Kirjaudu sisään).
4. Mikäli valitsit Proactive, Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) -vaihtoehdon, valitse BaseSpace Sequence Hub -työryhmä ajon tallentamiseen ja valitse sitten **Next** (Seuraava).
5. Valitse **Set Up New Run** (Määritä uusi ajo).
6. Syötä Run Name (Ajon nimi) -kenttään haluamasi yksilöllinen nimi nykyisen ajon tunnistamista varten.  
Ajon nimessä voi olla aakkosnumeerisia merkkejä, ajatusviivoja, yhdysviivoja ja alaviivoja.



7. Valitse read-tyypin mukaan kuinka monta sekvensoinnin readia suoritetaan:
  - **Single Read** – Suorita yksi read, mikä on helpompi ja nopeampi vaihtoehto.
  - **Paired End** – Suorita kaksi readia, joiden välinen yhtenäisyys luo korkealaatuisempia tietoja ja antaa tarkemman kohdistuksen.
8. Syötä jokaisessa readissa suoritettujen jaksojen määrä:  
 Indeksijaksojen enimmäismäärää ei ole, mutta read-jaksojen ja indeksijaksojen summan on oltava pienempi kuin kasettimerkinnässä ilmoitettujen jaksojen määrä, johon on lisätty 27.

**Read 1**— Syötä **1–151** jaksoa.

**Index 1** – Syötä jaksomäärä, jota indeksin 1 (i7) aluke edellyttää. Pelkän PhiX-ajon tapauksessa syötä molempiin indeksikenttiin **0**.

**Index 2** – Syötä jaksomäärä indeksin 2 (i5) alukkeelle.

**Read 2** – Syötä enintään **151** jaksoa. Tämä arvo on tavallisesti sama kuin Read 1 -arvo.

9. Jos valittiin Proactive, Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajon valvonta sekä tallennus), valitsemalla **Choose...** (Valitse...) voit tuoda näytetiedoston.  
 NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston versio v1.3 havaitsee automaattisesti DRAGEN-version näytetiedostosta ja kehottaa sinua tarvittaessa vaihtamaan versiota. DRAGEN-version on oltava asennettuna järjestelmään. Katso asennustiedot kohdasta [Ohjelmistopäivitykset sivulla 74](#) (Ohjelmistopäivitykset).

**i** | Valitun näytetiedoston on oltava v2-muodossa. Voit luoda näytetiedoston v2 lataamalla luodun näytetiedoston BaseSpace Sequence Hubin Instrument Run Setup (Laitteen asetukset) -kohdasta tai muokata näytetiedoston v2 mallinetta, joka on tarjolla NextSeq 1000/2000 -tukisivulla. Lisätietoja näytetiedoston v2 formatoinnista ja vaatimuksista on [Näytetiedoston v2 asetukset sivulla 85](#) (Näytetiedoston v2 asetukset) -kohdassa. Varmista, että kaikki näytetiedostossa viitatus tiedostot sijaitsevat samassa kansiossa kuin näytetiedosto.

10. **[Valinnainen]** Syötä mukautettu readin aluke ja mukautetun indeksin alukkeen sijainnit.  
 Tietoja mukautettujen alukkeiden valmistelusta ja lisäämisestä on *NextSeq 1000:n ja 2000:n mukautetut alukkeet -oppaassa (asiakirjanro 1000000139569)*. Suosittelemme kirjaston valmisteluserjan kohdalla ehdottomasti vierailua Yhteensopivat tuotteet -sivulla, jotta voit tarkistaa, tarvitaanko Illuminan mukautettuja alukkeita.
11. **[Valinnainen]** Valitse mukautettu resepti. Lisätietoja on kohdassa [Pimeän jakson sekvensointi sivulla 99](#)
12. **[Valinnainen]** Jotta voit manuaalisesti denaturoida ja laimentaa kirjastoja, poista **Denature and Dilute On Board** (Denaturoi ja laimenna levyllä) -valintaruudun valinta. Katso *NextSeq 1000- ja 2000 -denaturointi- ja laimennusopas kirjastoille (asiakirjanro 1000000139235)*.  
 Oletusarvoinen valinta määritetään NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston asetuksissa.
13. **[Valinnainen]** Voit muuttaa tulostuskansiota valitsemalla Output Folder (Tulostuskansio) -kentän ja syöttämällä uuden sijainnin.

Output Folder (Tulostuskansio) -kenttä täytetään automaattisesti oletusasetuksista, ja se on pakollinen, ellei Proactive, Run Monitoring and Storage (Ennakoiva valvonta ja ajonvalvonta sekä tallennus) ole valittuna.

14. Valitse **Prep** (Valmistelu).

### Tarvikkeiden lataaminen laitteeseen

1. Varmista, että kasetti on aiemmin sulatettu ja käännetty 10 kertaa sekoittamista varten ennen virtauskyvetin ja laimennetun kirjaston lataamista (harmaa liuska poistettu).
2. Valitse **Load** (Lataa).  
NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmisto avaa visiirin ja poistaa alustan.
3. Aseta kasetti alustalle siten, että merkintä on ylöspäin ja virtauskyvetti on laitteen sisällä. Työnnä kasettia, kunnes se lukitaan paikalleen.



4. Voit vetää kasetin takaisin ja sulkea visiirin valitsemalla **Close** (Sulje).  
NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistossa näytetään kuvattujen tarvikkeiden tiedot ~3 minuutin kuluttua.
5. [Valinnainen] Voit poistaa kasetin valitsemalla **Eject Cartridge** (Poista kasetti).  
Visiiri avataan 1 minuutin kuluttua ja kasetti poistetaan.
6. Valitse **Sequence** (Sekvenssi).

### Ajoa edeltävät tarkistukset

Ajoa edeltävät tarkistukset sisältävät laitteen tarkistuksen, jota seuraa fluidistorijärjestelmän tarkistus. Fluidistorijärjestelmän tarkistuksessa kasetin sinetit puhkaistaan, jolloin instrumentista kuuluu 3–4 poksahdusääntä. Tämä on normaalia. Reagenssi viedään nyt virtauskyvetin läpi.

- ⚠️ Tarvikkeita ei voida käyttää uudelleen sen jälkeen, kun fluidistorijärjestelmän tarkistus on aloitettu.

1. Odota noin 15 minuuttia, että ajoa edeltävät tarkistukset ovat valmiit.  
Ajo käynnistyy automaattisesti, kun tarkistus suoritetaan onnistuneesti.
2. Jos laitteen tarkistuksen aikana tapahtuu virhe, valitse **Retry** (Yritä uudelleen) tarkistuksen toistamiseksi.  
Kun tarkistus on käynnissä, tarkistuksen edistymistä osoittava ympyrä näytetään.
3. Toistuvien virheiden vianmäärityksestä annetaan tietoja kohdassa [Virheviestien ratkaiseminen sivulla 79](#) (Virheviestien ratkaiseminen).

## Ajon edistymisnäyttö

1. Voit seurata ajon edistymistä ja mittaustietoja suorana sekvensointinäytöstä.
  - **Arvioitu ajon valmistuminen** – Ajon valmistumisen likimääräinen päivämäärä ja kellonaika.  
Arvioitu ajon valmistumisen mittaustiedot edellyttää 10 aiempaa ajoa, jotta voidaan laskea ajon tarkka valmistumisaika.
  - **Keskiarvo %Q30** — Emästen tunnistamisten keskimääräinen prosenttiosuus ja Q-pistemäärä  $\geq 30$ .
  - **Projisoitu tuotto** – Ajon tunnistettujen emästen odotettu määrä.
  - **PF-readit yhteensä** — Suodatuksen läpäisevien paired end -klustereiden määrä (soveltuvin osin, miljoonina).
  - **Reaaliaikainen Demux** — Demultipleksoinnin tila alustettuna Read 2:n alusta sen jälkeen, kun Read 1-, Index 1- ja Index 2 -jaksot on suoritettu loppuun. Tilana näkyy Complete (Valmis), vaikka indeksijaksoja ei ole suoritettu. Ei saatavilla pilvitilan ajoissa.
  - **Reaaliaikainen kohdistus** — Read 1 -kohdistuksen tila alustettuna Read 2:n alusta sen jälkeen, kun Read 1-, Index 1- ja Index 2 -jaksot on suoritettu loppuun. Ei saatavilla pilvitilan ajoissa.Q30 ja tuoton mittaustiedot näytetään jakson 26 jälkeen (~6 tuntia ajon käynnistämisen jälkeen).
2. Jos haluat seurata ajon edistymistä, valitse ohjausohjelmiston valikko ja valitse sitten **Process Management** (Prosessinhallinta).
3. Voit peruuttaa ajon valitsemalla **End Run** (Päätä ajo). Saat lisätietoja ajojen peruuttamisesta kohdasta [Ajon peruuttaminen sivulla 80](#) (Peruuta ajo).
4. Poista tarvikkeet instrumentista. Poista kasetti instrumentista 3 vuorokauden kuluessa.

## Tarvikkeiden purkaminen

1. Kun sekvensointi on valmis, valitse **Eject Cartridge** (Poista kasetti).  
Ohjelmisto poistaa käytetyn kasetin laitteesta.
2. Poista kasetti alustalta.
3. Ota virtauskyvetti kasetista.
4. Hävitä elektroniikkaosia sisältävä virtauskyvetti alueellisten sovellettavien määräysten mukaisesti.

5. [Valinnainen] Poista tyhjennystulppa Illumina-logon alapuolelta kasetin sivulta asianmukaiselta alueelta (l. pesualtaasta tai ongelmajätessä) niin, että tulppa on vaakasuorassa tai alaspäin, pois päin kasvoistasi. Tyhjennä käytetyt reagenssit alueellisten sovellettavien määräysten mukaisesti. Tyhjennysaika riippuu kasetin koosta, mikäli reagenssin automaattinen tyhjennys ei ole käytössä.

**!** Tämä reagenssisarja sisältää mahdollisesti vaarallisia kemikaaleja. Henkilövahinkoja voi aiheutua hengittämisestä, nielemisestä sekä iho- ja silmäkosketuksesta. Käytä altistumisriskiä vastaavia henkilönsuojaimia, kuten silmiensuojaimia, suojakäsineitä ja laboratoriotakkia. Käsittele käytettyjä reagensseja kemiallisena jätteenä ja hävitä ne sovellettavien alueellisten, kansallisten ja paikallisten lakien ja säädösten mukaisesti. Katso ympäristöä, terveyttä ja turvallisuutta koskevia lisätietoja käyttöturvallisuustiedotteesta osoitteessa [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

6. Hävitä reagenssikasetti.  
Ajon jälkeinen pesu ei ole tarpeellinen, koska fluidistorijärjestelmät poistetaan kasetin mukana.
7. Valitse **Close Door** (Sulje kansi) ladataksesi alustan uudelleen ja palataksesi aloitusnäyttöön.  
Ohjelmisto lataa alustan automaattisesti uudelleen ja anturit vahvistavat, että kasetti on poistettu.

## Kasettialustan puhdistus

Kasettialusta on puhdistettava vain, jos reagenssia on vuotanut kasettialustalle.

1. Poista kasetti instrumentista.
2. Pue uudet puuterittomat käsineet ja mahdolliset lisäsuojavaatteet.
3. Suihkuta 10-prosenttista kloriittiliuosta liinaan.
4. Pyyhi kasettialusta liinalla ja poista sitten kloriittiliuos heti lujatekoisella pyyhkeellä.  
Kloriitti töhrii kasettialustan, ellei sitä poisteta välittömästi.
5. Suihkuta 70-prosenttista etanoliliuosta kasettialustalle ja poista se heti lujatekoisella pyyhkeellä.
6. Laita kasetti takaisin latausasentoon.

# Sekvensoinnin tulos

Tässä osiossa kuvataan Real-Time Analysis -ohjelmistoa, jolla suoritetaan emästen tunnistaminen, määritetään laatu pistemäärät ja tulostetaan tiedot. Lue erilaisista tulostustiedostotyypeistä ja siitä, mistä ne löytyvät ajon jälkeen.

## Real-Time Analysis -ohjelmiston yleiskatsaus

NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmissä ajetaan RTA3, jolla pannaan toimeen Real-Time Analysis -ohjelmisto, instrumentin Compute Engine (CE) -moottorissa. RTA3 poimii intensiteettejä kamerasta saaduista kuvista, suorittaa emäksen tunnistuksia, määrittää emäksen tunnistuksille laatu pistemäärän, suorittaa kohdistuksen PhiXiin ja raportoi InterOp-tiedostojen tietoja tarkasteltavaksi laitteen ohjausohjelmistossa.

Käsittelyajan optimoimiseksi RTA3 tallentaa tiedot muistiin. Jos RTA3 päätetään, käsittelyä ei jatketa, ja mahdolliset muistissa käsitellyt ajotiedot menetetään.

### RTA3-syötteet

RTA3 edellyttää käsittelyä varten paikallisen järjestelmän muistissa olevia ruutukuvia. RTA3 vastaanottaa ajotietoja ja komentoja ohjausohjelmistosta.

### RTA3-tulosteet

Kunkin värikanavan kuvat siirretään RTA3:n muistiin ruutuina. RTA3 tuottaa tulostuksen näistä kuvista laadun perusteella pisteytettävänä emäksen tunnistamistiedostojen ja suodatintiedostojen joukkona. Kaikki muut tulosteet ovat tukitiedostoja.

Tiedostotyyppi	Kuvaus
Emästen tunnistamistiedostot	Jokainen analysoitava ruutu sisällytetään ketjutettuun emäksen tunnistamistiedostoon (*.cbcl). Saman kaistan ja pinnan ruudut kootaan 1 *.cbcl-tiedostoon kutakin kaistaa ja pintaa kohti.
Suodatintiedostot	Jokaisesta ruudusta luodaan suodatintiedosto (*.filter), joka määrittää, läpäiseekö klusteri suodattimet.
Klusterien sijaintitiedostot	Klusterien sijaintitiedosto (*.locs) sisältää ruudun jokaisen klusterin X- ja Y-koordinaatit. Klusterien sijaintitiedosto luodaan jokaiselle ajolle.

Tulostustiedostoja käytetään DRAGENissa ja BaseSpace Sequence Hubissa tapahtuvaan jälkianalysointiin.

## Virheiden käsittely

RTA3 luo lokitiedostot ja kirjoittaa ne Logs-kansioon. Virheet kirjataan tekstitiedostoon \*.log-tiedostomuodossa.

Seuraavat lokitiedostot siirretään lopulliseen tulostuskohteeseen prosessin lopussa:

info\_00000.log-tiedostossa tiivistetään tärkeitä ajotapahtumia.

error\_00000.log sisältää luettelon ajon aikana tapahtuneista virheistä.

warning\_00000.log sisältää luettelon ajon aikana ilmoitetuista varoituksista.

## Virtauskyvetin ruudut

Ruudut ovat pieniä kuvantamisalueita virtauskyvetissä. Kamera ottaa yhden kuvan ruutua kohti.

NextSeq 1000/2000 P2 -virtauskyvetissä on yhteensä 132 ruutua. NextSeq 1000/2000 P3 -virtauskyvetissä on yhteensä 264 ruutua.

Taulukko 5 Virtauskyvetin ruudut

Virtauskyvetin osa	NextSeq 1000/2000 P2 - virtauskyvetti	NextSeq 1000/2000 P3 - virtauskyvetti	Kuvaus
Kaistat	1	2	Kaistat ovat optisesti erillisiä, mutta ne eivät ole fluidistorisesti erillisiä kanavia.
Pinnat	2	2	P2- ja P3-virtauskyvetti kuvataan kahdella pinnalla, ylä- ja alapinnalla. Ruudun yläpinta kuvataan ensin.
Pyyhkäisyypinnat kaistaa kohden	6	6	Pyyhkäisyypinta on sarake virtauskyvetin kaistassa.
Ruutuja pyyhkäisyypintaa kohti	11	11	Ruutu on osa pyyhkäisyypintaa ja kuvaa kuvannettua aluetta virtauskyvetissä.
Ruutuja luotu yhteensä	132	264	Kaistat × pinnat × pyyhkäisyypinnat × ruudut pyyhkäisyypintaa kohti vastaavat ruutujen kokonaismäärää.

## Ruudun nimeäminen

Ruudun nimi on nelinumeroinen luku, joka edustaa ruudun asemaa virtauskyvetissä. Esimerkiksi ruudun nimi 1205 viittaa yläpintaan, pyyhkäisyypinta 2, ruutu 05.

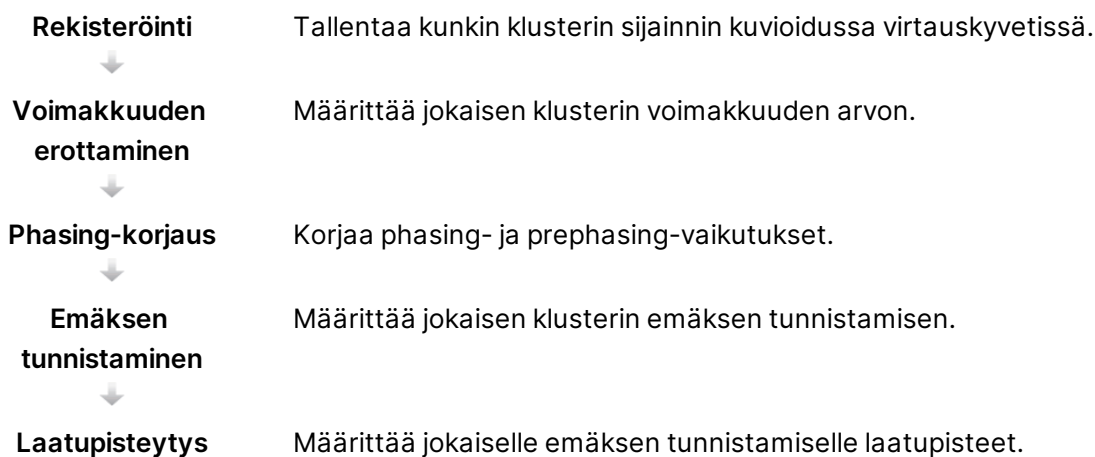
Ensimmäinen luku edustaa pintaa: 1 yläpintaa ja 2 alapintaa.

Toinen luku edustaa pyyhkäisyypinnan numeroa: 1, 2, 3, 4, 5 tai 6.

Viimeiset kaksi lukua edustavat ruudun numeroa. Pyyhkäisynumeroiden 1–4 kohdalla numerointi alkaa numerosta 01 virtauskyvetin poistopäässä ja päättyy numeroon 11 sisääntulopäässä.

Pyyhkäisynumeroiden 5–6 kohdalla numerointi alkaa numerosta 01 virtauskyvetin sisääntulopäässä ja päättyy numeroon 11 poistopäässä.

## Real-Time Analysis -ohjelmiston työnkulku



### Rekisteröinti

Rekisteröinnillä kuva kohdistetaan kierrettyyn neliömäiseen nanokaivoryhmään kuvioidussa virtauskyvetissä. Nanokaivojen järjestyksen vuoksi kunkin klusterin X - ja Y -koordinaatit ovat ruudussa ennalta määritettyjä. Klusterin asemat kirjoitetaan kussakin ajossa klusterin sijaintitiedostoon (s.locs).

Jos rekisteröinti epäonnistuu jakson jossakin kuvassa, emäksiä ei tunnisteta kyseiselle ruudulle tässä jaksossa. Käytä Sequencing Analysis Vieweriä sellaisten kuvien tunnistamiseen, jotka eivät läpäisseet rekisteröintiä.

### Voimakkuuden erottaminen

Rekisteröinnin jälkeen voimakkuuden erottamisella lasketaan tietyn kuvan kunkin nanokaivon voimakkuusarvo. Mikäli rekisteröinti epäonnistui, kyseisen ruudun voimakkuutta ei voida erottaa.

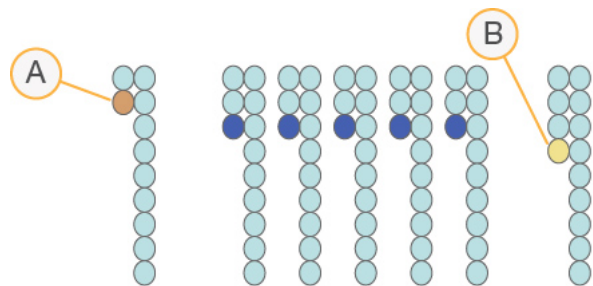
## Phasing-korjaus

Sekvensointireaktion aikana jokainen klusterin DNA-juoste laajenee yhdellä emäksellä jaksoa kohden. Phasing- ja prephasing-korjaus tapahtuu, kun juoste siirtyy epätahtiin nykyisen inkorporaatiojakson kanssa.

Phasing-korjaus tapahtuu, kun emäs hidastuu.

Prephasing-korjaus tapahtuu, kun emäs nopeutuu.

Kuva 5 Phasing- ja Prephasing-korjaus



- A. Read emäksen kanssa, jossa phasing-korjaus
- B. Read emäksen kanssa, jossa prephasing-korjaus.

RTA3 korjaa phasing- ja prephasing-vaikutukset, mikä maksimoi tietojen laadun ajon jokaisessa jaksossa.

## Emäksen tunnistaminen

Emäksen tunnistamisessa määritetään emäs (A, C, G tai T) tietyn rakenteen jokaiseen klusteriin tietyssä jaksossa. NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmissä käytetään kaksikanavasekvensointia, joka edellyttää vain kahta kuvaa neljän DNA-emäksen koodaukseen, yhtä vihreästä ja yhtä sinisestä kanavasta.

Ei tunnistusta määritetään N:ksi. Tunnistuksia ei ole, kun klusteri ei läpäise suodatinta, rekisteröinti epäonnistuu tai klusteri siirtyy pois kuvasta.

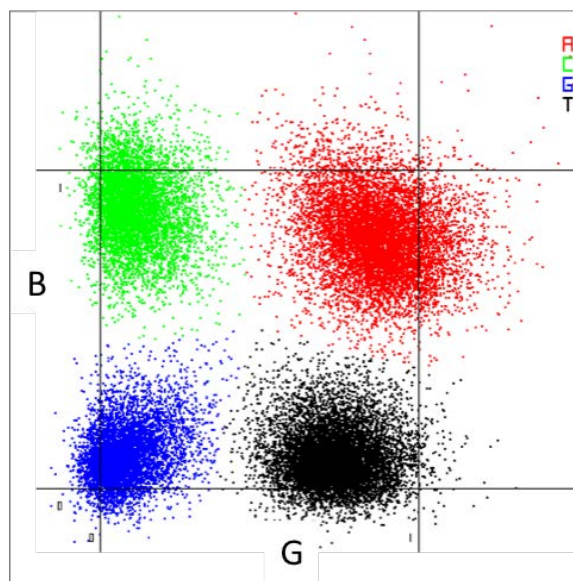
Kunkin klusterin voimakkuudet erotetaan vihreistä ja sinisistä kuvista ja niitä verrataan toisiinsa, jolloin syntyy neljä erillistä populaatiota. Jokainen populaatio vastaa emästä. Emäksen tunnistamisprosessilla määritetään, mihin perusjoukkoon kukin klusteri kuuluu.



Taulukko 6 Emästen määrittäminen kaksikanavasekvensoinnissa

Emäs	Vihreä kanava	Sininen kanava	Tulos
A	1 (läsnä)	1 (läsnä)	Klusterit, jotka näyttävät voimakkuuden sekä vihreässä että sinisessä kanavassa.
C	0 (ei läsnä)	1 (läsnä)	Klusterit, jotka näyttävät voimakkuuden vain sinisessä kanavassa.
G	0 (ei läsnä)	0 (ei läsnä)	Klusterit, jotka näyttävät voimakkuuden tunnetussa klusterisijainnissa.
T	1 (läsnä)	0 (ei läsnä)	Klusterit, jotka näyttävät voimakkuuden vain vihreässä kanavassa.

Kuva 6 Klusterivoimakkuuden näyttö



**i** | Kunkin klusterin väri korreloi %Base (%Emäs) -piirrosten kanssa Sequence Analysis Viewerissä (SAV) ja BaseSpace Sequence Hubin jaksokohtaisissa ajotiedoissa, eikä niiden ole tarkoitus korreloida vihreän ja sinisen kanavan kanssa.

## Suodattimen läpäisevät klusterit

Ajon aikana RTA3 suodattaa raakatiedot poistaakseen readit, jotka eivät ylitä tiedonlaatukynnystä. Päällekkäiset ja huonolaatuiset klusterit poistetaan.

Kaksikanava-analyysissä RTA3 määrittää emäksen tunnistamisen puhtauden (voimakkuuden puhtauden mitta) perusjoukkoon perustuvan järjestelmän avulla. Klusterit läpäisevät suodattimen, kun enintään yhden emäksen tunnistamisen puhtaus ensimmäisissä 25 jaksossa on kiinteän kynnyksarvon alapuolella. Kun PhiX-kohdistus on mukana, se suoritetaan jaksossa 26 laattojen alajoukossa klustereille, jotka läpäisivät suodattimen. Klustereiden, jotka eivät läpäise suodatinta, emäksiä ei tunnisteta eikä kohdisteta.

## Laatupistemäärät

Laatupiste (Q-piste) on ennustus virheellisen emäksen tunnistamisen todennäköisyydestä. Korkeampi laatupiste osoittaa, että emäksen tunnistaminen on korkeampaa laatua ja todennäköisemmin oikein. Kun Q-pisteet on määritetty, tulokset tallennetaan emästen tunnistamistiedostoihin (\*.cbcl).

Q-pisteellä esitetään ytimekkäästi pienet virhetodennäköisyydet. Q(X) edustaa laatupisteitä, ja X ilmaisee pisteet. Seuraavassa taulukossa on esitetty laatupisteiden ja virhetodennäköisyyden välinen suhde.

Q-pisteet Q(X)	Virhetodennäköisyys
Q40	0,0001 (yksi 10 000:sta)
Q30	0,001 (1 1 000:sta)
Q20	0,01 (yksi 100:sta)
Q10	0,1 (yksi 10:stä)

## Laatupisteytys ja raportointi

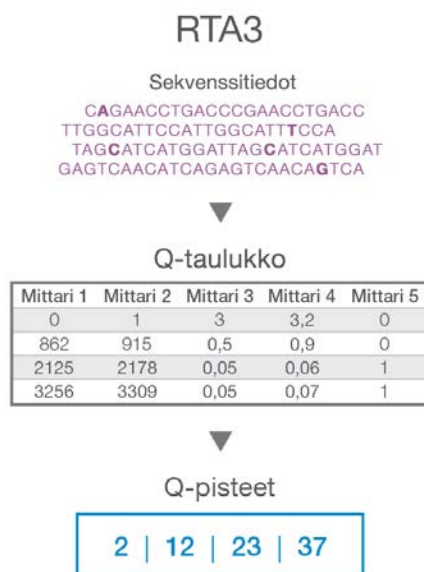
Laatupisteytyksessä lasketaan jokaiselle emäksen tunnistamiselle ennustinjoukko ja etsitään sitten ennustinarvojen avulla Q-pisteet laatutaulukosta. Laatutaulukot luodaan optimaalisesti tarkkojen laatuennustusten saamiseksi ajoista, jotka on luotu sekvensointialustan ja kemiaversioin tietyllä määrityksellä.

**i** | Laatupisteytys perustuu Phred-algoritmin muokattuun versioon.

Jotta voidaan luoda Q-taulukko NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmille, määritettiin kolme emäksen tunnistusryhmää näiden ennakoivien ominaisuuksien klusteroinnin perusteella. Emästen tunnistusten ryhmittelyn jälkeen keskimääräinen virhemäärä laskettiin empiirisesti kunkin kolmen ryhmän kohdalla, ja vastaavat Q-pisteet tallennettiin Q-taulukkoon kyseisen ryhmän kanssa korreloivien ennakoivien ominaisuuksien rinnalle. Näin RTA3:n tapauksessa vain kolme Q-pistemäärää ovat mahdollisia, ja nämä Q-pistemäärät edustavat ryhmän keskimääräistä

virhemäärää (*Yksinkertaistettu Q-pisteitys RTA3:n avulla sivulla 60*). Tämä tuottaa kaikkiaan tulokseksi yksinkertaistetun mutta erittäin tarkan laatupisteityksen. Laatutaulukon kolme ryhmää vastaavat marginaalia (< Q15), keskitasoa (~Q20) ja korkealaatuisia (> Q30) emästen tunnistuksia, ja niille määritetään seuraavat pistemäärät: 12, 23 ja 37. Lisäksi nollapistemääräksi määritetään 2, kun emästen tunnistuksia ei ole. Tällä Q-pisteiden raportointimallilla tallennustilan ja kaistanleveyden vaatimuksia vähennetään ilman, että se vaikuttaa tarkkuuteen tai suorituskykyyn.

Kuva 7 Yksinkertaistettu Q-pisteitys RTA3:n avulla



## Sekvensoinnin tuotostiedostot

Tiedostotyyppi	Tiedoston kuvaus, sijainti ja nimi
Ketjutetut emäksen tunnistustiedostot	Jokainen analysoitu klusteri sisältyy emäksen tunnistamistiedostoon, koottuna yhdeksi tiedostoksi jaksoa, kaistaa ja pintaa kohti. Koottu tiedosto sisältää ketjutetun emäksen tunnistamisen ja koodatun laatupisteityksen jokaisesta klusterista. Ketjutettuja emäksen tunnistustiedostoja käytetään BaseSpace Sequence Hubissa tai bcl2fastq2:ssa. Tiedot/voimakkuudet/emäksen tunnistamiset/L001/C1.1 L[kaista]_[pinta].cbcl, esimerkiksi L001_1.cbcl
Klusterien sijaintitiedostot	Kunkin virtauskyvetin kohdalla binäärinen klusterisijaintitiedosto sisältää ruudun klustereiden XY -koordinaatit. Kuusikulmainen asettelu, joka vastaa virtauskyvetin nanokaivoasettelua, määrittää koordinaatit ennalta. Tiedot/voimakkuudet s_[kaista].locs

Tiedostotyyppi	Tiedoston kuvaus, sijainti ja nimi
Suodatintiedostot	Suodatintiedosto määrittää, läpäisikö klusteri suodattimet. Suodatintiedostot luodaan 26 jaksossa 25 jakson tietojen perusteella. Jokaiselle laatalle luodaan yksi suodatintiedosto. Tiedot/voimakkuudet/emäksen tunnistukset/L001 s_[kaista]_[ruutu].filter
InterOp-tiedostot	Binäärisiä raportointitiedostoja voidaan tarkastella instrumentissa instrumentin ohjausohjelmistolla tai muualla kuin instrumentissa SAVissa tai BaseSpace Sequence Hubissa. InterOp-tiedostot päivittyvät koko ajon ajan. InterOp-kansio
Ajotietojen tiedosto	Sisältää ajon nimen, kunkin readin jaksojen määrän, virtauskyvetin pyyhkäisyalueiden ja ruutujen määrän sekä tiedon siitä, onko read indeksoitu read. Ajotietojen tiedosto luodaan ajon alussa. [Pääkansio], RunInfo.xml

## DRAGENin toissijaisen analyysin tulostustiedostot

DRAGEN Bio-IT Platform analysoi sekvensointitulostusta instrumentissa edelleen käyttämällä yhtä seuraavista analyysijaksoista.

- BCL Convert
- Sukusolulinja
- RNA
- Rikastus
- Yksisolu-RNA
- DNA Amplicon

Tässä osiossa annetaan tietoa jokaisesta DRAGEN-jaksosta tulostustiedoston tiedot mukaan lukien. Sen lisäksi, että DRAGEN luo jaksokohtaisia tiedostoja, se tarjoaa mittaustietoa analyysistä `<sample_name>.metrics.json`-tiedostossa ja raporteissa, jotka on kuvattu kohdassa [DRAGEN BCL -konverttijakso sivulla 66](#). Lisätietoja DRAGENista on [DRAGEN Bio-IT Platform -tukisivuston sivulla](#).

Kaikki DRAGEN-jaksot tukevat syöte-BCL:n dekompressiota ja BAM/CRAM-tulostustiedostojen kompressiota.

Tulostustiedostoja koskevia näkökohtia:

- Niiden Germline (Sukusolulinja)-, RNA-, Enrichment (Rikastus)- ja DNA Amplicon -jaksojen kohdalla, jotka ovat käynnissä instrumenttianalyysissä, BAM -tiedostoja ei ladata BaseSpace Sequence Hubiin, mikäli Proactive, Run Monitoring and Storage (Ajon valvonta ja tallennus) on valittuna.

## DRAGEN-rikastusjakso

DRAGEN-rikastusjaksossa tuetaan seuraavia ominaisuuksia. Mikäli käytössä on DRAGEN 3.7 tai sitä uudempi versio, tuetaan sekä sukusolulinjatilaa että somaattista tilaa (vain kasvaimet).

- Näytteen demultipleksointi
- Kartoitus ja kohdistus, muun muassa lajittelu ja kaksinkertainen merkintä
- Pieni varianttitunnistus
- Rakenteellinen varianttitunnistus

Jotta voit suorittaa varianttitunnistuksen, \*.bed-tiedosto on sisällytettävä näytetiedostoon tai määritettävä BaseSpace Sequence Hubin Instrument Run Setup (Laitteajon asettaminen) -kohdassa. Rakenteellinen varianttitunnistus luodaan vain paired-end readien ja sukusolulinjatilan kohdalla.

Mikäli käytössä on DRAGEN Enrichment -versio 3.8 tai sitä uudempi versio, voit syöttää melun lähtötasotiedoston suorituskyvyn parantamiseksi somaattisessa tilassa. Katso [Melun lähtötasotiedostojen luonti sivulla 18](#).

Jaksossa luodaan seuraavat tulostustiedostot.

Osa	Tyyppi	Tulostustiedoston nimi
Kartoitus/kohdistus	BAM tai CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.bam, tai</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.cram</li> </ul>
Pieni varianttitunnistus	VCF ja gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>
Rakenteellinen varianttitunnistus	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.sv.vcf.gz</li> </ul>

\* gVCF-tulostustiedostot ovat saatavilla vain sukusolulinjatilassa.

## DRAGEN-sukusolulinjajakso

DRAGEN-sukusolulinjajakso tukee seuraavia ominaisuuksia:

- Näytteen demultipleksointi
- Kartoitus ja kohdistus, muun muassa lajittelu ja kaksinkertainen merkintä
- Pieni varianttitunnistus
- Rakenteellinen varianttitunnistus paired-end readeille
- Kopioi määrän varianttitunnistus ihmisen genomeille
- Toista laajennukset ihmisen genomien kohdalla

- Ihmisen genomien homotsygoottisuusalueet
- [DRAGEN v3.8 tai sitä uudempi versio] CYP2D6-tunnistus

Rakenteellinen varianttittunnistus luodaan vain paired-end readien kohdalla.

Jaksossa luodaan seuraavat tulostustiedostot.

Osa	Tyyppi	Tulostustiedoston nimi
Kartoitus/kohdistus	BAM tai CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.bam, tai</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.cram</li> </ul>
Pieni varianttittunnistus	VCF ja gVCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>
Rakenteellinen varianttittunnistin	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.sv.vcf.gz</li> </ul>
Kopioi määrävariantit	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.cnv.vcf.gz</li> </ul>
Toista laajennus	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.repeats.vcf.gz</li> </ul>
Homotsygoottisuusalueet	CSV ja BED	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.roh_metrics.csv</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.roh.bed</li> </ul>
CYP2D6-tunnistus	TSV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.cyp2d6.tsv</li> </ul>

## DRAGEN DNA Amplicon -jakso

DRAGEN-jakso tukee seuraavia ominaisuuksia:

- Näytteen demultipleksointi
- Kartoitus ja kohdistus, muun muassa lajittelu ja kaksinkertainen merkintä
- Pieni varianttittunnistus sukusolulinjatilassa tai somaattisessa tilassa.

Jotta voit suorittaa varianttittunnistuksen, \*.bed-tiedosto on sisällytettävä näytetiedostoon tai määritettävä BaseSpace Sequence Hubin Instrument Run Setup (Laitteen asettaminen) -kohdassa.

Jaksossa luodaan seuraavat tulostustiedostot.

Osa	Tyyppi	Tulostustiedoston nimi
Kartoitus/kohdistus	BAM tai CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.bam, tai</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.cram</li> </ul>
Pieni varianttittunnistus	VCF ja gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>

\* gVCF-tulostustiedostot ovat saatavilla vain sukusolulinjatilassa.

## DRAGEN RNA -jakso

DRAGEN RNA -jakso tukee seuraavia ominaisuuksia:

- Näytteen demultiplekointi
- Kartoitus ja kohdistus, muun muassa lajittelu ja kaksinkertainen merkintä
- Geenifuusion tunnistus
- Transkriptin kvantifiointi
- **[DRAGEN v3.8 tai sitä uudempi versio]** Differentiaalinen geenin ilmentyminen

Voit luoda tulostustiedostot määrittämällä GTF-tiedoston näytetiedostossa tai varmistamalla, että oletusarvoinen `genes.gtf.gz` on olemassa yhdessä viitegenomin kanssa.

Jaksossa luodaan seuraavat tulostustiedostot.

Osa	Tyyppi	Tulostustiedoston nimi	Kuvaus
Kartoitus/kohdistus	BAM tai CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.bam</code>, tai</li> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.cram</code></li> </ul>	Kohdistustuotos, joka vastaa SAM-tietoja.
Geenifuusion tunnistus	Pelkkä teksti	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.fusion_candidates.preliminary</code></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fuusioehdokkaat ennen suodatinten käyttöä.</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.fusion_candidates.final</code></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fuusioehdokkaat suodatinten käytön jälkeen.</li> </ul>
Transkriptin kvantifiointi	Pelkkä teksti	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>sample_name.quant.genes.sf</code></li> <li>• <code>sample_name.quant.sf</code></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transkriptin kvantifiointitulokset geenitasolla.</li> <li>• Kaikki transkriptin kvantifiointitulokset.</li> </ul>
Differentiaalinen ilmentymä	PNG	Katso seuraava differentiaalisen ilmentymän tulostustiedostotaulukko.	Jotta voit luoda tulostustiedostot, näytetiedostossa on määritettävä vertailu.

Seuraavat tiedostot tulostetaan, kun differentiaalinen ilmentymä on käytössä.

Tiedostonimi	Kuvaus
Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv	Sisältää differentiaalisen ilmentymän analyysimittaustiedot.
Control_vs_Comparison.genes.counts.csv	Kuvaa sellaisten readien määrän, jotka on kartoitettu kunkin näytteen kunkin geenin kohdalle kontrolli- ja vertailuryhmissä.
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Differentiaalisesti ilmentyneiden geenien ilmentymisen lämpökartta kontrolli- ja vertailuryhmien näytteiden kohdalla. Lämpökartassa näytetään vain differentiaalisesti ilmentyneet geenit, joiden säädetty P-arvo on $<-.05$ . Mikäli differentiaalisesti ilmentyneitä geenejä on yli 30, käytetään vain ensimmäiset 30 differentiaalisesti ilmentynyttä geeniä. Mikäli DESeq1 ei ole yhdenmukainen tai jos differentiaalisesti ilmentyneitä geenejä ei ole, tiedostoa ei luoda.
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Sisältää geenien ilmentymäsuhteiden variaation signaalin keskimääräisen intensiteetin funktiona. Jotta voidaan näyttää erot kahdesta näytteestä tehtyjen mittausten välillä, tiedot muunnetaan piirroksessa M (lokisuhde)- ja A (keskiarvo)-asteikoiksi, ja arvot piirretään sen jälkeen. MA-piirroksessa esitetään $\log_2$ -poimumuutokset, jotka voidaan katsoa tietyn muuttujan aiheuttamiksi normalisoitujen määrien keskiarvojen kohdalla kaikissa näytteissä. Mikäli säädetty P-arvo on alle 0,1, pisteet ovat punaisia. Pisteet, jotka putoavat ikkunasta, piirretään avoimiksi kolmioiksi. Ylöspäin osoittavat kolmiot edustavat positiivista lokin poimumuutosta. Alaspäin osoittavat kolmiot edustavat negatiivista lokin poimumuutosta.
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	Piirroksessa esitetään kaksi ensimmäistä pääasiallista komponenttia, jotka selittävät suurimman osan vaihtelusta.
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Sisältää DESeq2-tulokset, jotka kuvaavat keskiarvon ilmentymää, $\log_2$ :ta (poimumuutos), $\log_2$ :n vakiovirhettä, P-arvoa, säädettyä P-arvoa sekä kunkin geenin ilmentymän tilaa.
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Sisältää säännönmukaisia lokimuunnettuja määriä, jotka on laskettu DESeq2:lla.



## DRAGEN yksisolu-RNA-jakso

DRAGEN tukee seuraavia ominaisuuksia:

- Näytteen demultipleksointi
- Kartoitus ja kohdistus, muun muassa lajittelu ja kaksinkertainen merkintä
- Kyvetin ja geenin luokitus

Voit luoda tulostustiedostot määrittämällä GTF-tiedoston näytetiedostossa tai varmistamalla, että oletusarvoinen `genes.gtf.gz` on olemassa yhdessä viitegenomin kanssa.

Jaksossa luodaan seuraavat tulostustiedostot.

Osa	Tyyppi	Tulostustiedoston nimi
Kartoitus/kohdistus	BAM tai CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.bam</code>, tai</li> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.cram</code></li> </ul>
Kyvetin/geenin luokitus	TSV, CSV ja MTX	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.scRNA.barcodeSummary.tsv</code></li> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.scRNA.genes.tsv</code></li> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.scRNA.matrix.mtx</code></li> </ul>
Analysiraportit	HTML	<code>&lt;sample_name&gt;.dragen.scrna-report.*.html</code>

## DRAGEN BCL -konverttijakso

DRAGEN BCL -konverttijaksossa käytetään sekvensointiajosta ja näytetiedostotiedoista generoituja BCL-tietoja FASTQ-tiedoston tulostamiseksi jokaisesta näytteestä. FASTQ-tiedoston nimi on `<sample_name>.fastq.gz`.

Jaksossa luodaan seuraavat raportit.

Osa	Tyyppi	Tulostustiedoston nimi
Demultipleksointi	CSV	• <code>Demultiplex_Stats.csv</code>
Adapterin mittaustiedot	CSV	• <code>Adapter_Metrics.csv</code>
Indeksihyppely	CSV	• <code>Index_Hopping_Counts.csv</code>
Keskeiset tuntemattomat viivakoodit	CSV	• <code>Top_Unknown_Barcodes.csv</code>

## Demultipleksointitilastoraportti

Demultipleksointitilastoraportti sisältää tietoja sellaisten läpäisevän suodattimen readien määrästä, jotka on määritetty kullekin näytetiedoston näytteelle. Kaikki readit, joita ei voida selkeästi yhdistää näytteeseen, luokitellaan määrittämättömiksi. Raportti sisältää myös tietoja niiden läpäisevän suodattimen (PF) readien emästen laatu- ja lukumäärästä, jotka on määritetty kullekin näytteelle.

Mukana ovat seuraavat tiedot.

Mittari	Kuvaus
Kaista	Sen virtauskyvetin kaista, jolla näyte sekvensoitiin.
Näytetunnus	Näytetiedoston näytetunnus. Mikäli read ei vastaa näytettä, kentässä näkyy <code>undetermined</code> (määrittämätön).
Hakemisto	Index Read 1- ja Index Read 2 -kohteiden yhteenliittäminen väliviivalla erotetusta näytetiedostosta. Mikäli read ei vastaa näytettä, kentässä näkyy <code>undetermined</code> (määrittämätön).
Readien määrä	Määritetyllä kaistalla demultipleksoitujen näytteiden PF-readien määrä.
Täydellisten indeksireadien määrä	Niiden readien määrä, jotka vastaavat täydellisesti näytetiedostossa määritettyjä yhdistettyjä indeksisekvenssejä.
Niiden indeksireadien määrä, joissa on yksi yhteensopimattomuus	Niiden readien määrä, jotka vastaavat näytetiedostossa määritettyjä yhdistettyjä indeksisekvenssejä yhtä virhettä lukuun ottamatta.
≥ Q30-emästen (PF) määrä	Emästen määrä, adapterit mukaan lukien, joka vastaa Q30-laatukynnyksen ylittäviä readeja.
Keskimääräinen laatupistemäärä (PF)	Tietyn kaistan näytettä vastaavien readien keskimääräinen laatupistemäärä. Arvoon sisältyvät adapteriemäkset.

## Adapter Metrics (Adapterin mittaustiedot) -raportit

Adapterin mittaustietotiedostoon sisältyy adapterin määrä ja kuhunkin readiin yhdistettävät näyte-emäkset.

Mukana ovat seuraavat tiedot.

Mittari	Kuvaus
Kaista	Sen virtauskyvetin kaista, jolla näyte sekvensoitiin.
Näytetunnus	Näytetiedoston näytetunnus. Mikäli read ei vastaa näytettä, kentässä näkyy <code>undetermined</code> (määrittämätön).
hakemisto	Näytetiedoston index1-sekvenssi. Kenttä on tyhjä, jos indexiä ei määritetty näytetiedostossa tai jos näytetunnuksen arvo on <code>undetermined</code> (määrittämätön).
index2	Näytetiedoston index2-sekvenssi. Kenttä on tyhjä, jos index2:ta ei määritetty näytetiedostossa tai jos näytetunnuksen arvo on <code>undetermined</code> (määrittämätön).
R1_ AdapterBases	Niiden emästen määrä, jotka vastaavat näytetiedostossa AdapterRead1:tä.
R1_ SampleBases	Vastaavan kaistan ja näytteen leikattujen tai peitettyjen emästen määrä Read 1 -kohteesta.
R2_ AdapterBases	Niiden emästen määrä, jotka vastaavat näytetiedostossa AdapterRead2:ta.
R2_ SampleBases	Vastaavan kaistan ja näytteen leikattujen tai peitettyjen emästen määrä Read 2 -kohteesta.
Readien määrä	Tietyllä kaistalla olevien näytteen readien määrä.

## Indeksihyppelymäärä-raportti

Indeksihyppelymäärä-raportti sisältää duaalisten indeksiajojen kunkin odotettavissa olevan ja yllhypätyn indeksin readin määrän. Raportti sisältää kaistaa kohti vain ainutkertaisia duaalisia indeksejä siinä määrin kuin indekseissä ei havaita viivakooditörmäyksiä. Jotta voit luoda indeksihyppelymittaustietoja kaistalle, kunkin indeksin kaikkien merkintäparien merkintäetäisyyden on oltava vähintään  $2N + 1$ , jossa N edustaa indeksille määritettyä viivakoodin yhteensopimattomuustoleranssia.

Mukana ovat seuraavat tiedot.

Tiedosto sisältää vain otsikot muiden kuin indeksiajojen kohdalla, yksittäisten indeksiajojen kohdalla tai sellaisten kaistojen kohdalla, jotka eivät sisällä ainutkertaisia duaalisia indeksejä.

Mittari	Kuvaus
Kaista	Sen virtauskyvetin kaista, jolla näyte sekvensoitiin.
Readien määrä	Tietyllä kaistalla olevien näytteen readien määrä.
Näytetunnus	Näytetiedoston näytetunnus. Mikäli read ei vastaa näytettä, kentässä näkyy <code>undetermined</code> (määrittämätön).
hakemisto	Näytetiedoston index1-sekvenssi. Kenttä on tyhjä, jos read on single-ended tai jos näytetunnuksen arvo on <code>undetermined</code> (määrittämätön).
index2	Näytetiedoston index2-sekvenssi. Kenttä on tyhjä, jos read on single-ended tai jos näytetunnuksen arvo on <code>undetermined</code> (määrittämätön).

## Keskeisiä tuntemattomia viivakoodeja koskeva raportti

Keskeisiä tuntemattomia viivakoodeja koskeva raportti sisältää kaistaa kohti ensimmäiset 100 indeksiä tai indeksiparia, joita ei tunnistettu näytetiedostossa sallittujen yhteensopimattomuuksien määrän mukaan. Mikäli 100. korkeimmaksi indeksimäärämerkinnäksi on määritetty useita indeksiarvoja, kaikki indeksiarvot, joiden määrä on sama, tulostetaan 100. merkintänä.

Mukana ovat seuraavat tiedot:

Mittari	Kuvaus
Kaista	Sen virtauskyvetin kaista, jolla näyte sekvensoitiin.
hakemisto	Kunkin tuntemattoman indeksin sekvenssi indeksin Read1-kohteessa. Kenttä on tyhjä, mikäli tuntemattomia indeksejä ei löydy.
index2	Kunkin tuntemattoman indeksin sekvenssi indeksin Read 2 -kohteessa. Mikäli ajo oli single-read-tyyppinen tai jos tuntemattomia indeksejä ei löytynyt, kenttä on tyhjä.
Readien määrä	Tietyllä kaistalla olevien näytteen readien määrä.

## Illumina DRAGEN QC -raportit

DRAGEN FastQC luo oletusarvoisesti QC-piirroksia kaikkien jaksojen kohdalla. Yhteenkootut QC-tulokset tallennetaan `AggregatedFastqcMetrics`-kansioon ja näytekohtaiset tulokset tallennetaan `<sample_name>`-kansioon.

QC-raportteja ei luoda, mikäli näytteiden määrä on suurempi kuin 512.

Mukana on seuraavat QC-piirroksia.

QC-piirros	Kuvaus
<code>adapter_content</code>	Sekvenssien prosenttiosuus emäsparia kohti.
<code>positional_mean_quality</code>	Keskimääräinen Phred-asteikon emästen laatuasteikon määrä kutakin read-asemaa kohti.
<code>gc_content</code>	Kunkin sekvensointi-readin GC-pitoisuusprosentti.
<code>positional_quality.read_1</code>	Keskimääräinen Phred-asteikon emästen laatuasteikon tyyppiä tietyllä nukleotidilla ja tietyssä Read 1 -sijainnissa.
<code>gc_quality</code>	
<code>positional_quality.read_2</code>	Keskimääräinen Phred-asteikon emästen laatuasteikon tyyppiä tietyllä nukleotidilla ja tietyssä Read 2 -sijainnissa.
<code>n_content</code>	
<code>read_length</code>	Kunkin readin sekvenssin pituus.
<code>positional_base_content.read_1</code>	Jokaisen tietyn nukleotidin emästen määrä tietyssä Read 1 -sijainneissa.
<code>read_quality</code>	Keskimääräinen Phred-asteikon laatuasteikon määrä kullekin sekvensointi-readille.
<code>positional_base_content.read_2</code>	Jokaisen tietyn nukleotidin emästen määrä tietyssä Read 2 -sijainneissa.

## DRAGENin toissijaisen analyysin tulostuskansion rakenne

DRAGEN luo oletusarvoisesti tulostustiedostot `Settings (Asetukset)` -välilehdellä valittuun tulostuskansioon. DRAGEN laatii kullekin työnkululle tiivistelmäraportin `report.html`-tiedostoon.

### 📁 Data (Tiedot)

📄 `report.html`

📄 `report_files`

📁 **AggregateFastQCPlots**

- 📄 \*.png
- 📄 \*stderr\_.txt
- 📄 \*stdout\_.txt
- 📄 dragen\_prev\_48\_hrs.log
- 📄 dlm\_prev\_48\_hrs.log
- 📄 SampleSheet.csv
- 📄 Ajon syötetiedostot (esim. BED- ja GTF-tiedostot)
- 📁 **sample\_name**
  - 📁 **enrich\_caller , germline\_seq, dna\_amplicon\_seq, rna\_seq tai scrna\_seq**
    - 📁 **sample\_name**
      - 📄 \*.png
      - 📄 dragen\_\*.log
      - 📄 sample\_name.\*.metrics.csv
      - 📄 [DNA] sample\_name.\*.vcf.gz
      - 📄 [DNA] sample\_name.\*.gvcf.gz— Ei saatavilla DRAGENin Bio-IT Platform Amplicon (somaattinen) -jaksolle.
      - 📄 sample\_name.\*.bam tai sample\_name.\*.cram
      - 📄 Lokit
      - 📄 [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
      - 📄 [Sukusolulinja] sample\_name.roh\_metrics.csv
      - 📄 [Sukusolulinja] sample\_name.roh.bed
      - 📄 [Sukusolulinja] sample\_name.cyp2d6.tsv
      - 📄 sample\_name.fastqc\_metrics.csv
      - 📄 sample\_name.trimmer\_metrics.csv
    - 📁 [RNA] Differentiaalinen ilmentymä

### Vertailu1

- 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

#### lokit

- \*.txt
- \*.csv

#### fastq— Saatavilla vain, jos KeepFastq-asetuksena on tosi.

- \*.fastq.gz

#### ora\_fastq— Saatavilla vain, jos FastqCompressionFormat-asetuksena on 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


### Raportit


- Demultiplex\_Stats.csv
- RunInfo.xml
- Trim\_Metrics.csv

 fastq\_list.csv


 SampleSheet.csv

 Index\_Hopping\_Counts.csv

 Top\_Unknown\_Barcodes.csv


 **Read1InstrumentAnalyticsMetrics** — Vain paired-end-tyyppisille readeille.


 **0001**


 dataset.json

 **0002**

 dataset.json


 Adapter\_Metrics.csv

 Demultiplex\_Stats.csv

 Index\_Hopping\_Counts.csv

 **Read1Metrics** — Vain paired-end-tyyppisille readeille.

 Adapter\_Metrics.csv

 Index\_Hopping\_Counts.csv




# Huolto

Tässä osiossa kuvataan toimenpiteitä, joita tarvitaan hyväkuntoisen järjestelmän ylläpitoon. Opettele asentamaan ohjelmistopäivitykset, vaihtamaan ilmansuodatin ja suorittamaan muita määräaikaista kunnossapitotoimenpiteitä. Pitämällä ohjausohjelmisto ajan tasalla varmistetaan, että järjestelmään on asennettu viimeisimmät virheidenkorjaukset ja ominaisuudet, joilla taataan optimaalinen suorituskyky.

## Kiintolevyaseman levytilan tyhjentäminen

Sekvensointiajo vaatii noin 200 Gt paikallista kiintolevytilaa. Varoitusilmoitus näytetään, kun tila on vähissä. Suorittamalla seuraavat vaiheet voit lisätä tilaa poistamalla jo suoritettuja ajoja ja asennettuja viitegenomeja tilapäisestä ajokansioista.

 Poista ajoja vain NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston avulla sen sijaan, että niitä poistetaan manuaalisesti käyttöjärjestelmästä. Ajojen manuaalinen poistaminen saattaa vaikuttaa kielteisesti ohjausohjelmistoon.

1. Valitse ohjausohjelmiston valikosta **Disk Management** (Levyhallinta).  
Disk Management (Levyhallinta) -näyttö tulee näkyviin yhdessä paikalliselle kiintolevyille tallennetun ajo- ja viitegenomiluettelon kanssa.
2. Valitse **Delete Run** (Poista ajo) sellaisen ajon kohdalla, jonka haluat poistaa.  
Ajon poistaminen poistaa paikallisen ajokansion. Tulostuskansio, joka on ajokansion kopio, säilytetään.
3. Vahvista ajon poistaminen valitsemalla valintaruudussa **Yes, Delete Run** (Kyllä, poista ajo).
4. Toista vaiheet 2 ja 3 jokaisen ajon kohdalla, jonka haluat poistaa.
5. Valitse **Delete Genome** (Poista genomi) sen genomien kohdalla, jonka haluat poistaa.
6. Valitse valintaruudussa **Yes, Delete Genome** (Kyllä, poista genomi).
7. Toista vaiheet 5 ja 6 jokaisen genomien kohdalla, jonka haluat poistaa.
8. Kun olet valmis, sulje levyhallinta ja palaa aloitusnäyttöön.

## Ohjelmistopäivitykset

Ohjelmiston päivittämällä varmistat, että järjestelmässä on uusimmat ominaisuudet ja korjaukset. Ohjelmistopäivitykset on niputettu järjestelmän ohjelmistopaketti, joka sisältää seuraavat ohjelmistot:

- NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmisto
- NextSeq 1000/2000 -reseptit
- Yleiskäyttöinen kopiopalvelu

- Real-Time Analysis (Reaaliaikainen analyysi)

**i** | DRAGEN-moduuleita ei ole sisällytetty järjestelmäpakettiin. Asenna ne erikseen tarpeen mukaan. Pääset DRAGEN-moduuliohjelmistoon tukisivuilta.

Järjestelmä on määritetty lataamaan ohjelmistopäivitykset automaattisesti tai manuaalisesti:

- **Automaattiset päivitykset** – Päivitykset ladataan automaattisesti BaseSpace Sequence Hubista asentamista varten. Tämä asetus vaatii internetyhteyden, mutta ei BaseSpace Sequence Hub -tiliä.
- **Manuaaliset päivitykset** – Päivitykset ladataan manuaalisesti Internetistä, tallennetaan paikallisesti tai siirrettävään asemaan ja asennetaan tallennussijainnista. Tämä asetus ei vaadi laitteen internetyhteyttä.

## Automaattisen ohjelmistopäivityksen asennus

1. Varmista, että käynnissä ei ole sekvensointiajoja tai instrumentin toissijaisia analyysejä.
2. Kirjaudu kohteeseen ilmnadmin.
3. Valitse ohjausohjelmiston valikosta **Software Update** (Ohjelmistopäivitys). Automaattisia päivityksiä varten määritetyt järjestelmät näyttävät ilmoituksen, kun ohjelmapäivitys on saatavilla.
4. Voit tarkistaa päivityksen valitsemalla **Check Online for Software Update** (Tarkista ohjelmistopäivitykset verkosta).
5. Valitse **Update Now** (Päivitä nyt), kun haluat ladata uuden ohjelmistoversion. Kun lataus on valmis, ohjausohjelmisto sulkeutuu ja ohjattu asennustoiminto avautuu. Ohjausohjelmisto käynnistyy automaattisesti uudelleen. Kaikki laiteohjelmiston päivitykset tapahtuvat automaattisesti uudelleenkäynnistyksen jälkeen.

**i** | Päivitystä ei voida peruuttaa sen jälkeen, kun asennus on alkanut. Se voidaan peruuttaa vain latauksen aikana.

## Manuaalisen ohjelmistopäivityksen asennus

1. Kirjaudu kohteeseen ilmnadmin.
2. Varmista, että käynnissä ei ole sekvensointiajoja tai instrumentin toissijaisia analyysejä.
3. Kun saatavilla on ohjelmistopäivitys, lataa ohjelmistopakettin asennusohjelma (\*.tar.gz) [NextSeq 1000 and NextSeq 2000 Sequencing Systems -tukisivulta](#). Tallenna asennusohjelma paikalliseen tai siirrettävään levyasemaan.
4. Jos tallensit asennusohjelman siirrettävään levyasemaan, liitä muistitikku USB 3.0 -porttiin, joka sijaitsee sekä instrumentin sivulla että sen takana.
5. Valitse ohjausohjelmiston valikosta **Software Update** (Ohjelmistopäivitys) -vaihtoehto.
6. Valitse **Choose...** (Valitse...) asennusohjelmaan selaamista varten.

7. Valitse **Update Now** (Päivitä nyt), kun haluat aloittaa asennuksen.  
Ohjausohjelmistossa näytetään kiireen indikaattori asennuksen aikana.  
Ohjausohjelmisto käynnistyy automaattisesti uudelleen. Kaikki laiteohjelmiston päivitykset tapahtuvat automaattisesti uudelleenkäynnistyksen jälkeen.



Päivitystä ei voida peruuttaa sen jälkeen, kun asennus on alkanut. Se voidaan peruuttaa vain latauksen aikana.

## DRAGEN-työnkulku ja käyttöoikeuspäivitykset

Vain järjestelmänvalvojat voivat asentaa DRAGEN-työnkulkuja ja uusia DRAGEN-käyttöoikeuden.

### Uusi DRAGEN-käyttöoikeus verkossa

Mikäli NextSeq 1000/2000 on varustettu verkkoyhteydellä, päivitä DRAGEN Bio-IT Platform - käyttöoikeus seuraavasti.

1. Saat uuden lisenssiavaimen ottamalla yhteyttä Illuminan tekniseen tukipalveluun.
2. Odota 24 tuntia, että käyttöoikeus päivitetään automaattisesti, tai päivitä käyttöoikeus välittömästi seuraavalla tavalla.
  - a. Valitse ohjausohjelmiston valikko ja valitse sitten **DRAGEN**.
  - b. Valitsemalla **Check Online** (Tarkista verkossa) voit tarkistaa, onko uusi DRAGEN-lisenssiavain saatavilla.
  - c. Mikäli se on saatavilla, valitse **Update** (Päivitä).

### Uusi DRAGEN-käyttöoikeus offline-tilassa

Mikäli NextSeq 1000/2000:aa ei ole varustettu verkkoyhteydellä, päivitä DRAGEN Bio-IT Platform - käyttöoikeus seuraavasti.

1. Saat uuden lisenssiavaimen ottamalla yhteyttä Illuminan tekniseen tukipalveluun. Tallenna `license.zip`-tiedosto paikalliseen tai kannettavaan asemaan.
2. Mikäli \*.zip-tiedosto tallennettiin kannettavaan asemaan, kytke asema USB 3.0 -porttiin, joka sijaitsee sekä instrumentin sivulla että sen takana. Siirrä laitetta tarvittaessa varoen, jotta saat laitteen takaosan esiin.
3. Valitse ohjausohjelmiston valikko ja valitse sitten **DRAGEN**.
4. Valitsemalla **Choose** (Valitse), jotta voit navigoida \*.zip-tiedostoon, ja valitse sitten **Open** (Avaa).

### DRAGEN-työnkulkujen asentaminen verkossa

Mikäli NextSeq 1000/2000 on varustettu verkkoyhteydellä, voit asentaa DRAGEN -työnkulut suoraan NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistoon. DRAGEN-työnkulkujen verkkoasennus on saatavilla vain NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston versiossa v1.3.

1. Valitse ohjausohjelmiston valikko ja valitse sitten **Process Management** (Prosessinhallinta).
2. Varmista, että käynnissä ei ole sekvensointiajoja tai instrumentin toissijaisia analyyssejä.
3. Valitse ohjausohjelmiston valikko ja valitse sitten **DRAGEN**.  
Version (Versio) -kohdan Available Workflows (Saatavilla olevat työnkulut) -osiossa luetellaan järjestelmään kulloinkin asennetut työnkulut.
4. Voit asentaa DRAGEN-työnkulkuja NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistoon valitsemalla **Check Online** (Tarkista verkossa).  
Kaikki DRAGEN-versiot ja työnkulut eivät ole yhteensopivia verkkoasennuksen kanssa. Käytä offline-asennusta lisätyönkulkujen asentamiseen.
5. Valitse niiden työnkulkujen valintaruutu, jotka haluat asentaa. Mikäli viimeisintä BCL-konverttiversiota ei ole asennettu, varmista, että se asennetaan ensin.  
Voit tarkastella työnkulun viimeisimmän version tietoja julkaisutiedoista.
6. Valitsemalla **Install** (Asenna) voit käynnistää asennuksen.
7. Syötä järjestelmän salasananasi ilmnadmin ja valitse sitten **Authenticate** (Todenna).

## DRAGEN -työnkulkujen asentaminen offline-tilassa

1. Kun DRAGEN-työnkulun päivitys on saatavilla, lataa asennusohjelma (\*.tar.gz) [DRAGEN-tukisivulta](#). Tallenna asennusohjelma paikalliseen tai siirrettävään levyasemaan.
2. Jos tallensit asennusohjelman siirrettävään levyasemaan, liitä muistitikku USB 3.0 -porttiin, joka sijaitsee sekä instrumentin sivulla että sen takana. Siirrä laitetta tarvittaessa varoen, jotta saat laitteen takaosan esiin.
3. Valitse ohjausohjelmiston valikko ja valitse sitten **Process Management** (Prosessinhallinta).
4. Varmista, että käynnissä ei ole sekvensointiajoja tai instrumentin toissijaisia analyyssejä.
5. Valitse ohjausohjelmiston valikko ja valitse sitten **DRAGEN**.
6. Valitse Version (Versio) -kohdassa **Browse for New Version** (Selaa uuteen versioon), jotta voit navigoida asennusohjelmaan.
7. Valitsemalla **Install** (Asenna) voit käynnistää asennuksen.
8. Syötä järjestelmän salasananasi ilmnadmin ja valitse sitten **Authenticate** (Todenna).

## Ilmansuodattimen vaihtaminen

Vaihda vanhentunut ilmansuodatin seuraavien ohjeiden mukaisesti 6 kuukauden välein.

Ilmansuodatin on kertakäyttöinen suorakulmainen kasetti, joka peittää laitteen oikealla puolella olevan puhaltimen. Se varmistaa asianmukaisen jäähdytyksen ja estää likaa pääsemästä järjestelmään. Laitte toimitetaan niin, että siihen on asennettu yksi ilmansuodatin ja mukana toimitetaan varakappale. Voimassaolevaan instrumentin huoltosopimukseen sisältyy ylimääräisiä varaosia, tai niitä voidaan ostaa erikseen Illuminalta.

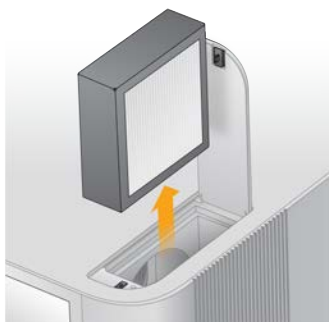
1. Avaa yläpaneeli painamalla laitteen yläosaa oikealta puolelta kuvan osoittamalla tavalla.



2. Avaa paneeli.



3. Vapauta ilmansuodatinkasetti painamalla sitä, poista se paneelin keskiosasta ja hävitä se.



4. Asenna uusi ilmansuodatin säiliöön ja paina se paikoilleen.

5. Sulje yläpaneeli ja paina se paikalleen.



6. Aseta laite takaisin paikoilleen.

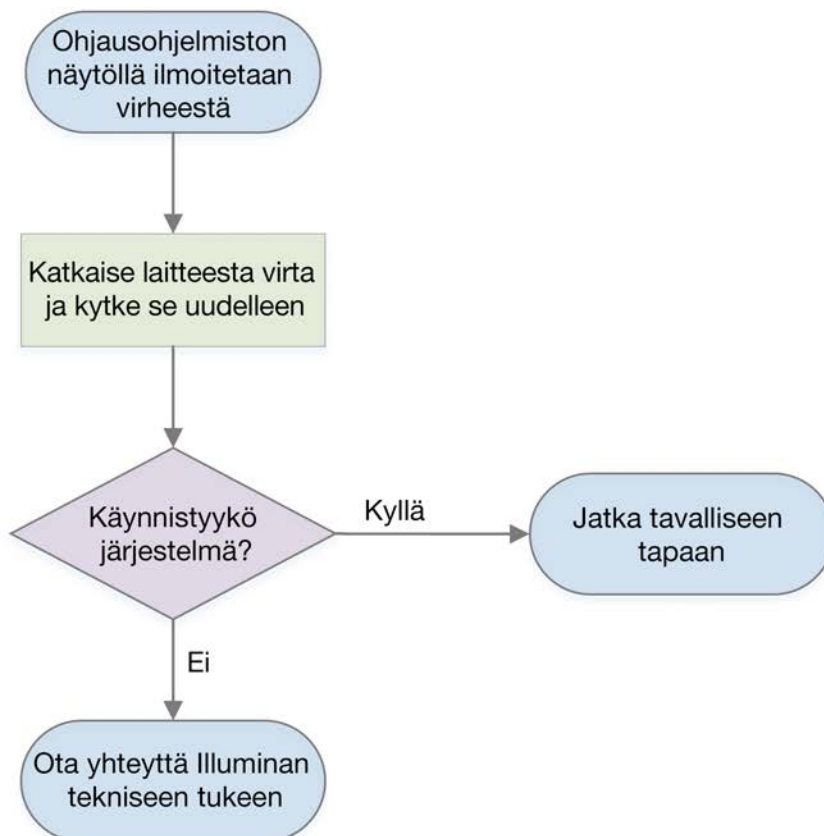
# Vianmääritys

Tässä osiossa annetaan vaiheittaiset ohjeet ajon peruuttamiseksi, instrumentin virran katkaisemiseksi ja sen uudelleenkytkemiseksi sekä muihin vianmääritystoimenpiteisiin.

## Virheviestien ratkaiseminen


Tämä liite sisältää yksityiskohtaiset ohjeet eri vianmääritysvaiheita varten. Seuraava vuokaavio antaa yhteenvedon vianmäärityksen virheviesteistä, jotka näytetään alustuksen, ajon käyttöönoton tai sekvensoinnin aikana ja jotka eivät ratkea yrittämällä uudelleen.

Monet virheet voidaan ratkaista katkaisemalla laitteesta virta ja käynnistämällä laite uudelleen. Katso lisätietoja virran katkaisusta ja uudelleenkytkemisestä kohdasta [Virran katkaiseminen laitteesta ja kytkeminen uudelleen laitteeseen sivulla 81](#) (Virran katkaiseminen laitteesta ja kytkeminen uudelleen laitteeseen).



## Tarvikkeiden palauttaminen varastoon

Seuraavien ohjeiden avulla voit varastoida sulaneen kasetin ja virtauskyvetin laitevirheen sattuessa laitteen ajoa edeltävän tarkistuksen aikana ja ennen fluidistorijärjestelmän tarkistusta.

1. Erotta virtauskyvetti kasetista.
2. Poista ja hävitä laimennettu kirjasto säiliöstä (enintään ~18 µl).
-  Valmista samasta kirjastosta uusi laimennos seuraavaa ajoa varten, jotta voidaan välttyä näytteen ristikontaminaatiolta, kun säiliössä on kirjastojäätymiä.
3. Aseta kasetti varastoon 2–8 °C:n lämpötilaan siten, että etiketti on ylöspäin ja ilma pääsee kiertämään kasetin kaikilta sivuilta.  
Varastointi ei saa ylittää 72 tuntia. Mikäli kasettia sulatettiin jääkaapissa 12 tuntia yön yli, se ei saa ylittää 60 tuntia.
4. Laita virtauskyvetti takaisin alkuperäiseen foliopakkaukseen yhdessä kuivausaineen kanssa.
5. Sulje foliopakkaus teipillä ja varastoi se 2–8 °C:n lämpötilaan.  
Varastointi ei saa ylittää 72 tuntia.

## Ajon peruuttaminen

1. Valitse **End Run** (Lopeta ajo).
2. Voit automaattisesti tyhjentää reagenssikasetin valitsemalla **Purge Reagent Cartridge** (Tyhjennä reagenssikasetti) -valintaruudun.  
Oletusarvoinen valinta määritetään NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston asetuksissa.
3. Valitse **Yes, end the sequencing run** (Kyllä, lopetetaan sekvensointiajo).  
Ajon peruuttaminen on lopullinen. Ohjelmisto ei voi jatkaa ajoa eikä kulutustarvikkeita saa käyttää uudelleen ajoa edeltäviin tarkistuksiin kuuluvien laitetta koskevien tarkistusten jälkeen.
4. Valitsemalla **Eject Cartridge** (Poista kasetti) voit avata visiirin ja poistaa alustan.
5. Poista kasetti alustalta.
6. Säilytä tai hävitä kasetti sen mukaan, milloin peruutus tapahtui:

Olosuhde	Instanssi
Peruutit ennen instrumentin esiajotarkistusta tai sen aikana ja haluat käyttää tarvikkeita uudelleen.	Katso <a href="#">Tarvikkeiden palauttaminen varastoon sivulla 80</a> .
Kaikki muut olosuhteet.	Katso <a href="#">Tarvikkeiden purkaminen sivulla 52</a>

7. Valitsemalla **Close Door** (Sulje ovi) voit ladata alustan uudelleen ja palata aloitusnäyttöön.  
Anturit vahvistavat, että kasetti on poistettu.

## Ajon asettaminen uudelleen jonoon

Jos toissijaisen analyysin tilassa näkyy virhe prosessinhallinnassa, voit jonottaa ajon uudelleen, jotta suoritetaan uudelleen instrumentin DRAGEN-analyysi luoduista cBCL-tiedostoista. Alkuperäisen ajokansion on edelleen oltava läsnä instrumentissa, jotta uudelleenjonotustoimintoa voidaan käyttää. Uudelleenjonotustoiminnolla ei aseteta uudelleen jonoon ajoja BaseSpace Sequence Hubissa. Voit suorittaa jonotuksen uudelleen BaseSpace Sequence Hubissa tutustumalla korjausnäytetiedostoon BaseSpace Sequence Hubin Help Centerissä.

1. Päivitä näytetiedosto v2 ja tallenna sitten näytetiedosto siirrettävään tai asennettuun verkkoasemaan.
2. Jos tallensit näytetiedoston siirrettävään levyasemaan, liitä muistitikku USB 3.0 -porttiin, joka sijaitsee sekä instrumentin sivulla että sen takana. Siirrä laitetta tarvittaessa varoen, jotta saat laitteen takaosan esiin.
3. Valitse ohjausohjelmiston valikko ja valitse sitten **Process Management** (Prosessinhallinta).
4. Varmista, että käynnissä ei ole sekvensointiajoja tai instrumentin toissijaisia analyysejä.
5. Valitse **Requeue** (Aseta uudelleen jonoon) uudelleen jonoon asetettavan valmiin ajon vieressä.
6. Valitsemalla **Choose** (Valitse) voit navigoida päivitettyyn näytetiedostoon ja valita sitten **Open** (Avaa).
7. Valitse **Start Requeue** (Käynnistä uudelleenjonotus).

## Virran katkaiseminen laitteesta ja kytkeminen uudelleen laitteeseen

Järjestelmä suljetaan ja käynnistetään turvallisesti uudelleen katkaisemalla virta laitteesta ja kytkemällä virta uudelleen laitteeseen. Tämä korjaa katkenneen yhteyden, kohdistaa teknisen tiedon ja korjaa alustusvian. Ohjelmisto ilmoittaa, kun virran katkaisemisesta ja uudelleen kytkemisestä voi olla apua virheen tai varoituksen syyn korjaamisessa.

1. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **Shut Down Instrument** (Sammuta laite).
2. Jos järjestelmä ei sammu, pidä virtapainiketta painettuna laitteen oikealla sivulla, kunnes valot himmenevät.
3. Kun virtapainike sykkii, katkaise virta (O) takapaneelin vipukytkimen sivusta. Virtapainike voi sykkiä, vaikka virta on katkaistu.



Kuva 8 Vipukytkimen sijainti



4. Odota 30 sekuntia.
5. Kytke virta päälle (I) vipukytkimen sivusta.
6. Kun virtapainike sykkii, odota 30 sekuntia ja paina sitä.

Kuva 9 Virtapainikkeen sijainti



7. Odota noin 5 minuuttia käyttöjärjestelmän latautumista. Kun käyttöjärjestelmä on ladattu, kirjaudu järjestelmään.  
Ohjausohjelmisto käynnistyy ja alustaa järjestelmän. Odota järjestelmän alustusta noin 5 minuuttia. Aloitusnäyttö avautuu näytölle, kun alustus on valmis.

## Järjestelmätarkistuksen suorittaminen

Järjestelmätarkistus ei ole tarpeen normaalin käytön tai laitteen huollon aikana. Illuminan teknisen tuen edustaja voi kuitenkin pyytää sinua suorittamaan järjestelmätarkistuksen vianmäärittystä varten.

Neljän alijärjestelmätarkistuksen kesto on noin 58 minuuttia ajoa edeltävän tarkistuksen virheiden ja muiden ongelmien vianmäärittystä varten. Testeillä varmistetaan, että osat on kohdistettu oikein ja että ne ovat toimintakunnossa.

Testitulokset tulostetaan `system-check`-kansioon, joka sijaitsee kohdassa `/usr/local/illumina/system-check`.

Varmista, että kasetti poistetaan ennen järjestelmätarkistusten suorittamista.

## Järjestelmätarkistuksen suorittaminen

1. Valitse ohjausohjelmistovalikosta **System Checks** (Järjestelmätarkistukset).
2. Rastita valintaruutu kaikkien sellaisten järjestelmätarkistusten kohdalla, jotka haluat suorittaa.
  - **Verkkoyhteys** — Tarkistaa verkkoyhteyden tilan ja suorituskyvyn.
  - **Kotelointi** — Tarkistaa lämpöjärjestelmän ja visiirin nostomekanismin suorituskyvyn.
  - **Liike** — Tarkistaa liikerajat ja Z- ja XY-vaiheen suorituskyvyn.
  - **Optiikka** — Tarkistaa kuvantamismoduulin suorituskyvyn.
3. Valitse **Start** (Aloita).


## Tehdasasetusten palautus

Palauta ohjelmisto vanhempaan versioon tai palaudu ei-toivotusta määrytyksestä palauttamalla järjestelmä tehdasasetuksiin. Vain Illuminan pitäisi käyttää tätä ominaisuutta.

## Kaappaa asennettu kuva

Kaappaa järjestelmäkuva toimivan ohjelmistoasennuksen varmuuskopiointia varten. Tämä järjestelmäkuva voidaan palauttaa myöhemmin. On suositeltavaa kaapata järjestelmäkuva heti alustavan asennuksen valmistumisen jälkeen ja sen jälkeen, kun salasana on vaihdettu Illuminan edustajan avulla.

1. Käynnistä Linux uudelleen.
2. Valitse käyttöjärjestelmän kehotuksesta **Capture Installed Image** (Kaappaa asennettu kuva). Käyttöjärjestelmävaihtoehdot näytetään lyhyeksi aikaa, ennen kuin siirrytään automaattisesti NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistoon.

 Koska muistissa on vain yksi kuva, se korvaa aiemmin kaapatun kuvan.

3. Odota noin 30 minuuttia, jotta järjestelmä kaappaa kulloinkin asennetun kuvan. Kaappaus voi vaatia useamman uudelleenkäynnistyksen. Kun se on valmis, järjestelmä käynnistetään uudelleen niin, että kulloinkin asennettu kuva on tallennettu muistiin.

## Kuvakaappauksen palauttaminen

Palauta järjestelmä edelliseen kuvakaappaukseen, jotta se palautuu ei-toivotusta kokoonpanosta.

1. Käynnistä Linux uudelleen.
2. Kun kehote pyytää valitsemaan käyttöjärjestelmän, valitse **Restore to Installed Image** (Asennetun kuvan palautus). Käyttöjärjestelmävaihtoehdot näytetään lyhyeksi aikaa, ennen kuin siirrytään automaattisesti NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistoon.

**i** | Salasanat ovat sidoksissa järjestelmäkuvaan. Käytä palautuksen jälkeen palautetun kuvan salasanaa kirjautuaksesi järjestelmään.

3. Odota noin 30 minuuttia, että palautus on valmis.

Palautus voi vaatia useamman uudelleenkäynnistyksen. Kun se on valmis, järjestelmä käynnistetään uudelleen niin, että näytetään palautettu kuva.

# Resurssit ja viitteet

## Näytetiedoston v2 asetukset

Mikäli käytetään paikallista tilaa, voit käyttää näytetiedoston v2 tiedostomuotoa ajoasetustesi määrittämiseen. Luo näytetiedosto Instrument Run Setup (Laitteajon asettaminen) -kohdassa tai muokkaamalla *NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmän näytetiedoston v2 mallinetta*. Varmista näytetiedostoa muokattaessa, että seuraavat osiot ja kentät sisällytetään luetellussa järjestyksessä ja että ne vastaavat vaatimuksia. Käytä muokkauksen jälkeen siirrettävää tai asennettua verkkoasemaa näytetiedoston siirtämiseksi NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmiin. Kun navigoit näytetiedostoon ohjausohjelmistossa, se kopioidaan ajoa edeltävään kansioon instrumentissa, jotta siirrettävä asema voidaan poistaa.

Varmista, että näytetiedoston v2 asetukset vastaavat seuraavia vaatimuksia:

- BCLConvert\_Data -näytetiedosto-osiossa määritettyjen indeksisekvenssien on vastattava NextSeq 1000/2000:ssa valittua indeksisarjaa.
- Jos käytetään NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistoa v1.2, näytetiedostossa määritetty DRAGEN-versio on asennettava, ja sen on oltava aktiivinen järjestelmässä. Katso asennustiedot kohdasta [Ohjelmistopäivitykset sivulla 74](#) (Ohjelmistopäivitykset).
- Jos käytetään NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmistoa v1.3, näytetiedostossa määritetty DRAGEN-versio on asennettava järjestelmään. Ohjausohjelmisto havaitsee automaattisesti DRAGEN-version näytetiedostosta ja kehottaa sinua tarvittaessa vaihtamaan aktiivista versiota. Katso asennustiedot kohdasta [Ohjelmistopäivitykset sivulla 74](#) (Ohjelmistopäivitykset).

Jos käytössä on DRAGEN, on määritettävä lisäasetuksia. Lisätietoja on [DRAGEN-näytetiedoston asetukset sivulla 89](#)

Lataa näytetiedoston v2 malline Tuotetiedostoista NextSeq 1000- ja NextSeq 2000 -sekvensointijärjestelmien tukisivulla. Mikäli loit näytetiedoston Instrument Run Setup (Laitteajon asettaminen) -toiminnolla, näytetiedoston muuttaminen alustavan latauksen jälkeen saattaa johtaa analyysin epäonnistumiseen.

Tiedostonimissä ei saa olla erikoismerkkejä.

## [Otsikko] Vaatimukset

[Otsikko]-osio sisältää kokonaistietoja ajosta. Seuraavassa ovat käytettävissä olevat [Otsikko]-kentät ja -kuvaukset.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
FileFormatVersion	Kyllä	Näytetiedostoversio. Syötä arvon kohdalle 2.
RunName	Ei	Haluamasi ainutkertainen ajonimi. RunName-ajonimessä voi olla alfanumeerisia merkkejä, alaviivoja, yhdysviivoja ja pisteitä. Mikäli RunName-nimessä on välilyöntejä tai erikoismerkkejä, analyysi epäonnistuu.
RunDescription	Ei	Ajon kuvaus.
InstrumentPlatform	Ei	NextSeq 1000/2000
InstrumentType	Ei	NextSeq 1000/2000

## [Readit] Vaatimukset

[Readit]-osiossa kuvataan genomisessa ja indeksireadissa 1 ja 2 käytettävä sekvensointijaksojen määrä. Seuraavassa ovat käytettävissä olevat [Readit]-kentät ja -kuvaukset.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Read1Cycles	Kyllä	Jaksojen määrä ensimmäisessä readissa. Arvon on oltava kokonaisluku, joka on suurempi kuin nolla.
Read2Cycles	Ei	Jaksojen määrä toisessa readissa.
Index1Cycles	Ei	Jaksojen määrä ensimmäisessä indeksireadissa. Vaaditaan, kun sekvensoidaan useampia näytteitä. Maksimi on 10 jaksoa.
Index2Cycles	Ei	Jaksojen määrä toisessa indeksireadissa. Maksimi on 10 jaksoa.

## [Sekvensointiasetukset] Vaatimukset

Määritä [Sekvensointiasetukset]-osion avulla käyttämäsi kirjaston valmistelusarja.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
LibraryPrepKits	Ei	<p>Kirjaston valmistelusarjasi. Sallitaan vain yksi kirjaston valmistelusarja.</p> <p>NextSeq 1000/2000 -ohjausohjelmiston versiossa v1.3 valitaan automaattisesti vaadittava mukautettu resepti, jos Illumina Stranded Total RNA Prep -valmistetta sekä Ribo-Zero Plus -sarjaa tai Illumina Stranded mRNA Prep -sarjaa.</p> <p>Syötä yksi seuraavista arvoista.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Illumina Stranded Total RNA Prep ja Ribo-Zero Plus -sarja — <code>ILMNStrandedTotalRNA</code></li> <li>Illumina Stranded mRNA Prep -sarja — <code>ILMNStrandedmRNA</code></li> </ul>

## BCL-konverttivaatimukset

BCL-konverttiosioissa annetaan tietoa datasi muuntamisesta BCL:stä FASTQ-muotoon. BCL-konverttivaihtoehdot sisältävät kaksi erillistä osiota: [BCL-konverttiasetukset] ja [BCL-konverttidata]. BCL-konverttiosiot edellyttävät tietoa indeksiovitinsekvensseistä. Voit tunnistaa kunkin readin ja indeksin yhteensopivan sovitinsekvenssin tarkistamalla *Illumina-sovitinsekvenssit (asiakirjanro 1000000002694)*.

Seuraavassa ovat käytettävissä olevat [BCL-konverttiasetukset]-kentät ja -kuvaukset.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Ohjelmistoversio	Kyllä	DRAGEN-ohjelmistoversio, joka on kulloinkin asennettuna järjestelmään. Käytä kaikkia kolmea kokonaislukua, jotka on sisällytetty version nimeen. Esimerkiksi 3.5.7.
BarcodeMismatchesIndex1	Ei	Sallittujen yhteensopimattomuuksien määrä ensimmäisen indeksireadin ja indeksisekvenssin välillä. Arvot voivat olla joko 0, 1 tai 2. Oletusarvo on 1.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
BarcodeMismatchesIndex2	Ei	Sallittujen yhteensopimattomuuksien määrä toisen indeksireadin ja indeksisekvenssin välillä. Arvot voivat olla joko 0, 1 tai 2. Oletusarvo on 1.
FastqCompressionFormat	Ei	Voit tuottaa FASTQ-tiedostot *.gz-tiedostona syöttämällä <code>gzip</code> . Voit tallentaa FASTQ-tiedostot *.ora-tiedostona ja käyttää niitä yhdessä DRAGEN-dekompression kanssa syöttämällä <code>dragen</code> .
AdapterRead1	Ei	Sekvenssi, joka leikataan tai peitetään readin 1 päästä. Read 1 -sovitinsekvenssiin sisältyy A, C, G tai T. AdapterRead1 leikkaa jaksot oletusarvoisesti.
AdapterRead2	Ei	Sekvenssi, joka leikataan tai peitetään readin 2 päästä. Read 2 -sovitinsekvenssiin sisältyy A, C, G tai T. AdapterRead2 leikkaa jaksot oletusarvoisesti.
OverrideCycles	Ei	Komentosarja, jota käytetään UMI-jaksojen määrittämiseen ja readin jaksojen peittämiseen. Seuraavat arvot sallitaan: <ul style="list-style-type: none"> <li>N — Määrittää huomiotta jätettävät jaksot.</li> <li>Y — Määrittää sekvensointijaksot.</li> <li>I — Määrittää indeksijaksot.</li> <li>U — Määrittää leikattavat UMI-jaksot.</li> </ul> Elementit on erotettu toisistaan puolipisteillä. Seuraavassa on esimerkkejä OverrideCycles-syötteestä. U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

Seuraavassa ovat käytettävissä olevat [BCL-konverttitiedot]-kentät ja -kuvaukset.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Näytetunnus	Kyllä	Näytteen tunnus. Näytetunnus voi sisältää enintään 20 alfanumeerista merkkiä, ajatusviivaa ja alaviivaa. Tunnus on kirjainkoon huomioon ottava. Erotta jokainen tunnus ajatusviivalla tai alaviivalla. Esimerkiksi näyte1-DQB1-022515.
Hakemisto	Ei	Näytteeseen yhdistettävä indeksisekvenssi. Vain A, C, T ja G sallitaan. Vaaditaan, kun sekvensoidaan useampia näytteitä.
Index2	Ei	Näytteeseen yhdistettävä toinen indeksisekvenssi. Vain A, C, T ja G sallitaan. Varmista, että toisen indeksin (i5) sovitinsekvenssit on suunnattu eteenpäin. DRAGEN täydentää automaattisesti käänteisesti i5 indeksiä toissijaisen analyysin aikana.
Kaista	Ei	Virtauskyvetin kaista. Kaistoja edustaa yksi kokonaisluku.

## DRAGEN-näytetiedoston asetukset

Tässä osiossa kuvataan kunkin DRAGEN-jakson näytetiedostovaatimuksia. Lisää DRAGEN-jakson asetukset näytetiedoston viimeiseksi osioksi. Voit käyttää vain yhtä DRAGEN-jaksoa.

Jokaiseen DRAGEN-jaksoon sisältyy erillisiä osioita asetuksille ja tiedoille.

### DRAGEN-sukusolulinjajakson vaatimukset

Seuraavat ovat saatavilla [DragenGermline\_Settings (Dragenin sukusolulinja-asetukset)] -kentissä ja kuvauksissa.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Ohjelmistoversio	Kyllä	DRAGEN-ohjelmistoversio, joka on kulloinkin asennettuna järjestelmään. Käytä kaikkia kolmea kokonaislukua, jotka on sisällytetty version nimeen. Esimerkiksi 3.5.7. Ohjelmistoversion on vastattava BCLConvert_Settings -osiossa määritettyä versiota.



Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
ReferenceGenomeDir	Kyllä	Viitegenomin nimi. Esimerkiksi hg19_alt_aware. Käytä sen viitegenomin nimeä, joka sijaitsee kohdassa /usr/local/illumina/genomes. Voit käyttää mukautettua viitegenomia tutustumalla <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 -sovelluksen verkko-ohjeeseen</i> .
MapAlignOutFormat	Ei	Tulostustiedoston formatointi. Sallitut arvot ovat bam tai cram. Mikäli arvoa ei ole määritetty, se on oletusarvoisesti ei mitään.
KeepFastq	Ei	Voit tallentaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>true</code> (tosi). Voit poistaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>false</code> (epätosi).

Seuraavassa ovat käytettävissä olevat [DragenGermline\_Data (Dragenin sukusolulinjatiedot) -kentät ja kuvaukset.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Näytetunnus	Kyllä	Näytteen tunnus. Näytetunnus voi sisältää enintään 20 alfanumeerista merkkiä. Tunnus on kirjainkoon huomioon ottava. Erotta jokainen tunnus ajatusviivalla. Esimerkiksi näyte1-DQB1-022515. Näytetunnusten on vastattava BCLConvert_Data-osiossa määritettyjä tunnuksia.

## DRAGEN RNA -jakson vaatimukset

Seuraavat ovat saatavilla [DragenRNA\_Settings (Dragen RNA -asetukset) -kentissä ja kuvauksissa.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Ohjelmistoversio	Kyllä	DRAGEN-ohjelmistoversio, joka on kulloinkin asennettuna järjestelmään. Käytä kaikkia kolmea kokonaislukua, jotka on sisällytetty version nimeen. Esimerkiksi 3.5.7. Ohjelmistoversion on vastattava BCLConvert_Settings -osiossa määritettyä versiota.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
ReferenceGenomeDir	Kyllä	Viitegenomin nimi. Esimerkiksi hg38_noalt_with_decoy. Käytä sen viitegenomin nimeä, joka sijaitsee kohdassa <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Voit käyttää mukautettua viitegenomia tutustumalla <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 -sovelluksen verkko-ohjeeseen</i> .
RnaGeneAnnotationFile	Ei	Tiedosto, joka sisältää RNA-geeni huomautuksia. Vain alfanumeeriset merkit sallitaan. Mikäli huomautustiedostoa ei ole, käytetään oletusarvoista huomautustiedostoa, joka sisältyy määritettyyn viitegenomiin.
MapAlignOutFormat	Ei	Tulostustiedoston formatointi. Sallitut arvot ovat bam tai cram. Mikäli arvoa ei ole määritetty, se on oletusarvoisesti ei mitään.
KeepFastq	Ei	Voit tallentaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>true</code> (tosi). Voit poistaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>false</code> (epätosi).
DifferentialExpressionEnable	Ei	Voit ottaa differentiaalisen geenin ilmentymän käyttöön syöttämällä <code>true</code> (tosi). Syöttämällä <code>false</code> (epätosi) voit sulkea differentiaalisen geenin ilmentymän pois analyysistä.

Seuraavassa ovat käytettävissä olevat [DragenRna\_Data (Dragen Rna-tiedot) -kentät ja kuvaukset.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Näytetunnus	Kyllä	Näytteen tunnus. Näytetunnus voi sisältää enintään 20 alfanumeerista merkkiä. Tunnus on kirjainkoon huomioon ottava. Erotta jokainen tunnus ajatusviivalla. Esimerkiksi näyte1-DQB1-022515. Näytetunnusten on vastattava BCLConvert_Data-osiossa määritettyjä tunnuksia.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Vertailu<N>	Ei	Kunkin näytteen kontrolli- tai vertailuarvo. Mikäli näytteellä ei ole kontrolli- tai vertailuarvoa, näytteen arvoksi määritetään <code>na</code> . Kaikkia näytteitä, jotka on merkitty kontrolliarvolla, verrataan kaikkiin näytteisiin, jotka on merkitty vertailuarvolla. <code>N</code> -arvo heijastaa näytteiden vertailuryhmää.

## DRAGEN-rikastusjakson vaatimukset

Seuraavat ovat saatavilla [DrageEnrichment\_Settings (Drage -rikastusasetukset) ]-kentissä ja kuvauksissa.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Ohjelmistoversio	Kyllä	DRAGEN-ohjelmistoversio, joka on kulloinkin asennettuna järjestelmään. Käytä kaikkia kolmea kokonaislukua, jotka on sisällytetty version nimeen. Esimerkiksi 3.5.7. Ohjelmistoversion on vastattava BCLConvert_Settings -osiossa määritettyä versiota.
ReferenceGenomeDir	Kyllä	Viitegenomin nimi. Esimerkiksi <code>hg38_alt_aware</code> . Viitegenomit sijaitsevat kohdassa <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Voit käyttää mukautettua viitegenomia tutustumalla <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 -sovelluksen verkko-ohjeeseen</i> .
BedFile	Kyllä	Bed-tiedosto, joka sisältää kohdennettavat alueet.
GermlineOrSomatic	Kyllä	Voit suorittaa rikastuksen sukusolulinja-analyysin syöttämällä <code>germline</code> (sukusolulinja). Voit suorittaa rikastuksen somaattisen analyysin syöttämällä <code>somatic</code> (somaattinen).
KeepFastq	Ei	Voit tallentaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>true</code> (tosi). Voit poistaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>false</code> (epätosi).

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
MapAlignOutFormat	Ei	Tulostustiedoston formatointi. Sallitut arvot ovat bam tai cram. Mikäli arvoa ei ole määritetty, se on oletusarvoisesti ei mitään.
AuxNoiseBaselineFile	Ei	Melun lähtötasotiedoston nimi. Voit käyttää *.txt- tai *.gz-tiedostomuotoa. Melun lähtötasotiedostot ovat saatavilla vain, kun käytetään somaattista tilaa. Katso lisätietoja kohdasta <a href="#">Melun lähtötasotiedostojen luonti sivulla 18</a> .

Seuraavat ovat saatavilla [DragenEnrichment\_Data (Dragen -rikastustiedot) -kentissä ja kuvauksissa.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Näytetunnus	Kyllä	Näytteen tunnus. Näytetunnus voi sisältää enintään 20 alfanumeerista merkkiä. Tunnus on kirjainkoon huomioon ottava. Erotta jokainen tunnus ajatusviivalla. Esimerkiksi Sample1-DQB1-022515 -näytetunnusten on vastattava BCLConvert_Data-osiossa määritettyjä tunnuksia.

## DRAGEN DNA Amplicon -jaksovaatimukset

Seuraavat ovat saatavilla [DragenAmplicon\_Settings (DragenAmplicon-asetukset) -kentissä ja kuvauksissa.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Ohjelmistoversio	Kyllä	DRAGEN-ohjelmistoversio, joka on kulloinkin asennettuna järjestelmään. Käytä kaikkia kolmea kokonaislukua, jotka on sisällytetty version nimeen. Esimerkiksi 3.5.7. Ohjelmistoversion on vastattava BCLConvert_Settings -osiossa määritettyä versiota.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
ReferenceGenomeDir	Kyllä	Viitegenomin nimi. Esimerkiksi hg38_alt_aware. Viitegenomit sijaitsevat kohdassa /usr/local/illumina/genomes. Voit käyttää mukautettua viitegenomia tutustumalla <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 -sovelluksen verkko-ohjeeseen</i> .
DnaBedFile	Kyllä	Bed-tiedosto, joka sisältää kohdennettavat alueet. Bed-tiedosto voidaan syöttää *.txt- tai *.gz-tiedostomuodossa.
DnaGermlineOrSomatic	Kyllä	Voit suorittaa DNA Amplicon -sukusolulinja-analyysin syöttämällä <code>germline</code> (sukusolulinja). Voit suorittaa somaattisen DNA Amplicon -analyysin syöttämällä <code>somatic</code> (somaattinen).
KeepFastq	Ei	Voit tallentaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>true</code> (tosi). Voit poistaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>false</code> (epätosi).
MapAlignOutFormat	Ei	Tulostustiedoston formatointi. Sallitut arvot ovat bam tai cram. Mikäli arvoa ei ole määritetty, se on oletusarvoisesti ei mitään.

Seuraavat ovat saatavilla [DragenAmplicon\_Data (DragenAmplicon-tiedot) -kentissä ja kuvauksissa.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Näytetunnus	Kyllä	Näytteen tunnus. Näytetunnus voi sisältää enintään 20 alfanumeerista merkkiä. Tunnus on kirjainkoon huomioon ottava. Erotta jokainen tunnus ajatusviivalla. Esimerkiksi Sample1-DQB1-022515 -näytetunnusten on vastattava BCLConvert_Data-osiossa määritettyjä tunnuksia.
DnaOrRna	Kyllä	Suoritettavan Amplicon-analyysin tyyppi. DRAGEN v3.8:n osalta tuetaan vain DNA-analyysiä. Syötä <code>dna</code> .

## DRAGEN yksisolu-RNA -jakson vaatimukset

Seuraavat ovat saatavilla [DragenSingleCellRNA\_Settings (Dragen yksisolu-RNA -asetukset) -kentissä ja kuvauksissa. Tietoja kolmannen osapuolen sarjojen yhteensopivuudesta on DRAGEN Bio-IT Platform Product Compatibility -tukisivulla.

## Yksisolu-kirjastosarja 1—5

Seuraavat näytetiedostoasetukset koskevat sellaisia kirjaston valmisteluserjoja, joilla on sama geneettinen rakenne kuin DRAGEN yksisolu-kirjastosarjoilla 1—5. Voit vahvistaa sarjasi geneettisen rakenteen DRAGEN Bio-IT Platform Product Compatibility -tukisivun avulla.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Ohjelmistoversio	Kyllä	DRAGEN-ohjelmistoversio, joka on kulloinkin asennettuna järjestelmään. Käytä kaikkia kolmea kokonaislukua, jotka on sisällytetty version nimeen. Esimerkiksi 3.5.7. Ohjelmistoversion on vastattava BCLConvert_Settings -osiossa määritettyä versiota.
ReferenceGenomeDir	Kyllä	Viitegenomin nimi. Esimerkiksi hg38_alt_aware. Viitegenomit sijaitsevat kohdassa <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Voit käyttää mukautettua viitegenomia tutustumalla <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 -sovelluksen verkko-ohjeeseen</i> .
RnaLibraryType	Ei	Syötä yksi seuraavista arvoista: <ul style="list-style-type: none"> <li>• SF — Säikeet eteenpäin. SF on oletusarvo.</li> <li>• SR — Käänteiset säikeet.</li> <li>• U — Säikeetön.</li> </ul>
RnaGeneAnnotationFile	Ei	Tiedosto, joka sisältää RNA-geenihuomautuksia. Vain alfanumeeriset merkit sallitaan. Mikäli huomautustiedostoa ei ole, käytetään oletusarvoista huomautustiedostoa, joka sisältyy määritettyyn viitegenomiin.
BarcodeRead	Ei	Viivakoodin readin sekvensointiajossa oleva sijaintikohde, joka sisältää sekä viivakoodin että UMI:n. Arvoihin saattaa sisältyä <code>Read1</code> tai <code>Read2</code> . Oletusarvo on <code>Read1</code> .

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
BarcodePosition	Kyllä	Emästen sijainti, joka vastaa viivakoodia BarcodeReadille syötetyn arvon puitteissa. Emästen sijainnit on indeksoitu nolasta alkaen. Syötä BarcodePosition-arvo seuraavassa muodossa: 0_<barcode end position> Jos viivakoodiin esimerkiksi sisältyy 16 emästä, arvo on 0_15.
UmiPosition	Kyllä	Emästen sijainti, joka vastaa UMIa BarcodeReadille syötetyn arvon puitteissa. Syötä UmiPosition-arvo seuraavassa muodossa: <UMI-aloitusasema>_<UMI-lopetusasema> Jos esimerkiksi UMI sisältää 10 emästä ja viivakoodissa niitä on 16, arvo on 16_25.
BarcodeSequenceWhitelist	Ei	Sen tiedoston nimi, jossa sisällytettävät viivakoodisekvenssit sijaitsevat. Tiedostonimessä voi olla vain alfanumeerisia merkkejä, yhdysviivoja, alaviivoja ja pisteitä.
KeepFastq	Ei	Voit tallentaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>true</code> (tosi). Voit poistaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>false</code> (epätosi).
MapAlignOutFormat	Ei	Tulostustiedoston formatointi. Sallitut arvot ovat bam tai cram. Mikäli arvoa ei ole määritetty, se on oletusarvoisesti ei mitään.

Seuraavassa ovat käytettävissä olevat [DragenSingleCellRNA\_Data (Dragen yksisolu-RNA-tiedot)] -kentät ja kuvaukset.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Näytetunnus	Kyllä	Näytteen tunnus. Näytetunnus voi sisältää enintään 20 alfanumeerista merkkiä. Tunnus on kirjainkoon huomioon ottava. Erotta jokainen tunnus ajatusviivalla. Esimerkiksi Sample1-DQB1-022515 -näytetunnusten on vastattava BCLConvert_Data-osiossa määritettyjä tunnuksia.

## Yksisolu-kirjastosarja 6

Seuraavat näytetiedostoasetukset koskevat kirjaston valmistelusarjoja, joilla on sama geneettinen rakenne kuin DRAGEN yksisolu-kirjastosarjoilla 6. Voit vahvistaa sarjasi geneettisen rakenteen DRAGEN Bio-IT Platform Product Compatibility -tukisivun avulla.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Ohjelmistoversio	Kyllä	DRAGEN-ohjelmistoversio, joka on kulloinkin asennettuna järjestelmään. Käytä kaikkia kolmea kokonaislukua, jotka on sisällytetty version nimeen. Esimerkiksi 3.5.7. Ohjelmistoversion on vastattava BCLConvert_Settings -osiossa määritettyä versiota.
ReferenceGenomeDir	Kyllä	Viitegenomin nimi. Esimerkiksi hg38_alt_aware. Viitegenomit sijaitsevat kohdassa <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Voit käyttää mukautettua viitegenomia tutustumalla <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 -sovelluksen verkko-ohjeeseen</i> .
RnaLibraryType	Ei	Syötä yksi seuraavista arvoista: <ul style="list-style-type: none"> <li>SF — Säikeet eteenpäin.</li> <li>SR — Käänteiset säikeet.</li> <li>U — Säikeetön.</li> </ul>
RnaGeneAnnotationFile	Ei	Tiedosto, joka sisältää RNA-geenihuomautuksia. Vain alfanumeeriset merkit sallitaan. Mikäli huomautustiedostoa ei ole, käytetään oletusarvoista huomautustiedostoa, joka sisältyy määritettyyn viitegenomiin.
BarcodeRead	Ei	Viivakoodin readin sekvensointiajossa oleva sijaintikohde, joka sisältää sekä viivakoodin että UMI:n. Arvoihin saattaa sisältyä <code>Read1</code> tai <code>Read2</code> . Oletusarvo on <code>Read1</code> .



Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
BarcodePosition	Kyllä	<p>Emästen sijainti, joka vastaa viivakoodeja BarcodeReadille syötetyn arvon puitteissa. Emästen sijainnit on indeksoitu nolasta alkaen. Syötä BarcodePosition-arvo seuraavassa muodossa:</p> <pre>0_&lt;ensimmäisen viivakoodin lopetusasema&gt;+&lt;toisen viivakoodin aloitusasema&gt;_&lt;toisen viivakoodin lopetusasema&gt;+&lt;kolmannen viivakoodin aloitusasema&gt;_&lt;kolmannen viivakoodin lopetusasema&gt;</pre> <p>Esimerkiksi seuraava rakenne tuottaisi tulokseksi arvon 0_8+21_29+43_51:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 9 emästä ensimmäisessä viivakoodissa (0_8).</li> <li>• 12 emästä ensimmäisen ja toisen viivakoodin välissä.</li> <li>• 9 emästä toisessa viivakoodissa (21_29).</li> <li>• 13 emästä toisen ja kolmannen viivakoodin välissä.</li> <li>• 9 emästä kolmannessa viivakoodissa (43_51).</li> </ul>
UmiPosition	Kyllä	<p>Emästen sijainti, joka vastaa UMIa määritetyn BarcodeReadin puitteissa. Syötä jono seuraavassa muodossa:</p> <pre>&lt;UMI-aloitusasema&gt;_&lt;UMI-lopetusasema&gt;</pre> <p>Jos esimerkiksi UMI sisältää 8 emästä ja jos emästen määrä on ennen UMIa yhteensä 51, arvo on 52_59.</p>
BarcodeSequenceWhitelist	Ei	<p>Sen tiedoston nimi, jossa valkoiselle listalle lisättävä viivakoodisekvenssi sijaitsee. Tiedostonimessä voi olla vain alfanumeerisia merkkejä, yhdysviivoja, alaviivoja ja pisteitä.</p>
KeepFastq	Ei	<p>Voit tallentaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>true</code> (tosi). Voit poistaa FASTQ-tulostustiedostot syöttämällä <code>false</code> (epätosi).</p>
MapAlignOutFormat	Ei	<p>Tulostustiedoston formatointi. Sallitut arvot ovat <code>bam</code> tai <code>cram</code>. Mikäli arvoa ei ole määritetty, se on oletusarvoisesti <code>ei mitään</code>.</p>

Seuraavassa ovat käytettävissä olevat [DragenSingleCellRNA\_Data (Dragen yksisolu-RNA-tiedot) -kentät ja kuvaukset.

Kenttä	Pakollinen	Kuvaus
Näytetunnus	Kyllä	Näytteen tunnus. Näytetunnus voi sisältää enintään 20 alfanumeerista merkkiä. Tunnus on kirjainkoon huomioon ottava. Erotta jokainen tunnus ajatusviivalla. Esimerkiksi Sample1-DQB1-022515 -näytetunnusten on vastattava BCLConvert_Data-osiossa määritettyjä tunnuksia.

## Pimeän jakson sekvensointi

Tässä osiossa kuvataan pimeän jakson sekvensointia reseptissä.

Pimeän jakson sekvensointia käytetään vain sekvensointijakson kemiavaiheiden suorittamiseen. Tarkistamalla kirjaston valmistelusarjan [Illumina-tukisivustoa](#) koskevat Yhteensopivat tuotteet -sivulta saat tietää, tarvitaanko pimeän jakson sekvensointia.

Käytä seuraavia vaiheita pimeän jakson sekvensointiin.

### Reseptitiedoston muokkaaminen

- Lataa reseptin XML-tiedosto [Illumina-tukisivustolta](#).
- Muokkaa reseptin XML-tiedostoa.
  - Asianmukainen protokollaosio on tunnistettava readin ja indeksin sekvensoinnin määrittämisen perusteella. Mukautettavaa ja muokattavaa reseptiä kohti on kuusi mahdollista erilaista protokollaa.  
Esimerkiksi sellaisen yksittäisen Read 1 -kohteen protokolla, jossa ei ole indeksin sekvensoinnin määrittämistä, olisi `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
  - Syötä ennen `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` ja `<ReadRef ReadName="Read 2"/>` -tietoja seuraava pimeän jakson vaihe uudelle riville.  
`<DarkCycle ChemistryName="Pimeä jakso ennen ensimmäistä emästä" />`.
  - Syötä pimeän jakson vaihe uudelle riville jokaisen tarvittavan pimeän jakson kohdalla.
- Tallenna reseptin XML -tiedosto.

Seuraavassa on esimerkki näytereseptistä, jossa on pimeä jakso:

```
<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Ensisijainen kasetti" />
  <ChemistryRef ChemistryName="BIX-sekoitus" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Ensisijainen kasetti" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp-siirto" />
```

```
<ChemistryRef ChemistryName="ExAmp-sekoitus" />
<ChemistryRef ChemistryName="Ensisijainen kasetti" />
<Obdd ChemistryName="Kirjaston denaturointi ja laimennus" />
<ChemistryRef ChemistryName="Ensisijainen kasetti" />
<Obcg ChemistryName="Klusterin luonti" />
<ChemistryRef ChemistryName="SBS Prime" />
<ChemistryRef ChemistryName="Read-valmistelu" />
<DarkCycle ChemistryName="Pimeä jakso ennen ensimmäistä emästä" />
<ReadRef ReadName="Read 1" />
<SetThermalZoneTemp Enable="false" Zone="FlowCellHeater" />
</Protokolla>
<Protocol Name="1 Read 1 Index" ProtocolType="1Read1Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Käynnistä" />
  <ChemistryRef ChemistryName="2 min 60 C tyhjiön pito" />
  ...
```

## Liitä resepti ajoon

- 1 Valitse ohjausohjelmiston Run Setup (Ajon asettaminen) -kohdasta **Choose** (Valitse) kohdassa Custom Recipe (Mukautettu resepti).
- 2 Navigoi päivitettyyn reseptin XML-tiedostoon.
- 3 Valitse **Open** (Avaa).
4. Palaa kohtaan [Sekvensointiajon alustaminen sivulla 46](#).

# Hakemisto

## %

%PF 59

## A

ajojen poistaminen 6, 74  
ajokansio 74  
ajolaskuri 6  
ajon koko 74  
ajon käyttöönotto  
  esimerkit 31  
ajon tila 6  
ajoparametrien muokkaus 49  
ajoparametrit  
  muokkaus 49  
ajot  
  mittaustiedot 54  
alkoholiliinat 28  
alustus 82  
  vika 81  
analyysi  
  menetelmät 5, 9  
apu, tekninen, asiakastuki 105  
asennusohjelmisto 74  
audioasetukset 21  
automaattiset päivitykset 74

## B

BaseSpace Sequence Hub  
  asetukset 14  
  dokumentaatio 14  
BaseSpace Sequence Hub -keskitin 1  
BCL-tiedostot 6  
bcl2fastq2 54

## C

CBCL-tiedostot 59  
CE 54

## D

D-asema 74  
denaturointi 8  
dokumentaatio 105

## E

ei tunnistuksia 56-57  
emäksen tunnistaminen 5  
emäksen tunnistamisen tiedostot 9  
emäksen tunnistustiedostot 60  
emästen tunnistustiedostot 54  
ensimmäinen käyttöönotto 77, 83  
Enterprise-tilaus 14  
Ethernet-kaapeli 4  
Ethernet-portti 4

## F

FASTQ-konvertointi 54

## H

hallinta-alueet 14  
hiiri 4  
hälytykset 74

## I

Illumina Proactive Support -palvelu 14  
ilmansuodattimet  
  sijainti 77  
  varaosat 28  
indeksi  
  jaksot 31  
internetyhteys 14  
InterOp-tiedostot 54, 60  
IP-osoite 6

## J

jaksonumerot 31  
järjestelmän ohjelmistopakettin  
    asennusohjelma 74  
järjestelmätarkistukset 79  
jääkaapin tekniset tiedot 28

## K

kaistat 55  
kaksikanavasekvensointi 57  
kamerat 55  
kannet  
    sulkeminen 51  
kasetti  
    lataussuunta 51  
katkenneet yhteydet 81  
kiintolevyasema 6, 74  
kirjastot  
    denaturointi 8  
klusterin voimakkuudet 56  
klusterisijainnit 54, 60  
kutsumanimi 21  
kuva-analyysi 5  
kuvakkeet 6  
kuvantaminen 54-55  
kuvat 54  
käyttöjärjestelmä 82

## L

laatutaulukot 59  
laimennuskirjastot 8  
laitteen suoritustiedot 14  
levytila 6, 74  
lisäjaksot 31  
Local Run Manager 5  
lokitiedostot 55  
luettelonumerot 27

## M

mallineen luonti 56  
manuaaliset ohjelmistopäivitykset 74  
monistus 8

## N

nanokaivot 56  
NextSeq 1000/2000  
    n reagenssit 27  
nimeäminen  
    laitteen nimi 21  
    tietokoneen nimi 6  
nukleotidit 57  
näppäimistöt 4  
näyttö 3

## O

ohjelmisto  
    asennus 74  
    palautus vanhempaan versioon 83  
    päivityshälytykset 22  
ohjelmisto vanhempaan versioon  
    palauttamista varten 83  
ohjelmistopaketti 1, 5  
oletustulostuskansio 49

## P

paikallinen analyysi 1  
paired-end 49  
pakastimen tekniset tiedot 28  
palvelimen sijainti 14  
phasing- ja prephasing-korjaus 57  
PhiX 28  
    kohdistus 54  
PhiX-kontrolli v3 27  
Phred-algoritmi 59  
pikkukuvat 60  
pilvipohjainen analyysi 1  
pinnan numerointi 56

prosessinhallinta 74  
puhaltimet 77  
puhtaussuodatin 59  
punainen kanava 57  
pyyhkäisyypinnat 55-56  
pääsijainti 14

## Q

Q-pisteet 59

## R

read-jaksot 31  
read-pituudet 31  
recipe fragmentit 6  
rekisteröintihäiriöt 56  
reseptit 74  
RSB  
    n vaihtoehto 27  
RunInfo.xml 60  
ruudun numerointi 56  
ruudut 54

## S

sammuttaminen 81  
sarjanumero 6  
sarjat 27  
    tuotenumerot 28  
Sequencing Analysis Viewer 54, 56  
siirtäminen 4  
single-read 49  
suodatintiedostot 54, 60  
suodattimen läpäisy (PF) 59  
suodatuskclusterit 59  
suojukset 28  
suoritustiedot 14

## T

takuu 28  
tarvikelokero 3

tarvikkeet  
    seuranta 1  
tarvikkeiden seuranta 1  
tehtaan oletusarvot 83  
tekninen tuki 105  
teknisen tiedon kohdistus 81  
testisarja 28  
tietojen laatu 59  
tietokoneen nimi 6  
tietokonemoottori 54  
tilapalkki 3  
tippa-alusta  
    suojukset 28  
tukisivut 74  
tulostuskansio 49, 74

## U

UNC-polut 49  
Universal Copy Service 5, 74  
USB-portit 4  
uudelleenikäynnistäminen 83  
Uudelleensuspensiopuskuri 27

## V

vaihtovirta  
    tuloaukko 4  
valkaisuliinat 28  
valkoiset paperit 59  
valopalkki 3  
vanhentumispäivämäärät 77  
varaosat 77  
varoitukset 6, 81  
vihreä kanava 57  
vipukytkin 4, 81  
virheet 6, 81  
    todennäköisyys 59  
    viestit 79  
virhelokit 55  
virran katkaisu ja kytkeminen uudelleen 79  
virtajohto 4  
virtapainike 3, 81

voimakkuusarvot 56  
välineet  
    skannaus 51

## **W**

Windows  
    sisäänkirjautuminen 82

## **Y**

yhdistetyt asemat 49  
yksityinen hallinta-alue 14

## **Ä**

ääniasetukset 21

# Tekninen tuki

Teknisissä kysymyksissä voit ottaa yhteyttä Illuminan tekniseen tukeen.

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

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

## Illuminan teknisen tuen puhelinnumerot

Alue	Ilmainen	Kansainvälinen
Alankomaat	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Australia	+61 1800 775 688	
Belgia	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
Espanja	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Etelä-Korea	+82 80 234 5300	
Filippiinit	+63 180016510798	
Hongkong, Kiina	+852 800 960 230	
Indonesia		0078036510048
Intia	+91 8006500375	
Irlanti	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Italia	+39 800 985513	+39 236003759
Itävalta	+43 800 006249	+43 1 9286540
Japani	+81 0800 111 5011	
Kanada	+1 800 809 4566	
Kiina		+86 400 066 5835
Malesia	+60 1800 80 6789	
Norja	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Ranska	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Ruotsi	+46 2 00883979	+46 8 50619671
Saksa	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Singapore	1 800 5792 745	
Suomi	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110



Alue	Ilmainen	Kansainvälinen
Sveitsi	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Taiwan, Kiina	+886 8 06651752	
Tanska	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
Thaimaa	+66 1800 011 304	
Uusi-Seelanti	+64 800 451 650	
Vietnam	+84 1206 5263	
Yhdistynyt kuningaskunta	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
Yhdysvallat	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566

**Käyttöturvallisuustiedotteet (KTT)** – saatavilla Illuminan verkkosivustolta osoitteesta [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

**Tuotedokumentaatio** – ladattavissa osoitteesta [support.illumina.com](http://support.illumina.com).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1 800 809.ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (Pohjois-Amerikan ulkopuolella)

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

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

**Vain tutkimuskäyttöön. Ei diagnostisiin toimenpiteisiin.**

© 2021 Illumina, Inc. Kaikki oikeudet pidätetään.

**illumina®**