

NextSeq 1000 un 2000

Sekvenēšanas sistēmas rokasgrāmata

ILLUMINA ĪPAŠUMS

Dokuments Nr. 1000000109376 v04 LAV

2021. gada aprīlis

Tikai pētniecības nolūkiem. Nav izmantojams diagnostikas procedūrās.

Šī dokumenta un tā satura īpašumtiesības pieder uzņēmumam Illumina, Inc. un tā saistītajiem uzņēmumiem ("Illumina"), un klients to drīkst izmantot tikai līgumā noteiktajā veidā saistībā ar šajā dokumentā aprakstīto izstrādājumu lietošanu, un nekādiem citiem nolūkiem. Šo dokumentu un tā saturu nedrīkst izmantot vai izplatīt nekādiem citiem nolūkiem un/vai citādi publiskot, atklāt vai reproducēt jebkādā veidā bez iepriekšējas rakstiskas Illumina piekrišanas. Ar šo dokumentu Illumina nenodod nekādas licences, ko paredz tā patents, preču zīmes, autortiesības vai anglosakšu tiesības, nedz arī līdzīgas jebkuras trešās puses tiesības.

Šajā dokumentā sniegtie norādījumi ir stingri un precīzi jāievēro kvalificētiem un atbilstoši apmācītiem darbiniekiem, lai nodrošinātu šeit aprakstītā(-o) produkta(-u) pareizu un drošu lietošanu. Pirms šī izstrādājuma(-u) lietošanas ir pilnībā jāizlasa un jāizprot viss šī dokumenta saturs.

PILNĪBĀ NEIZLASOT UN PRECĪZI NEIEVĒROJOT VISUS ŠAJĀ DOKUMENTĀ IEKĻAUTOS NORĀDĪJUMUS, VAR RASTIES PRODUKTA(-U) BOJĀJUMI, PERSONU MIESAS BOJĀJUMI, TOSTARP LIETOTĀJU UN CITU PERSONU, UN CITA ĪPAŠUMA BOJĀJUMI, TURKLĀT TIKS ANULĒTAS VISAS PRODUKTAM(-IEM) PIEMĒROJAMĀS GARANTIJAS.

ILLUMINA NEUZŅEMAS NEKĀDU ATBILDĪBU, KAS IZRIET NO NEPAREIZAS ŠAJĀ DOKUMENTĀ APRAKSTĪTO PRODUKTU (TOSTARP TĀ DAĻU VAI PROGRAMMATŪRAS) LIETOŠANAS.

© 2021 Illumina, Inc. Visas tiesības paturētas.

Visas preču zīmes ir Illumina, Inc. vai to attiecīgo īpašnieku īpašums. Konkrētu informāciju par preču zīmēm skatiet vietnē www.illumina.com/company/legal.html.

Pārskatījumu vēsture

Dokuments #	Datums	Izmaiņu apraksts
1000000109376 v04	2021. gada aprīlis	Pievienotas bāzlīnijas failu importēšanas instrukcijas. Pievienota DRAGEN DNA Amplicon darbplūsma. Pievienotas NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras v1.3 funkcijas. Pievienota informācija par starpniekservera atlasī. Atjaunināta RSB ar Tween 20 piegādes un glabāšanas temperatūra. Atjaunināta DRAGEN RNA darbplūsma, iekļaujot diferenciālo gēnu izteiksmi. Atjaunināta sekvenēšanas izvades mapju struktūra. Atjaunināti parauga lapas v2 formatēšanas ieteikumi.
1000000109376 v03	2020. gada novembris	Izlaboti kataloga numuri. Pievienota informācija par jaunu lietotāju pievienošanu.

Dokuments #	Datums	Izmaiņu apraksts
1000000109376 v02	2020. gada oktobris	<p>Pievienots NextSeq 1000/2000 P3 reaģentu komplekts.</p> <p>Pievienota DRAGEN Single Cell RNA darbplūsma.</p> <p>Pievienota DRAGEN Enrichment darbplūsma.</p> <p>Pievienotas FASTQ saspiešanas opcijas.</p> <p>Pievienotas DRAGEN informācijas avota instalēšanas un licences atjaunināšanas instrukcijas.</p> <p>Pievienotas pielāgotu atsauces genomu importēšanas instrukcijas.</p> <p>Atjaunināts bibliotēku tipu ievietošanas tilpums un koncentrācijas.</p> <p>Atjauninātas bibliotēku atšķaidīšanas instrukcijas.</p> <p>Pievienotas reaģentu kasetnes automātiskās iztīrīšanas instrukcijas.</p> <p>Atjaunināta informācija par atbalstīto ciklu skaitu.</p> <p>Atjauninātas iekārtas pielāgošanas opcijas.</p> <p>Atjauninātas iekārtas izpildes iestatījumu instrukcijas.</p> <p>Atjaunināta DRAGEN sekvenēšanas izvades struktūra.</p> <p>Pievienota informācija par DRAGEN QC pārskatiem.</p> <p>Pievienota informācija par pielāgotu atsauces genomu noņemšanu no cietā diska.</p> <p>Pievienota informācija par sistēmas pārbaužu veikšanu.</p> <p>Atjaunināti parauga lapas v2 iestatījumi.</p>

Dokuments #	Datums	Izmaiņu apraksts
1000000109376 v01	2020. gada jūnijs	<p>Atjaunināti NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras apraksti.</p> <p>Precizēta atšķirība starp mākoņa, hibrīdo, lokālo un autonomo režīmu visā rokasgrāmatā.</p> <p>Atjauninātas kasetņu glabāšanas un atkausēšanas instrukcijas.</p> <p>Atjaunināta informācija par atbalstīto ciklu skaitu.</p> <p>Atjauninātas sekundārās analīzes iestatīšanas instrukcijas.</p> <p>Atjaunināti reaģentu komplektu kataloga numuri.</p> <p>Atjaunināta sekvenēšanas protokola diagramma.</p> <p>Atjauninātas instrukcijas, kā norādīt tīkla disku kā noklusējuma izvades mapi.</p> <p>Atjaunināta atbalstīto bibliotēku tipu tabula.</p> <p>Pievienotas pielāgota atsauces genoma importēšanas instrukcijas.</p> <p>Pievienotas instrukcijas, kā iestatīt izpildi, izmantojot pielāgotu rādītāju komplektu un pielāgotu bibliotēkas sagatavošanas komplektu.</p> <p>Atjauninātas prasības, kas attiecas uz lietotāju kontiem un parolēm.</p> <p>Pievienota informācija par DRAGEN izvades mapju struktūru.</p> <p>Precizētas instrukcijas par izlietoto reaģentu iztukšošanu no kasetnes.</p> <p>Pievienota papildinformācija par kvalitātes tabulu.</p> <p>Atjauninātas instrukcijas par vadības programmatūras atjauninājumu instalēšanu.</p>

Dokuments #	Datums	Izmaiņu apraksts
1000000109376 v01	2020. gada jūnijs	<p>Pievienotas instrukcijas par cikla atkārtotu ievietošanu rindā.</p> <p>Pievienotas DRAGEN informācijas avotu un licences atjaunināšanas instrukcijas.</p> <p>Pievienotas iekārtas pielāgošanas instrukcijas.</p> <p>Atjaunināti attēli ar jaunajām etiķetēm.</p> <p>Durvis aizstātas ar vizieri visā rokasgrāmatā.</p> <p>Pievienots divu Ethernet pieslēgvietu apraksts.</p>
1000000109376 v00	2020. gada marts	Sākotnējais laidniens.

Saturs

Sistēmas pārskats	1
Papildu resursi	1
Iekārtas aparatūra	3
Integrētā programmatūra	5
Procesu pārvaldība	6
Sekvenēšanas protokola diagramma	8
Kā darbojas sekvenēšana	8
Sistēmas konfigurācija	11
Lietotāja konta prasības	11
BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla un proaktīvā atbalsta konfigurēšana	13
Noklusējuma izvades mapes atrašanās vietas noteikšana	15
Pielāgotu atsauces genomu importēšana	18
Trokšņu bāzlinijas failu importēšana	18
Ciklu režīma konfigurēšana	20
Iekārtas pielāgošana	21
Palīgmateriāli un aprīkojums	23
Sekvenēšanas palīgmateriāli	23
Palīgmateriāli	27
Palīgaprīkojums	28
Protokols	30
Sekvenēšanas apsvērumi	30
Sekvenēšanas izpildes plānošana BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā	31
Maisīnā ievietotās kasetnes un plūsmas elementa atkausēšana	39
Bibliotēku atšķaidīšana	42
Palīgmateriālu ievietošana kasetnē	44
Sekvenēšanas izpildes inicializēšana	46
Sekvenēšanas izvade	54
Reāllaika analīzes pārskats	54
Reāllaika analīzes darbplūsma	56
Sekvenēšanas izvades faili	60
DRAGEN sekundārās analīzes izvades faili	61
DRAGEN sekundārās analīzes izvades mapes struktūra	70
Apkope	73
Vietas atbrīvošana cietajā diskā	73
Programmatūras atjauninājumi	73
DRAGEN darbplūsmas un licences atjauninājumi	75

Gaisa filtra nomaiņa	77
Problēmu novēršana	79
Kļūdas ziņojuma cēloņu novēršana	79
Paļīgmateriālu atkārtota glabāšana	80
Cikla atcelšana	80
Cikla atkārtota ievietošana rindā	81
Iekārtas izslēgšana un ieslēgšana	81
Sistēmas pārbaudes veikšana	82
Rūpnīcas iestatījumu atjaunošana	83
Instalācijas attēla tveršana	83
Tverta attēla atjaunošana	84
Resursi un atsauces	85
Parauga lapas v2 iestatījumi	85
Tumsas cikla sekvenēšana	98
Rādītājs	100
Tehniskā palīdzība	104

Sistēmas pārskats

ILLUMINA® NextSeq™ 1000 sekvenēšanas sistēma un ILLUMINA® NextSeq™ 2000 sekvenēšanas sistēma nodrošina mērķētu pieeju nākamās paaudzes sekvenēšanai (NGS¹). Pateicoties šai uz lietojumprogrammām fokusētajai sistēmai, ILLUMINA sekvenēšanas tehnoloģija tiek apkopota darbvirsmas iekārtā, kas ļauj ietaupīt un nodrošina tālāk uzskaitītās funkcijas.

- **Pieejamība un uzticamība** — NextSeq 1000/2000 sistēmā ir pieejama lokāla DRAGEN analīze un iekārtā veicama denaturācija un atšķaidīšana. Sistēmā ir iebūvēts attēlveidošanas modulis, un šķidrums komponenti ir iebūvēti paļīgmateriālā, kas vienkāršo iekārtas apkopi.
- **Paļīgmateriālu ievietošana ar vienu darbību** — vienreizējās lietošanas kasetne jau ražotnē uzpildīta ar cikla veikšanai nepieciešamajiem reaģentiem. Bibliotēka un plūsmas elements tiek ievietots sagatavotajā kasetnē, kas pēc tam tiek ievietota iekārtā. Iebūvētā identifikācija ļauj veikt precīzu izsekošanu.
- **NextSeq 1000/2000 programmatūra** — iebūvētas programmatūras komplekts, kas kontrolē iekārtas darbības, apstrādā attēlus un ģenerē bāzu nosaukšanas vienumus.
 - **Mākoņa režīms** — plānojiēt izpildi, izmantojot iekārtas izpildes iestatījumus BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā. Atlasītā analīzes darbplūsmā tiek automātiski inicializēta mākonī. Arī izpildes dati un analīzes rezultāti tiek nodrošināti mākonī.
 - **Hibrīdais režīms** — plānojiēt izpildi, izmantojot iekārtas izpildes iestatījumus BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā. Atlasītā analīzes darbplūsmā pēc tam tiek inicializēta, izmantojot iekārtā pieejamo DRAGEN.
 - **Lokālais režīms** — plānojiēt izpildi, izmantojot paraugu lapas v2 faila formātu lokāli. Atlasītā analīzes darbplūsmā tiek inicializēta automātiski, izmantojot iekārtā pieejamo DRAGEN.
 - **Autonomais režīms** — plānojiēt izpildi bez paraugu lapas.

Šajā sadaļā ir sniegts pārskats par sistēmu, tostarp informācija par aparatūru, programmatūru un datu analīzi. Tajā ir apkopoti arī svarīgākie jēdzieni un termini, kas tiek izmantoti visā dokumentā. Detalizētas specifikācijas, datu lapas, lietojumprogrammas un saistītos izstrādājumus skatiet [NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmu izstrādājumu lapā](#) ILLUMINA tīmekļa vietnē.

Papildu resursi

[NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmu atbalsta lapās](#) ILLUMINA tīmekļa vietnē ir sniegti papildu sistēmas resursi. Šajos resursos iekļauta programmatūra, apmācība, saderīgie produkti un tālāk norādītā dokumentācija. Vienmēr pārbaudiet atbalsta lapas, lai skatītu jaunākās versijas.

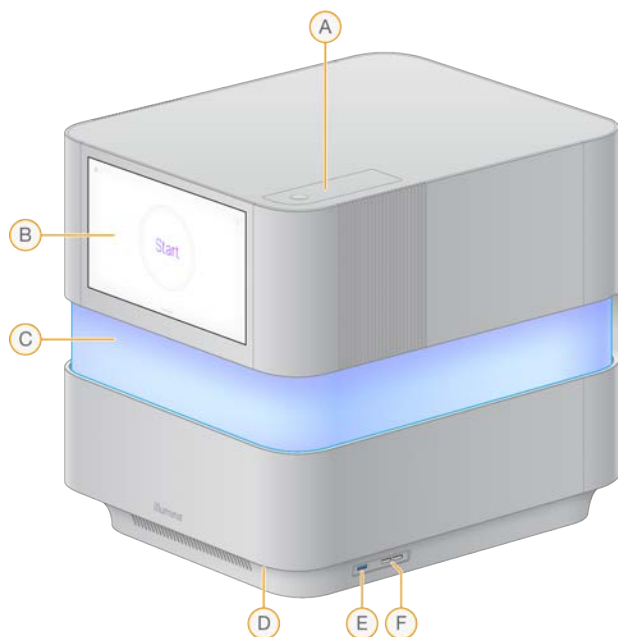
¹nākamās paaudzes sekvencēšana

Resurss	Apraksts
<i>Pielāgotā protokola atlasītājs</i>	Rīks pilna cikla instrukciju ģenerēšanai, lai tās atbilstu jūsu bibliotēkas sagatavošanas metodei, laidiena parametriem un analīzes metodei, ar opcijām detalizācijas pakāpes pielāgošanai.
<i>Sekvenēšanas sistēmas NextSeq 1000 un NextSeq 2000 drošības un atbilstības ceļvedis (dokuments Nr. 1000000111928)</i>	Sniedz informāciju par darbības drošības apsvērumiem, atbilstības paziņojumiem un iekārtu marķējumu.
<i>RFID lasītāja moduļa atbilstības rokasgrāmata (dokuments Nr. 1000000002699)</i>	Sniedz informāciju par iekārtas RFID lasītāju, atbilstības sertifikātiem un drošības apsvērumiem.
<i>NextSeq 1000 un 2000 bibliotēku denaturācijas un atšķaidīšanas rokasgrāmata (dokuments Nr. 1000000139235)</i>	Sniedz norādījumus par sekvenēšanas izpildei sagatavoto bibliotēku manuālu denaturāciju un atšķaidīšanu un neobligātās PhiX kontroles sagatavošanu.
<i>NextSeq 1000 un 2000 pielāgotu praimeru ceļvedis (dokuments Nr. 1000000139569)</i>	Sniedz informāciju par pielāgotu sekvenēšanas praimeru izmantošanu Illumina sekvenēšanas praimeru vietā.
<i>Sekvenēšanas sistēmas NextSeq 2000 uzstādīšanas vietas sagatavošanas ceļvedis (dokuments Nr. 1000000109378)</i>	Nodrošina informāciju par laboratorijas telpu specifikācijām, elektriskajām prasībām un vides un tīklu apsvērumiem.
<i>BaseSpace palīdzība (help.basespace.illumina.com)</i>	Sniedz informāciju par BaseSpace™ sekvenēšanas centrmezgla izmantošanu un pieejamajām analīzes iespējām.
<i>Rādītāju adapteru apkopojuma ceļvedis (dokuments Nr. 1000000041074)</i>	Sniedz apkopšanas vadlīnijas un duālās indeksēšanas stratēģijas.
<i>Illumina adaptera sekvences (dokuments Nr. 1000000002694)</i>	Sniedz adapteru sekvenču sarakstus Illumina bibliotēku sagatavošanas komplektiem.

Iekārtas aparatūra

NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmas ir aprīkotas ar barošanas pogu, monitoru, statusa joslu, palīgmateriālu nodaļījumu un USB pieslēgvietām.

1. attēls Ārējie sistēmas komponenti



- A. **Gaisa filtra nodaļījums** — ļauj piekļūt nomaināmajam gaisa filteram.
- B. **Skārienekrāna monitors** — ļauj veikt iekārtas konfigurāciju un iestatīšanu, izmantojot vadības programmatūras saskarni.
- C. **Statusa josla** — gaismas krāsa mainās atbilstoši darbplūsmas progresijai sistēmā. Zila un violela gaisma norāda uz mijiedarbību (piemēram, pirmsizpildes pārbaudes), un daudzkrāsaina gaisma norāda uz svarīgiem brīžiem un datiem (piemēram, sekvenēšanas pabeigšanu). Sarkana gaisma norāda uz kritiskām kļūdām.
- D. **Barošanas poga** — kontrolē iekārtas jaudu un norāda, vai sistēma ir ieslēgta (deg), izslēgta (nedeg) vai izslēgta, bet ar maiņstrāvas pievadi (mirgo).
- E. **3.0 USB pieslēgvietā** — ārējā portatīvā diska pievienošanai, lai varētu pārsūtīt datus.
- F. **2.0 USB pieslēgvietas** — peles un tastatūras pievienošanai.

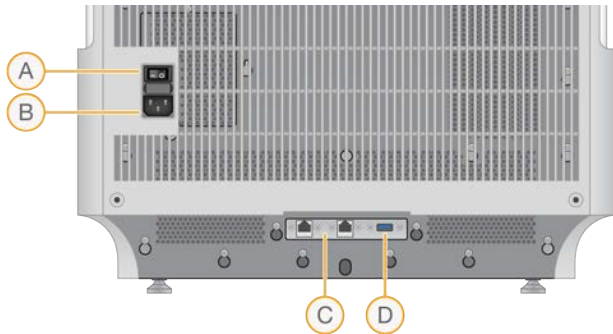
Strāvas padeves un papildu savienojumi

Varat uzmanīgi pārvietot iekārtu, lai piekļūtu barošanas slēdzim, USB pieslēgvietai un citiem palīgsavienojumiem iekārtas aizmugurē.

Iekārtas aizmugurē ir slēdzis un ieeja, kas kontrolē iekārtas jaudu, un divas Ethernet pieslēgvietas papildu Ethernet savienojumam. 3.0 USB pieslēgvietā ļauj pievienot ārējo portatīvo disku, lai varētu pārsūtīt datus (exFAT atbalsts šajā Linux platformā nav pieejams).

NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmas ir aprīkotas ar divām Ethernet pieslēgvietām, kas ļauj paplašināt sistēmas iespējas un elastību. Piemēram, vienu Ethernet pieslēgvietu var izmantot saziņai ar iekšējo tīkla disku, savukārt otru pieslēgvietu var izmantot ārējai saziņai, piemēram, ar BaseSpace sekvenēšanas centrmezglu vai proaktīvo atbalstu.

2. attēls Aizmugures paneļa komponenti

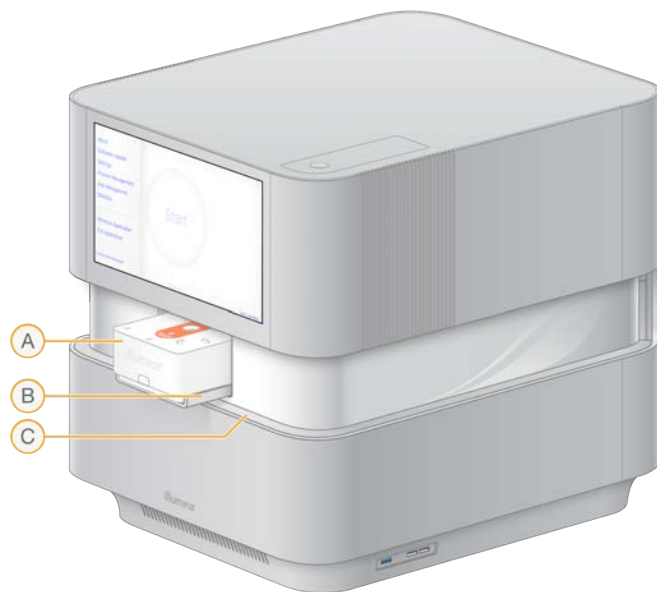


- A. **Jaudas slēdzis** — ar šo slēdzi ieslēdz un izslēdz iekārtu.
- B. **Barošanas ieeja** — strāvas vada savienojums.
- C. **Ethernet pieslēgvietas (2)** — papildu Ethernet kabeļa savienojums.
- D. **3.0 USB pieslēgvietā** — ārējā cietā diska pievienošanai, lai varētu pārsūtīt datus.

Palīgmateriālu nodaļums

Palīgmateriālu nodaļumā atrodas sekvenēšanas izpildes kasetne, kurā ir plūsmas elements un atšķaidītā bibliotēka.

3. attēls Aizpildīts palīgmateriālu nodaļums



- A. **Kasetne** — satur plūsmas elementu, bibliotēku un reaģentus, kā arī uztver izpildes laikā izmantotos reaģentus.
- B. **Paplāte** — tur kasetni sekvenēšanas laikā.
- C. **Vizieris** — atverams, lai nodrošinātu piekļuvi palīgmateriālu nodaļumam.

Integrētā programmatūra

Sistēmas programmatūras komplektā ir ietvertas integrētas lietojumprogrammas, kas veic sekvenēšanas izpildi un analīzi.

- **NextSeq 1000/2000 vadības programmatūra** — vada iekārtas darbības un nodrošina saskarni sistēmas konfigurēšanai, sekvenēšanas izpildes iestatīšanai un izpildes statistikas uzraudzībai sekvenēšanas laikā.
- **Reāllaika analīze (RTA3)** — veic analīzi un bāzu noteikšanu izpildes laikā. Papildinformāciju skatiet sadaļā [Sekvenēšanas izvade 54. lpp.](#)
- **Universal Copy Service** — kopē sekvenēšanas izvades failus no izpildes mapes uz BaseSpace sekvenēšanas centrmezglu (ja attiecināms) un izvades mapi, kur varat tām piekļūt.

Vadības programmatūra ir interaktīva un izpilda automātiskus fona procesus. Reāllaika analīze un Universal Copy Service pakalpojums darbojas tikai fona procesos.

Sistēmas informācija

Lai atvērtu sadaļu About (Par), atlasiet vadības programmatūras izvēlni augšējā kreisajā stūrī. Sadaļā About (Par) ir Illumina kontaktinformācija un šāda sistēmas informācija:

- iekārtas sērijas numurs;

- datora nosaukums;
- sistēmas komplekta versija;
- attēla OS versija;
- kopējais ciklu skaits.

Paziņojumi un brīdinājumi

Paziņojumu ikona atrodas augšējā labajā stūrī. Brīdinājuma vai kļūdas gadījumā labās puses panelis tiek izbīdīts, lai parādītu paziņojumus. Atlasiet ikonu jebkurā laikā, lai skatītu brīdinājumu un kļūdu pašreizējo vai iepriekšējo paziņojumu sarakstu.

- Pievērsiet uzmanību brīdinājumiem, taču nepārtrauciet darbu un neveiciet citas darbības, kā vien apstiprināšanu.
- Lai sāktu vai turpinātu darbību, kļūdas ir jānovērš.

Vadības programmatūras minimizēšana

Minimizējiet vadības programmatūru, lai piekļūtu citām lietojumprogrammām. Piemēram, lai pārlūkotu izvades mapi failu pārlūkā vai atrastu parauga lapu.

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Minimize Application** (Minimizēt lietojumprogrammu). Vadības programmatūra tiek minimizēta.
2. Lai maksimizētu vadības programmatūru, rīkjoslā atlasiet **NextSeq 1000/2000 Control Software** (NextSeq 1000/2000 vadības programmatūra).

Procesu pārvaldība

Ekrānā Process Management (Procesu pārvaldība) ir redzami pagaidu cikli, kas tiek glabāti šeit: `/usr/local/illumina/runs`. Katrs cikls ir identificēts pēc izpildes datuma, nosaukuma un ID. Katram ciklam tiek rādīta arī tāda informācija kā izpildes, sekundārās analīzes, izvades mapes un mākoņa statuss. Atlasiet ciklu, lai skatītu papildinformāciju, tostarp Workflow (Darbplūsma), Average % Q30 (Vidējais % Q30), Total Reads PF (Kopējais PF nolasījumu skaits) un Total Yield (Kopējais apjoms). Lai dzēstu ciklus un atbrīvotu vietu, skatiet sadaļu [Vietas atbrīvošana cietajā diskā 73. lpp.](#) Lai atkārtoti ievietotu rindā iekārtas analīzi, skatiet sadaļu [Cikla atkārtota ievietošana rindā 81. lpp.](#)

Izpildes statuss

Šajā sadaļā ir parādīts sekvenēšanas izpildes statuss.

- **In Progress (Ir procesā)** — sekvenēšanas izpilde ir procesā.
- **Complete (Pabeigts)** — sekvenēšanas izpilde ir pabeigta.
- **Stopped (Apturēts)** — sekvenēšanas izpilde tika apturēta.

- **Errored (Kļūda)** — sekvenēšanas izpilde ir kļūdaina.

Sekundārās analīzes statuss

Šajā sadaļā ir parādīts iekārtā veiktās DRAGEN sekundārās analīzes statuss. Tas tiek attēlots kā N/A (Nav attiecināms), ja analīze tiek veikta BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā.

- **Not Started (Nav sākts)** — DRAGEN analīze vēl nav sākta.
- **In Progress (Ir procesā)** — DRAGEN analīze ir procesā.
- **Stopped (Apturēts)** — DRAGEN analīze tika apturēta.
- **Errored (Kļūda)** — DRAGEN analīze ir kļūdaina.
- **Complete (Pabeigts)** — DRAGEN analīze ir pabeigta.

Izvades mapes statuss

Šajā sadaļā ir parādīts izvades mapē kopēto failu statuss.

- **In Progress (Ir procesā)** — faili tiek kopēti izvades mapē.
- **Complete (Pabeigts)** — faili ir sekmīgi pārkopēti izvades mapē.

Mākoņa statuss (BaseSpace sekvenēšanas centrmezglis)

Šajā sadaļā ir parādīts BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā kopēto failu statuss, izmantojot mākonī.

- **In Progress (Ir procesā)** — vadības programmatūra augšupielādē failus BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā.
- **Complete (Pabeigts)** — faili ir sekmīgi augšupielādēti BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā.

Statusa problēmu novēršana

- Ja notiek cikla izpilde, aizveriet procesu pārvaldības ekrānu, pagaidiet apmēram piecas minūtes un pēc tam atveriet vēlreiz.
- Ja cikla izpilde nenotiek, izslēdziet un ieslēdziet iekārtu un pēc tam vēlreiz atveriet procesu pārvaldības ekrānu. Skatiet sadaļu [Iekārtas izslēgšana un ieslēgšana 81. lpp.](#)

Sekvenēšanas protokola diagramma

Tālāk redzamajā diagrammā ir attēlots sekvenēšanas protokols, izmantojot NextSeq 1000/2000.



Kā darbojas sekvenēšana

Sekvenēšana ar NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmām ietver klasteru ģenerēšanu, sekvenēšanu un analīzi. Sekvenēšanas izpildes laikā katrā darbība tiek veikta automātiski. Kad tā ir pabeigta, atkarībā no sistēmas konfigurācijas papildu analīze tiek veikta ārpus iekārtas.

Klasteru ģenerēšana

Bibliotēka¹ tiek automātiski denaturēta atsevišķās virknēs un turpmāk atšķaidīta iekārtā. Klasteru ģenerēšanas laikā atsevišķas DNS molekulas tiek piesaistītas pie plūsmas elementa virsmas un amplificētas, lai veidotu klasterus². Klasteru ģenerēšana ilgst ~4 stundas.

¹DNS vai RNS paraugs, kam ir pievienoti adapteri sekvencēšanai. Sagatavošanas metodes var atšķirties.

²DNS pavedienu klonālā grupa plūsmas elementā, kas izveido vienu sekvencēšanas lasījumu. Katrs DNS pavediens plūsmas elementā nodrošina veidni, kas tiek pastiprināta, līdz klasteris sastāv no simtiem tūkstošu kopiju. Piemēram, plūsmas elements ar 10 000 klasteru ģenerē 10 000 atsevišķu lasījumu vai 20 000 gala pāru lasījumu.

Sekvenēšana

Klasteri tiek attēloti, izmantojot divu kanālu ķīmisko struktūru — vienu zaļo kanālu un vienu zilo kanālu —, lai kodētu četru nukleotīdu datus. Kad uz plūsmas elementa esošā sektora attēlošana ir pabeigta, tā tiek sākota nākamajā sektorā. Šis process tiek atkārtots katram sekvenēšanas ciklam (~5 minūtes katram ciklam). Pēc attēlu analīzes reāllaika analīzes programmatūra veic bāzes noteikšanu¹, filtrēšanu un kvalitātes vērtēšanu.²

Primārā analīze

Izpildes procesa laikā vadības programmatūra automātiski pārsūta bāzu nosaukšanas failus³ (*.cbcl) uz norādīto izvades mapi datu analīzes veikšanai. Sekvenēšanas izpildes laikā reāllaika analīzes (RTA3) programmatūra veic attēlu analīzi, bāzu nosaukšanu un demultipleksēšanu⁴. Kad sekvenēšana ir pabeigta, tiek sākota sekundārā analīze. Sekundārās datu analīzes metode ir atkarīga no jūsu lietojumprogrammas un sistēmas konfigurācijas.

Sekundārā analīze

BaseSpace sekvenēšanas centrmezgls ir Illumina mākoņa skaitļošanas vide izpildes uzraudzībai, datu analīzei, glabāšanai un sadarbības īstenošanai. Tajā tiek viesotas DRAGEN un BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla lietojumprogrammas, kas atbalsta sekvenēšanas standarta analīzes metodes.

Kad sākotnējā sekvenēšanas analīze ir pabeigta, DRAGEN izpilda sekundāro analīzi, izmantojot vienu no pieejamajiem analīzes informācijas avotiem.

Ja tiek izmantots mākoņa vai hibrīdais režīms, DRAGEN izgūst paraugu lapu, atsauces genomu un izpildes ievades failus no iekārtas izpildes iestatījumiem BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā. Mākoņa režīmā cBCL dati tiek automātiski augšupielādēti BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā, un BaseSpace sekvenēšanas centrmezgls iniciē DRAGEN sekundāro analīzi. Hibrīdajā režīmā iekārtā tiek veikta DRAGEN sekundārā analīze, un izvades failus var saglabāt izvēlētā mapē vai mākonī.

Ja tiek izmantots lokālais režīms, DRAGEN izgūst nodrošināto paraugu lapu, atsauces genomu un izpildes ievades failus no NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmām. Iekārtā tiek veikta DRAGEN sekundārā analīze, un izvades faili tiek saglabāti izvēlētā izvades mapē. Ja ir atlasīta opcija Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana), analīzi var sākt arī no BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla lietojumprogrammām, kad sekvenēšana ir pabeigta.

¹Bāzes (A, C, G vai T) noteikšana katram klasterim sektorā noteikta cikla laikā.

²Aprēķina kvalitātes rādītāju kopu katrai bāzes nosaukšanai un pēc tam izmanto rādītāja vērtību, lai uzmeklētu Q-score rādītāju.

³Satur bāzes nosaukšanu un saistīto kvalitātes rādītāju ikvienam katrai sekvenēšanas cikla klasterim.

⁴Analīzes process, kas atšķir lasījumus katrai bibliotēkai apkopojumā.

Ja tiek izmantots autonomais režīms, iestatiet izpildi bez paraugu lapas. Šī darbplūsma ir ieteicama pielāgotām analīzes darbplūsmām, kas tiek sāktas, izmantojot cBCL datus.

- Papildinformāciju par BaseSpace sekvenēšanas centrmezglu skatiet [BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla tiešsaistes palīdzībā](#).
- Papildinformāciju par DRAGEN skatiet [DRAGEN Bio-IT platformas atbalsta lapā](#).
- Pārskatu par visām lietojumprogrammām skatiet sadaļā [BaseSpace lietojumprogrammas](#).

Sistēmas konfigurācija

Šajā sadaļā ir sniegti norādījumi par sistēmas iestatīšanu, tostarp programmatūras iestatījumu apraksti.

Šajos norādījumos galvenokārt ir aprakstīta vadības programmatūra, kā arī informācija par tīkla un operētājsistēmas konfigurēšanu.

i | Izmantojot iekārtā Google Chrome, tiek parādīta uzvedne atbloķēt pieteikšanās atslēgu. Šo uzvedni var droši ignorēt un atcelt.

Lietotāja konta prasības

Operētājsistēmā Linux ir trīs konti:

- root (galvenais administrators);
- ilmnadmin (administrators);
- ilmnuser (lietotājs).

Administrators konts ir paredzēts tikai sistēmas atjauninājumu instalēšanai, piemēram, NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras atjaunināšanai, vai IT darbiniekiem, lai montētu pastāvīgu tīkla disku.

Visas pārējās darbības, tostarp sekvenēšanu, veiciet lietotāja kontā.

Paroles prasības

Pēc iekārtas uzstādīšanas vietējais servisa inženieris inicializē paroles nomaiņu visos trīs kontos. Atjauniniet katru paroli ik pēc 180 dienām, kad tiek parādīts pieprasījums.

1. tabula Paroles noklusējuma politikas

Politika	Iestatījums
Paroles vēstures ieviešana	Atcerēties piecas paroles
Bloķēšanas sliekšnis	Desmit neveiksmīgi pieteikšanās mēģinājumi
Minimālais paroles garums	Desmit rakstzīmes
Minimālā rakstzīmju dažādība	Trīs no katra veida: cipars, lielais burts, mazais burts un simbols

Politika	Iestatījums
Maksimālais rakstzīmes atkārtotības reižu skaits	Trīs rakstzīmes
Parolei jāatbilst sarežģītības prasībām	Atspējots
Paroju saglabāšana, izmantojot atgriezenisko šifrēšanu	Atspējots

Jauna lietotāja pievienošana

1. Piesakieties kontā ilmnadmin.
2. Atlasiet barošanas pogu un pēc tam atveriet ilmnadmin nolaižamo izvēlni.
3. Atlasiet **Account Settings** (Konta iestatījumi).
4. Atlasiet **Unlock** (Atbloķēt) un pēc tam ievadiet ilmnadmin paroli.
5. Atlasiet **Add User** (Pievienot lietotāju).
6. Atlasiet standarta tipa kontu un pēc tam ievadiet jaunu lietotājvārdu.
7. Atlasiet **Set password now** (Iestatīt paroli tūlīt) un pēc tam ievadiet paroli.
8. Atlasiet **Add** (Pievienot).
Jaunais lietotājs tiek pievienots lietotāju sarakstam.
9. Piešķiriet lietotājam piekļuvi NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrai, kā norādīts tālāk.
 - a. Atveriet termināli.
 - b. Ievadiet šo rindiņu:

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <jaunais lietotājvārds>
```
 - c. Ja tiek parādīta uzvedne, ievadiet ilmnadmin paroli.
10. Lai pārbaudītu, vai lietotāja atļaujas ir iestatītas sekmīgi, veiciet tālāk norādītās darbības.
 - a. Piesakieties jaunajā lietotāja kontā.
 - b. Pārejiet uz NextSeq 1000/2000 vadības programmatūru.
 - c. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
 - d. Sadaļā Default Output Folder (Noklusējuma izvades mape) pārliecinieties, ka varat atlasīt un saglabāt izvades mapes ceļu.
Ja varat atlasīt un saglabāt izvades mapes ceļu bez kļūdām, atļaujas ir iestatītas sekmīgi.

Paroles atiestatīšana

Šajā sadaļā ir aprakstīts, kā atiestatīt ilmnuser, ilmnadmin vai root paroli. Paroles atkopšana nav pieejama. Atiestatot paroli, nevar apiet konta bloķēšanu, ja mēģināts ievadīt nepareizu paroli pārāk daudz reižu. Jāuzgaida 10 minūtes, pirms varat atiestatīt paroli vai mēģināt pieteikties.

Konta ilmnuser paroles atiestatīšana

Konta ilmnuser paroli var atiestatīt, ja zināt ilmnadmin vai root paroli.

1. Piesakieties kontā ilmnadmin.
2. Atveriet termināli.
3. Ievadiet `sudo passwd ilmnuser`.
4. Parādoties uzvednei, ievadiet ilmnadmin paroli.
5. Parādoties uzvednei, ievadiet ilmnuser paroli.
6. Parādoties uzvednei, atkārtoti ierakstiet ilmnuser paroli, lai apstiprinātu jauno paroli.

Konta ilmnadmin paroles atiestatīšana

Konta ilmnadmin paroli var atiestatīt, ja zināt root paroli.

1. Piesakieties kontā root.
2. Atveriet termināli.
3. Ievadiet `passwd ilmnadmin`, lai mainītu ilmadmin paroli, vai ievadiet `passwd ilmnuser`, lai mainītu ilmnuser paroli.
4. Parādoties uzvednei, ievadiet jauno paroli.
5. Parādoties uzvednei, atkārtoti ierakstiet paroli, lai apstiprinātu jauno paroli.

Konta root paroles atiestatīšana

Lai atiestatītu root paroli, izmantojiet vienu no tālāk norādītajām opcijām.

- Ja atceraties paroli no pēdējā OS attēla tveršanas, atjaunojiet saglabāto attēlu.
- Ja neatceraties paroli, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.

BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla un proaktīvā atbalsta konfigurēšana

BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla un proaktīvā atbalsta konfigurēšanai jūsu sistēmā izmantojiet tālāk sniegtās instrukcijas. Informāciju par BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla konta iestatīšanu skatiet [BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla tiešsaistes palīdzībā](#).

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
2. BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla un proaktīvā atbalsta iestatīšanai atlasiet kādu no tālāk uzskaitītajām opcijām.

Opcija	Apraksts un prasības
Proactive Support Only (Tikai proaktīvais atbalsts)*	Nosūtiet iekārtas veiktspējas datus uzņēmumam Illumina, lai problēmas tiktu novērstas ātrāk. Nepieciešams interneta savienojums.
Proactive and Run Monitoring (Proaktīvais atbalsts un izpildes uzraudzība)	Nosūtiet InterOp un žurnālfailus uz BaseSpace sekvenēšanas centrmezglu, lai veiktu attālu izpildes uzraudzību. Šī ir noklusējuma opcija. Nepieciešams BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla konts un interneta pieslēgums.
Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana)	Nosūtiet InterOp failus, žurnālfailus un izpildes datus uz BaseSpace sekvenēšanas centrmezglu, lai veiktu attālu uzraudzību un analīzi. Nepieciešams BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla konts, interneta pieslēgums un paraugu lapa.
None (Neviens)	Atvienojiet izpildi no BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla kontiem un nesūtiet iekārtas veiktspējas datus, lai saņemtu Illumina proaktīvo atbalstu.

* Atkarībā no vadības programmatūras versijas šī iestatījuma nosaukums programmatūras saskarnē var atšķirties no šajā rokasgrāmatā minētā nosaukuma.

Ja ir atlasīta jebkura opcija, izņemot None (Neviens), ir iespējots proaktīvais atbalsts. Tas ir bezmaksas pakalpojums, kas ļauj skatīt veiktspējas datus MyIllumina klientu informācijas panelī un ļauj Illumina apkopes komandām novērst problēmas ātrāk.



Proaktīvais atbalsts un izpildes uzraudzība ir ieslēgti pēc noklusējuma. Lai atteiktos no šī pakalpojuma, atlasiet **None** (Neviens).

- Ja 2. darbības laikā atlasījāt None (Neviens), atlasiet **Save** (Saglabāt), lai pabeigtu. Pretējā gadījumā turpiniet ar 6. darbību.
- Viesošanas atrašanās vietu sarakstā atlasiet BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla serveri, kurā tiek augšupielādēti dati.
Pārliecinieties, ka atlasītā viesošanas atrašanās vieta atrodas jūsu reģionā vai tam vistuvāk.
- Ja jums ir Enterprise abonements, ievadiet domēna nosaukumu (URL), kas tiek izmantots jūsu BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla kontam.
Piemēram: <https://jusulaboratorija.basespace.illumina.com>.
- Atlasiet **Save** (Saglabāt).

Noklusējuma izvades mapes atrašanās vietas noteikšana

Izpildiet šajā sadaļā sniegtos norādījumus, lai atlasītu noklusējuma izvades mapes atrašanās vietu. Izvades mapes atrašanās vietu var mainīt katrai izpildei izpildes iestatīšanas laikā. Programmatūra saglabā cBCL failus¹ un citus datus izvades mapē.

Izvades mape ir obligāta, ja vien BaseSpace sekvenēšanas centrmezglam nav konfigurēta opcija Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana). Kā noklusējuma mapi izmantojiet tikai ārējo vai tīkla disku. Izmantojot izvades mapi iekārtā, tiek negatīvi ietekmēta sekvenēšanas izpilde.

Ārējā diska izvades mapes norādīšana

Izpildiet tālāk sniegtos norādījumus, lai atlasītu ārēju portatīvo disku kā noklusējuma izvades mapi. Ieteicams izmantot autonomu disku ar NFTS vai GPT/EXTA formatējumu.

1. Pieslēdziet ārējo portatīvo disku, izmantojot 3.0 USB pieslēgvietu iekārtas sānā vai aizmugurē. Pārliecinieties, ka ārējā portatīvajā diskā ir rakstīšanas atļaujas. Ja tas ir iestatīts kā tikai lasāms, vadības programmatūra nevarēs saglabāt tajā datus.
2. Izveidojiet jaunu mapi ārējā portatīvajā diskā. Šī mape tiks iestatīta kā noklusējuma izvades mapes atrašanās vieta. NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrai ir nepieciešami vismaz divi ligzdotu mapju līmeņi, lai atpazīstu atrašanās vietu kā ārējo portatīvo disku.
3. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
4. Noklusējuma izvades mapē atlasiet esošo mapes ceļu un pārejiet uz jauno mapi ārējā portatīvajā diskā.
5. **[Papildu]** Ja sadaļā Run mode (Ciklu režīms) atlasījāt **Online Run Setup** (Tiešsaistes ciklu iestatījumi), atlasiet kādu opciju nolaižamajā izvēlnē Hosting Location (Viesošanas atrašanās vietas).
6. Atlasiet **Save** (Saglabāt).

Tīkla diska noklusējuma izvades mapes norādīšana

Izmantojiet tālāk sniegtos norādījumus, lai montētu pastāvīgu tīkla disku un norādītu noklusējuma izvades mapes atrašanās vietu. Servera ziņojumu bloks (SMB)/interneta kopējās failu sistēmas (CIFS) un tīkla failu sistēma (NFS) ir vienīgās NextSeq 1000/2000 atbalstītās pastāvīgās tīkla diska montēšanas metodes.

¹Satur bāzes nosaukšanu un saistīto kvalitātes rādītāju ikvienam katra sekvenēšanas cikla klasterim.

SMB/CIFS montēšanas norādījumi

1. Ja NextSeq 1000/2000 vadības programmatūra ir atvērta, atlasiet **Minimize Application** (Minimizēt lietojumprogrammu).
2. Piesakieties kontā ilmnadmin.
3. Atlasiet **Applications** (Lietojumprogrammas).
4. Sadaļā Favorites (Izlase) atlasiet **Terminal** (Terminālis).
5. Ievadiet `sudo touch /root/.smbcreds` un pēc tam nospiediet **Enter**.
6. Parādoties uzvednei, ievadiet ilmnadmin paroli.
Konta ilmnadmin parole ir nepieciešama katru reizi, kad izmantojat `sudo` komandu.
7. Ievadiet `sudo gedit /root/.smbcreds` un pēc tam nospiediet **Enter**, lai atvērtu teksta failu ar nosaukumu `smbcreds`.
8. Kad teksta fails `.smbcreds` ir atvērts, ievadiet savus tīkla akreditācijas datus šādā formātā:

```
username=<lietotājvārds>
password=<parole>
domain=<domēna_nosaukums>
```

Iekavas lietotājvārda, paroles un domēna akreditācijas datiem nav nepieciešamas. Domēna akreditācijas dati ir nepieciešami tikai tad, ja attālais konts ir domēna daļa.
9. Atlasiet **Save** (Saglabāt) un aizveriet failu.
10. Identificējiet sava SMB/CIFS servera nosaukumu un koplietošanas nosaukumu.
Servera nosaukums un koplietošanas nosaukums nedrīkst saturēt atstarpes, piemēram:
servera nosaukums: 192.168.500.100 vai Myserver-myinstitute-03
koplietošanas nosaukums: /share1
11. Terminālī ievadiet `sudo chmod 400 /root/.smbcreds` un pēc tam nospiediet **Enter**, lai piešķirtu piekļuvi `.smbcreds` teksta failam.
12. Ievadiet `sudo mkdir /mnt/<lokālais_nosaukums>`.
<Lokālais_nosaukums> ir jaunā direktorijs nosaukums jūsu tīkla diskā, un tas drīkst saturēt atstarpes. Šis direktorijs būs redzams iekārtā.
13. Nospiediet **Enter**.
14. Ievadiet `sudo gedit /etc/fstab` un pēc tam nospiediet **Enter**.
15. Kad tiek atvērts `fstab` fails, ievadiet tālāk norādīto tekstu faila beigās un pēc tam nospiediet **Enter**.

```
//<Server name>/<Share name> /mnt/<local name> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilnadmin,gid=ilnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```
16. Atlasiet **Save** (Saglabāt) un aizveriet failu.
17. Terminālī ievadiet `sudo mount -a -vvv` un pēc tam nospiediet **Enter**.
Tagad tīkla disks ir montēts kā `/mnt/<lokālais_nosaukums>`.

18. Lai pārbaudītu, vai montēšana bija sekmīga, ievadiet `<df | grep <lokālais nosaukums>` un pēc tam nospiediet **Enter**.
Vajadzētu parādīties failu koplietošanas nosaukumam.
19. Ievadiet `sudo mkdir /mnt/<lokālais nosaukums>/<izvades direktorijs>`, lai izveidotu apakšmapi lokālajā direktorijā. `<Izvades direktorijs>` norāda noklusējuma izvades mapes atrašanās vietu.
NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrai ir nepieciešami vismaz divi ligzdotu mapju līmeņi, lai atpazīstu atrašanās vietu kā montēto tīkla disku.
20. Izslēdziet un ieslēdziet iekārtu. Skatiet sadaļu [Iekārtas izslēgšana un ieslēgšana 81. lpp.](#)
21. Iestatiet pastāvīgi montēto tīkla disku kā noklusējuma izvades mapi. Skatiet sadaļu [Pastāvīgi montētā tīkla diska kā noklusējuma izvades mapes iestatīšana 18. lpp.](#)

NFS montēšanas instrukcijas

1. Ja NextSeq 1000/2000 vadības programmatūra ir atvērta, atlasiet **Minimize Application** (Minimizēt lietojumprogrammu).
2. Piesakieties kontā `ilmnadmin`.
3. Identificējiet sava NFS servera nosaukumu.
Servera nosaukums nedrīkst saturēt atstarpes, piemēram:
servera nosaukums: `192.168.500.100` vai `Myserver-myinstitute-03`
4. Atlasiet **Applications** (Lietojumprogrammas).
5. Sadaļā Favorites (Izlase) atlasiet **Terminal** (Terminālis).
6. Ievadiet `sudo mkdir /mnt/<lokālais nosaukums>` un pēc tam nospiediet **Enter**.
`<Lokālais nosaukums>` ir jaunā direktorija nosaukums jūsu tīkla diskā.
7. Ievadiet `sudo gedit /etc/fstab` un pēc tam nospiediet **Enter**.
8. Kad tiek atvērts `fstab` fails, ievadiet tālāk norādīto tekstu un pēc tam nospiediet **Enter**.
Servera nosaukums: `/share //mnt/<lokālais nosaukums> nfs x-systemd.automount,defaults 0 0`
9. Atlasiet **Save** (Saglabāt) un aizveriet failu.
10. Terminālī ievadiet `sudo mount -a -vvv` un pēc tam nospiediet **Enter**.
Tīkla disks tagad ir montēts direktorijā `/mnt/directory` mapē `<lokālais nosaukums>`.
11. Izveidojiet jaunu `<apakšmapi>` mapē `<lokālais nosaukums>`. Apakšmape norāda noklusējuma izvades mapes atrašanās vietu.
NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrai ir nepieciešami vismaz divi ligzdotu mapju līmeņi, lai atpazīstu atrašanās vietu kā montēto tīkla disku.
12. Izslēdziet un ieslēdziet iekārtu. Skatiet sadaļu [Iekārtas izslēgšana un ieslēgšana 81. lpp.](#)
13. Iestatiet pastāvīgi montēto tīkla disku kā noklusējuma izvades mapi. Skatiet sadaļu [Pastāvīgi montētā tīkla diska kā noklusējuma izvades mapes iestatīšana 18. lpp.](#)

Pastāvīgi montētā tīkla diska kā noklusējuma izvades mapes iestatīšana

1. Piesakieties kontā ilmnuser.
2. NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
3. Noklusējuma izvades mapē atlasiet pastāvīgā tīkla diska montējumu, kas atrodas šeit:
`/mnt/<lokālais nosaukums>/<izvades direktorijs>`.
4. **[Papildu]** Ja sadaļā Run mode (Ciklu režīms) atlasījāt **Online Run Setup** (Tiešsaistes ciklu iestatījumi), atlasiet kādu opciju nolaižamajā izvēlnē Hosting Location (Viesošanas atrašanās vietas).
5. Atlasiet **Save** (Saglabāt).

Pielāgotu atsauces genomu importēšana

Jaunus pielāgotos atsauces genomus var importēt, izmantojot tikai administratora kontu. Visu saderīgo atsauces genomu sarakstu skatiet NextSeq 1000/2000 izstrādājumu saderības lapā.

1. Izveidojiet atsauces genomu, izmantojot Reference Builder for Illumina Instruments BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla lietojumprogrammu. Papildinformāciju skatiet *Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 lietojumprogrammas tiešsaistes palīdzībā*.
2. Atlasiet vadības programmatūru un pēc tam atlasiet **Process Management** (Procesu pārvaldība).
3. Pārliecinieties, ka iekārtā nenotiek sekvenēšanas izpildes vai sekundārās analīzes.
4. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Minimize Application** (Minimizēt lietojumprogrammu).
5. Piesakieties kontā ilmnadmin.
6. Atlasiet vadības programmatūru un pēc tam atlasiet **DRAGEN**.
7. Sadaļā Genome (Genoms) atlasiet **View Installed Genomes** (Skatīt instalētos genomus), lai skatītu visus pašlaik instalētos Illumina un pielāgotos genomus.
8. Aizveriet modālu.
9. Atlasiet **Choose** (Izvēlēties) sadaļā Import New Reference Genomes (Importēt jaunus atsauces genomus), pārejiet uz atsauces genoma failu (*.tar.gz) portatīvajā vai montētajā tīkla diskā un pēc tam atlasiet **Open** (Atvērt).
10. Atlasiet **Import** (Importēt).

Trokšņu bāzlinijas failu importēšana

Ja izmantojat DRAGEN Enrichment darbplūsmu somatiskajā režīmā, varat izmantot trokšņu bāzlinijas failu, lai izfiltrētu sekvenēšanas vai sistemātiskos trokšņus. Varat lejupielādēt standarta pielāgotus trokšņu failus no [Illumina atbalsta vietnes](#) vai izveidot pielāgotu trokšņu bāzlinijas failu.

Pielāgota trokšņu bāzlīnijas faila ģenerēšana

Ja izmantojat somatisko režīmu, varat ģenerēt pielāgotu trokšņu bāzlīnijas failu. Trokšņu bāzlīnijas fails tiek veidots, izmantojot normālus paraugus, kas nesakrīt ar subjektu, no kā paraugi ir ņemti. Ieteicamais normālo paraugu skaits ir 50.

Lai ģenerētu pielāgotu trokšņu bāzlīnijas failu, izmantojiet vienu no tālāk norādītajām metodēm.

- Izmantojiet DRAGEN Bio-IT platformas serveri. Norādījumus skatiet *DRAGEN Bio-IT platformas tiešsaistes palīdzībā*.
- Izmantojiet DRAGEN Baseline Builder lietojumprogrammu BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā. Izmantojiet BCL Convert informācijas avotu BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla iekārtas izpildes iestatījumos, lai ģenerētu FASTQ failus. Kad sekvenēšanas izpilde ir pabeigta un ir pieejami 50 paraugi, ievadiet FASTQ failus DRAGEN Baseline Builder lietojumprogrammā.

Bāzlīnijas failu importēšana, izmantojot lietotāja saskarni

Pēc bāzlīnijas faila importēšanas varat iestatīt sekvenēšanas izpildi, izmantojot DRAGEN Enrichment darbplūsmu somatiskajā režīmā.

1. Lejupielādējiet standarta bāzlīnijas failu no [Illumina atbalsta vietnes](#) vai lejupielādējiet pielāgotu bāzlīnijas failu no DRAGEN servera vai DRAGEN Baseline Builder lietojumprogrammas.
2. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Minimize Application** (Minimizēt lietojumprogrammu).
3. Piesakieties kontā ilmnadmin.
4. Atlasiet **Applications** (Lietojumprogrammas) un pēc tam atlasiet **Favorites** (Izlase).
5. Atlasiet **+Other Locations** (+Citas atrašanās vietas) un pēc tam atlasiet **Computer** (Dators).
6. Veiciet dubultklikšķi uz **usr** un pēc tam uz **local**.
7. Veiciet dubultklikšķi uz **illumina** un pēc tam uz **aux_files**.
8. Ievadiet trokšņu bāzlīnijas failu mapē aux_files.

Bāzlīnijas failu importēšana, izmantojot termināli

Pēc bāzlīnijas faila importēšanas varat iestatīt sekvenēšanas izpildi, izmantojot DRAGEN Enrichment darbplūsmu somatiskajā režīmā.

1. Lejupielādējiet standarta bāzlīnijas failu no [Illumina atbalsta vietnes](#) vai lejupielādējiet pielāgotu bāzlīnijas failu no DRAGEN servera vai DRAGEN Baseline Builder lietojumprogrammas.
2. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Minimize Application** (Minimizēt lietojumprogrammu).
3. Piesakieties kontā ilmnadmin.
4. Atlasiet **Applications** (Lietojumprogrammas).
5. Sadaļā Favorites (Izlase) atlasiet **Terminal** (Terminālis).
6. Ievadiet šo komandu:

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

Ciklu režīma konfigurēšana

Ciklu režīms attiecas uz visiem cikliem un nosaka, kur ievadīt cikla parametrus un kā analizēt datus.

Mākoņa vai hibrīdais režīms

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
2. BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla pakalpojumu un proaktīvā atbalsta sadaļā atlasiet **Online Run Setup** (Tiešsaistes ciklu iestatījumi).
3. Atbilstoši konfigurējiet papildu iestatījumus, atlasot:
 - a. **Proactive and Run Monitoring** (Proaktīvais atbalsts un izpildes uzraudzība) vai **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana);
 - b. nolaižamo izvēlni iestatījumam **Hosting Location** (Viesošanas atrašanās vieta);
 - c. **[Papildu]** ievadiet **Private Domain Name** (Privātā domēna nosaukums).
4. Atlasiet **Save** (Saglabāt).

Lokālais vai autonomais režīms

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
2. BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla pakalpojumu un proaktīvā atbalsta sadaļā atlasiet **Local Run Setup** (Lokālie izpildes iestatījumi).
3. Atbilstoši konfigurējiet papildu iestatījumus, atlasot:
 - a. **Proactive Support Only** (Tikai proaktīvais atbalsts), **Proactive and Run Monitoring** (Proaktīvais atbalsts un izpildes uzraudzība), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana) vai **None** (Neviens);



BaseSpace sekvenēšanas centrmezgls atļauj atkārtotu ievietošanu rindā tikai tad, ja ir atlasīta opcija **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana). Tādējādi nederīgas parauga lapas gadījumā varat veikt labojumus parauga lapā un atkārtoti ievietot rindā demultipleksēšanas analīzi. Informāciju par atkārtotu ievietošanu rindā iekārtā skatiet sadaļā [Cikla atkārtota ievietošana rindā 81. lpp.](#)

- b. nolaižamo izvēlni iestatījumam **Hosting Location** (Viesošanas atrašanās vieta);
 - c. **[Papildu]** ievadiet **Private Domain Name** (Privātā domēna nosaukums).
4. Atlasiet **Save** (Saglabāt).

Parauga lapu apsvērumi lokālajam vai autonomajam režīmam

Analīžu veikšanai ar DRAGEN ir jāizmanto parauga lapas v2 failu formāts. Parauga lapas v2 failu formāts ir saderīgs arī ar tām BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla lietojumprogrammām, kas nav iespējotas DRAGEN lietošanai. Informāciju par parauga lapas izveidošanu v2 failu formātā skatiet sadaļā [Parauga lapas v2 iestatījumi 85. lpp.](#)

Iekārtas pielāgošana

Šajā sadaļā ir ietverta informācija par pieejamo pielāgošanas iestatījumu konfigurēšanu. Informāciju par noklusējuma izvades mapes iestatīšanu skatiet sadaļā [Noklusējuma izvades mapes atrašanās vietas noteikšana 15. lpp.](#)

Nosaukuma piešķiršana iekārtai

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
2. Izvēlieties iekārtas segvārdu un ievadiet vēlamo iekārtas nosaukumu.
Nosaukums parādās katra ekrāna augšdaļā.
3. Atlasiet **Save** (Saglabāt).

Denaturācijas un atšķaidīšanas preferenču iestatīšana

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
2. Izvēlieties, vai automātiski denaturēt un atšķaidīt bibliotēkas iekārtā. Pēc noklusējuma iestatījumam tiek izvēlēta iepriekšējā cikla laikā atlasītā opcija.
 - Lai denaturētu un atšķaidītu bibliotēkas automātiski iekārtā, atlasiet izvēles rūtiņu **Denature and Dilute On Board** (Denaturēt un atšķaidīt iekārtā).
 - Lai manuāli denaturētu un atšķaidītu bibliotēkas, noņemiet atlasi no izvēles rūtiņas **Denature Dilute On Board** (Denaturēt un atšķaidīt iekārtā).
Manuālas bibliotēku denaturēšanas un atšķaidīšanas norādījumus skatiet *NextSeq 1000 un 2000 bibliotēku denaturācijas un atšķaidīšanas rokasgrāmātā (dokuments Nr. 1000000139235)*.

Automātiskās reaģentu iztīrīšanas preferences iestatīšana

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
2. Izvēlieties, vai sistēma automātiski iztīra neizmantotos reaģentus izlietoto reaģentu nodalījumā pēc katra cikla, lai optimizētu reaģentu atkritumu utilizāciju pēc ciklu pabeigšanas.
 - Lai iztīrītu automātiski, atlasiet izvēles rūtiņu **Purge Reagent Cartridge** (Iztīrīt reaģentu kasetni).
 - Lai izlaistu automātisko tīrīšanu, noņemiet atlasi no izvēles rūtiņas **Purge Reagent Cartridge** (Iztīrīt reaģentu kasetni) (šis ir noklusējuma iestatījums).

Neizmantoto reaģentu iztīrīšana var paildzināt darbplūsmu par 2 stundām.

3. Atlasiet **Save** (Saglabāt).

Programmatūras atjauninājumu konfigurēšana

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
2. Izvēlieties, vai sistēmai automātiski jāmeklē programmatūras atjauninājumi.
 - Lai meklētu automātiski, atlasiet izvēles rūtiņu **Autocheck for software updates** (Automātiski pārbaudīt, vai nav programmatūras atjauninājumu).
 - Lai meklētu manuāli, noņemiet atlati no izvēles rūtiņas **Autocheck for software updates** (Automātiski pārbaudīt, vai nav programmatūras atjauninājumu).

Automātiskai programmatūras atjauninājumu meklēšanai ir nepieciešams interneta savienojums.

Papildinformāciju par programmatūras atjauninājumu instalēšanu skatiet sadaļā [Programmatūras atjauninājumi 73. lpp.](#)

3. Atlasiet **Save** (Saglabāt).

LCD ekrāna spilgtuma mainīšana

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
2. Pārvietojiet LCD ekrāna spilgtuma slīdni līdz vēlamajai procentuālajai vērtībai.
3. Atlasiet **Save** (Saglabāt).

Starpniekservera iestatīšana

Starpniekservera atbalsts ir pieejams tikai NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrai v1.3.

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Settings** (Iestatījumi).
2. Atlasiet pašreizējos starpniekservera iestatījumus, lai atvērtu ekrānu Proxy Settings (Starpniekservera iestatījumi).
3. Atlasiet izvēles rūtiņu **Enable Proxy** (Iespējot starpniekserveri) un pēc tam ievadiet servera IP porta adresi.
4. **[Papildu]** Ja starpniekserverim ir nepieciešama autentifikācija, atlasiet izvēles rūtiņu **Requires Username and Password** (Nepieciešams lietotājvārds un parole) un pēc tam ievadiet lietotājvārdu un paroli.
5. Atlasiet **Save** (Saglabāt), lai saglabātu un apstiprinātu starpniekservera informāciju.
6. Atlasiet vienu no tālāk norādītajām opcijām.
 - Atlasiet **Yes, I'm Finished** (Jā, gatavs), lai restartētu sistēmu un lietotu jaunus starpniekservera iestatījumus.
 - Atlasiet **No, Take Me Back** (Nē, atgriezties), lai atgrieztos iestatījumu ekrānā. Jaunie starpniekservera iestatījumi tiek saglabāti, bet netiek lietoti, kamēr sistēma nav restartēta.

Paļīgmateriāli un aprīkojums

Šajā sarakstā ir uzskaitīti visi komponenti, kas ietilpst reaģentu komplektā ar glabāšanas nosacījumiem. Šeit arī norādīts, kādi paļīgmateriāli un aprīkojums ir jāiegādājas, lai varētu izpildīt protokolu un veikt apkopes un problēmu novēršanas procedūras.


Sekvenēšanas paļīgmateriāli

Lai varētu veikt sekvenēšanu NextSeq 1000/2000 sistēmā, ir nepieciešams viens vienreizējas lietošanas Illumina NextSeq 1000/2000 P2 reaģentu komplekts vai viens vienreizējas lietošanas Illumina NextSeq 1000/2000 P3 reaģentu komplekts. NextSeq 1000/2000 P2 reaģentu komplekts ir pieejams trīs izmēros (100 cikli, 200 cikli, 300 cikli), un NextSeq 1000/2000 P3 reaģentu komplekts ir pieejams četros izmēros (50 cikli, 100 cikli, 200 cikli, 300 cikli).

NextSeq 1000 sekvenēšanas sistēma ir saderīga tikai ar Illumina NextSeq 1000/2000 P2 reaģentu komplektu.

Reaģentu komplektā ir kasetne un plūsmas elements sekvenēšanai. Saņemot NextSeq 1000/2000 P2 reaģentus vai Illumina NextSeq 1000/2000 P3 reaģentu komplektu, ievērojiet tālāk minētos nosacījumus.

- Nekavējoties noglabājiet komponentus norādītajā temperatūrā, lai nodrošinātu pareizu veiktspēju.
- Neatveriet nevienu sudraboto folijas maisiņu, kamēr tas nav norādīts.
- Glabājiet kasetnes to iepakojumos, lai nepieļautu folijas maisiņa saplēšanu vai saduršanu.
- Glabājiet kasetnes ar bultiņām uz augšu.

 Ja kasetnes etiķete nav vērsta uz augšu, tiks negatīvi ietekmēti sekvenēšanas dati.

2. tabula Komplekta komponenti

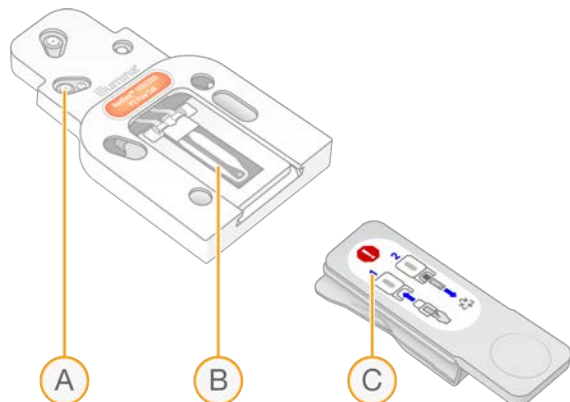
Paļīgmateriāls	Daudzums	Uzglabāšanas temperatūra	Izmēri
Kasetne	1	No -25 °C līdz -15 °C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm (11,5 collas × 7 collas × 5 collas)
Plūsmas elements	1	No 2 °C līdz 8 °C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm (8,5 collas × 5 collas × 0,75 collas)
RSB ar Tween 20	1	No -25 °C līdz -15 °C	4 cm × 6,6 cm × 5 cm (1,6 collas × 2,6 collas × 2 collas)

* Piegādāts istabas temperatūrā.

Abiem paļigmateriāliem ir identifikatori izsekošanai un saderības nodrošināšanai. Kasetne un plūsmas elements izmanto RFID¹.

Plūsmas elements

Plūsmas elements ir rakstains vienas joslas plūsmas elements. Plastmasas kasetne aptver plūsmas elementu uz stikla bāzes. Plūsmas elementu sedz pelēks, izvirzīts izcilnis, kas palīdz nodrošināt drošu lietošanu.



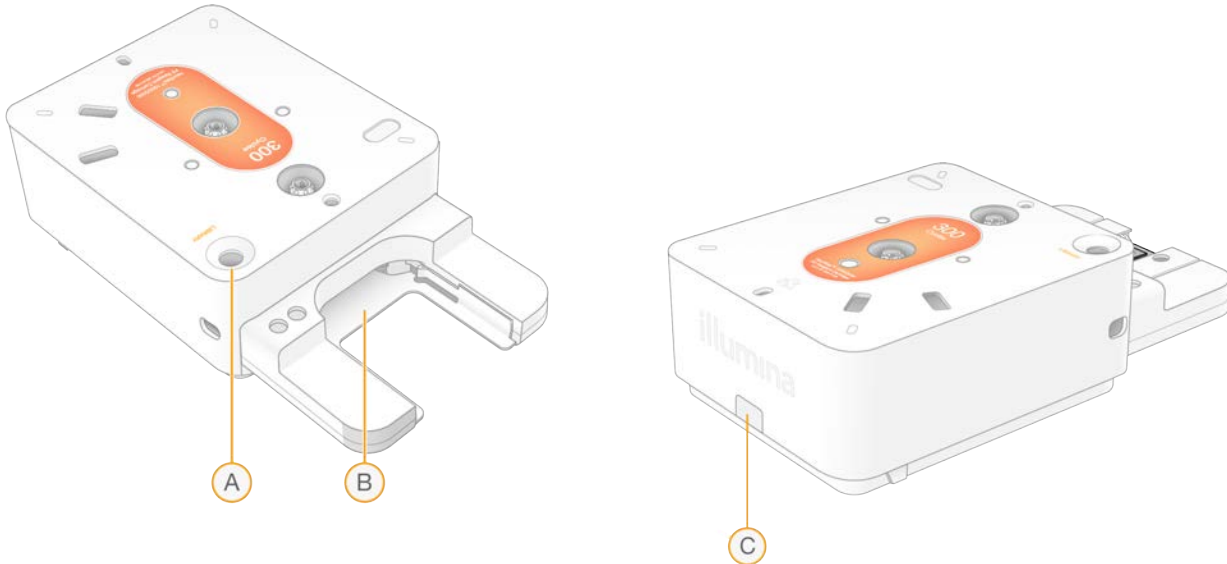
- A. Plastmasas kasetne
- B. Plūsmas elements
- C. Pelēkais izcilnis

Plūsmas elementa iekšējo virsmu sedz miljoniem nanoviļņu. Nanoviļņos tiek ģenerēti klasteri, no kuriem tiek veikta sekvenēšanas reakcija. Rakstainais nanoviļņu izvietojums palielina izvades lasījumu un datu apjomu.

¹radiofrekvenču identifikācija

Kasetne

Sekvenēšanas reaģentu kasetne ir iepriekš piepildīta ar klasteru veidošanas, sekvenēšanas, gala pāru un indeksēšanas reaģentiem. Ar foliju noslēgtais rezervuārs ir paredzēts bibliotēkām, un priekšpusē esošais slots ir paredzēts plūsmas elementam.



- A. Bibliotēkas rezervuārs
- B. Plūsmas elementa slots
- C. Noteces aizbāznis

Kasetnē ir visi ciklam nepieciešamie palīgmateriāli: reaģenti, bibliotēka un plūsmas elements. Bibliotēka un plūsmas elements tiek ievietoti atkausētājā kasetnē, kas pēc tam tiek ievietota iekārtā. Pēc cikla palaišanas reaģenti un bibliotēka tiek automātiski pārsūtīti no kasetnes uz plūsmas elementu.

Kasetnē ir sūkņi, vārsti un visa sistēmas fluīdika, tostarp rezervuārs apakšpusē izmantoto reaģentu savākšanai. Pēc cikla kasetne tiek izvadīta, tādēļ iekārtas mazgāšana nav nepieciešama.

Atbalstītais ciklu skaits

Uzlīme uz kasetnes norāda, cik ciklu tiek analizēts, nevis cik ciklu tiek veikts. Plūsmas elements ir saderīgs ar jebkuru ciklu skaitu un jebkuru lasījuma veidu.

Visas 100 ciklu un 200 ciklu kasetnes ietver papildu 38 ciklus. 300 ciklu kasetne ietver papildu 27 ciklus. Piemēram, 300 ciklu kasetne nodrošina pietiekami daudz reaģentu izmantošanai līdz pat 327 sekvenēšanas cikliem. Papildinformāciju par sekvenēšanas ciklu skaitu skatiet sadaļā [Ciklu skaits lasījumā 31. lpp.](#)

Simbolu apraksts

Tālāk redzamajā tabulā ir aprakstīti uz palīgmateriāla vai palīgmateriāla iepakojuma norādītie simboli.

Simbols	Apraksts
	Palīgmateriāla derīguma termiņa beigu datums. Lai sasniegtu vislabākos rezultātus, palīgmateriāls jāizmanto pirms šī datuma.
	Norāda ražotāju (Illumina).
	Paredzēts tikai pētniecības nolūkiem (RUO).
	Norāda detaļas numuru, kas identificē palīgmateriālu. ¹
	Norāda partijas kodu, kas identificē palīgmateriāla ražojuma partiju. ¹
	Norāda, ka izstrādājums ir bīstams veselībai.
	Uzglabāšanas temperatūras diapazons grādos pēc Celsija. Palīgmateriāls jāuzglabā norādītā diapazona robežās. ²

Palīgmateriāli

Iegādājieties tālāk norādītos palīgmateriālus sekvenēšanas un apkopes vajadzībām.

Palīgmateriāli sekvenēšanai

3. tabula Palīgmateriāli sekvenēšanai

Palīgmateriāls	Piegādātājs	Nolūks
Vienreizlietojamie cimdi bez pūdera	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Universāls lietojums.
NextSeq 1000/2000 P2 (v3) reaģentu komplekts	Illumina: Kataloga Nr. 20046811 (100 cikli) Kataloga Nr. 20046812 (200 cikli) Kataloga Nr. 20046813 (300 cikli)	Nodrošina reaģenta kasetni, plūsmas elementu un NextSeq 1000/2000 RSB ar Tween 20 vienai izpildei. Saderīgs ar NextSeq 1000 un NextSeq 2000.
NextSeq 2000 P3 reaģentu komplekts	Illumina: Kataloga Nr. 20046810 (50 cikli) Kataloga Nr. 20040559 (100 cikli) Kataloga Nr. 20040560 (200 cikli) Kataloga Nr. 20040561 (300 cikli)	Nodrošina reaģenta kasetni, plūsmas elementu un NextSeq 1000/2000 RSB ar Tween 20 vienai izpildei. Saderīgs tikai ar NextSeq 2000.
Mikromēģenes, 1,5 ml	Fisher Scientific, kataloga Nr. 14-222-158, vai līdzvērtīgas mēģenes ar mazu saistīšanas spēju	Bibliotēku atšķaidīšana līdz ievietošanas koncentrācijai.
Pipetes uzgaļi, 10 µl	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Bibliotēku atšķaidīšana.
Pipetes uzgaļi, 20 µl	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Atšķaidīšana un bibliotēku ievietošana.
Pipetes uzgaļi, 200 µl	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Bibliotēku atšķaidīšana.
Pipetes uzgaļi, 1000 µl	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Bibliotēkas rezervuāra folijas pārduršana.

Palīgmateriāls	Piegādātājs	Nolūks
[Papildu] PhiX Control v3	Illumina, kataloga Nr. FC-110-3001	Atsevišķa PhiX cikla veikšana vai PhiX kontroles papildināšana.
[Papildu] Papīra dvieļi	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Kasetnes nosusināšana pēc ūdens peldes.

Apkopes palīgmateriāli

4. tabula Apkopes palīgmateriāli

Palīgmateriāls	Piegādātājs	Nolūks
Vienreizlietojamie cimdi bez pūdera	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Universāls lietojums.
NextSeq 1000/2000 gaisa filtra rezerve*	Illumina, kataloga Nr. 20029759	Gaisa filtra nomaiņa reizi sešos mēnešos.

* Instruments ir aprīkots ar vienu uzstādīto un vienu rezerves daļu. Kad garantijas laiks ir beidzies, rezerves daļas jānodrošina lietotājam. Glabājiet iepakojumā līdz lietošanai.

Palīgaprīkojums

Iegādājieties tālāk norādīto palīgaprīkojumu sekvenēšanas vajadzībām.

Ierīce	Avots	Nolūks
Saldētava, no -25 °C līdz -15 °C	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Kasetnes uzglabāšana.
Ledus trauks	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Bibliotēku atlikšana līdz sekvenēšanai.
Pipete, 10 µl	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Bibliotēku atšķaidīšana līdz ievietošanas koncentrācijai.
Pipete, 20 µl	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Bibliotēku atšķaidīšana līdz ielādes koncentrācijai un bibliotēku ielāde kasetnē.
Pipete, 200 µl	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Bibliotēku atšķaidīšana līdz ievietošanas koncentrācijai.
Ledusskapis, no 2 °C līdz 8 °C	Vispārīgais laboratorijas piegādātājs	Plūsmas elementa uzglabāšana vai kasetnes atlaidināšana.

Ierīce	Avots	Nolūks
<p>[Papildu] Viena no tālāk norādītajām kontrolētas temperatūras ūdens vannām vai līdzvērtīga, kam var uzturēt 25 °C temperatūru:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Thermo Scientific Precision 35L cirkulējošā ūdens vanna (vienlaikus var ievietot 5 kasetnes) • SHEL LAB 22L Digital cirkulējošā ūdens vanna (vienlaikus var ievietot 3 kasetnes) 	<ul style="list-style-type: none"> • Thermo Fisher Scientific, kataloga Nr. TSCIR 35 • Shel Lab, kataloga Nr. SWBC22 	<p>Kasetnes atkausēšana.</p>

Protokols

Šajā sadaļā ir sniegtas secīgas instrukcijas, kā sagatavot palīgmateriālus, atšķaidīt bibliotēkas un iestatīt sekvenēšanas izpildi vienā no četriem izpildes režīmiem (mākonis, hibrīdais un lokālais režīms, izmantojot DRAGEN vai BaseSpace sekvenēšanas centrmezglu, kamēr autonomais režīms ir savrups režīms, kas paredzēts cBCL datu ģenerēšanai tikai pielāgotu analīzes darbpilūsmu gadījumā).

Rīkojoties ar reaģentiem un citām ķīmiskajām vielām, valkājiet aizsargbrilles, laboratorijas uzsvārci un cimdus bez pulvera.

Pirms protokola palaišanas pārlicinieties, ka jums ir nepieciešamie palīgmateriāli un aprīkojums. Skatiet sadaļu [Palīgmateriāli un aprīkojums 23. lpp.](#)

Izpildiet protokolus parādītajā secībā, ievērojot norādītos tilpumus, temperatūru un ilgumu.

Sekvenēšanas apsvērumi

Pirms protokola sākšanas pārskatiet tālāk sniegto informāciju, lai sagatavotos bibliotēku atšķaidīšanai un izpildes iestatīšanai. Optimālās ievietošanas koncentrācijas sasniegšana ir kritiski svarīga sekmīgai sekvenēšanas un analīzes norisei. Pareizā ciklu skaita ievadīšana lasījumā palīdz nodrošināt optimālu datu izvadi.

Ievietošanas tilpums un koncentrācijas

Ievietošanas tilpums ir 20 µl. Ievietošanas koncentrācija atšķiras atkarībā no bibliotēkas tipa.

Bibliotēkas tips	Ievietošanas koncentrācija (pM)
AmpliSeq™, kas paredzēta Illumina Library PLUS	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep ar bagātināšanu	1000
Illumina Stranded Total RNA ar Ribo-Zero Plus	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA bez PCR	1000
100% PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1200
TruSeq DNA Nano 550	1500
TruSeq Stranded mRNA	1000

Citiem bibliotēku tiem ieteicamā sākuma ievietošanas koncentrācija ir 650 pM. Optimizējiet šo koncentrāciju turpmāko ciklu laikā, lai noteiktu ievietošanas koncentrāciju, kas pastāvīgi sniedz specifiskajām atbilstošus datus.

i | Ievietošanas koncentrācijas optimizēšanai izmantojiet rādītāju % Loading Concentration (Procentuālā ievietošanas koncentrācija) `PrimaryAnalysisMetrics.csv` izvades failā, kas pieejams pēc cikla pabeigšanas. Ja procentuālā ievietošanas koncentrācija ir <95%, palieliniet ievietošanas koncentrāciju ar 100 pM soļiem secīgu ciklu laikā.

Ciklu skaits lasījumā

Katram lasījumam ievadot vismaz 26 ciklus, bet ne vairāk kā 151 ciklu, tiek nodrošināta datu kvalitāte.

Precīzs ciklu skaits ir atkarīgs no eksperimenta. NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrā

1. lasījumam ir nepieciešams vismaz 1 cikls, bet, ja ciklu skaits 1. lasījumā ir mazāks par 26, tiek parādīts brīdinājums.

Kopējais ciklu skaits 1. lasījumam, 1. rādītājam, 2. rādītājam un 2. lasījumam nedrīkst būt lielāks par komplektam atbalstīto ciklu skaitu un papildus 38 cikliem 100 ciklu un 200 ciklu komplektiem un 27 cikliem P3 300 ciklu komplektiem. NextSeq 1000/2000 vadības programmatūra parāda brīdinājumu, ja 1. rādītājam un 2. rādītājam ir mazāk nekā 6 cikli. Ja 1. rādītājam vai 2. rādītājam ir 0 ciklu, brīdinājums netiek rādīts.

Minimālais un maksimālais ciklu skaits ietver papildu ciklu. Vienmēr pievienojiet vienu ciklu vēlamajam lasījumam, lai labotu fāzēšanas un pirmsfāzēšanas sekas. Lasījuma garums ir *sekvenēšanas* ciklu skaits 1. un 2. lasījumā, neņemot vērā papildu ciklus un rādītāju ciklus. Papildinformāciju skatiet sadaļas [Reāllaika analīzes darbplūsmā 56. lpp.](#) punktā Fāzēšanas korekcija.

Parauga izpildes iestatīšana:


- Lasījumam ar garumu 35 (viens lasījums) laukā Read 1 (1. lasījums) ievadiet **36**.
- Lai lasījuma garums būtu 150 (gala pārī), laukā Read 1 (1. lasījums) ievadiet **151** un arī laukā Read 2 (2. lasījums) ievadiet **151**.

Sekvenēšanas izpildes plānošana BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā

Izmantojiet iekārtas izpildes iestatījumus BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā, lai izveidotu un konfigurētu izpildes iestatījumus. Ja iestatāt izpildi mākoņa vai hibrīdajā režīmā, iesniedziet izpildes konfigurāciju BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla konta plānoto ciklu sarakstā cilnē Planned Runs (Plānotie cikli). sekvenēšanai pieejamie cikli NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmās ir redzami cilnē (Plānotie cikli). Ja iestatāt izpildi lokālajā režīmā, izmantojiet iekārtas izpildes iestatījumus, lai izveidotu un eksportētu parauga lapu v2 failu formātā. Varat arī skatīt sadaļu [Parauga lapas v2 iestatījumi 85. lpp.](#), lai izveidotu parauga lapu bez BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla, izmantojot pieejamo veidni.

BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla iekārtas izpildes iestatījumi neatbalsta vairāk nekā 1536 paraugu.

Cikla iestatīšana

1. Pārejiet uz BaseSpace sekvenēšanas centrmezglu.
2. Ievadiet savu e-pasta adresi un BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla paroli un pēc tam atlasiet **Sign in** (Pieteikties).
3. Atlasiet cilni **Runs** (Cikli) un pēc tam atlasiet nolaižamo izvēlni **New Run** (Jauns cikls).
4. Atlasiet **NextSeq 1000/2000**.
5. Laukā Run Name (Cikla nosaukums) ievadiet unikālu nosaukumu pēc jūsu izvēles, lai noteiktu pašreizējo ciklu.
Cikla nosaukums var saturēt ne vairāk kā 225 burtus, ciparus, atstarpes, defises un zemsvītras.
6. Atlasiet vienu no tālāk norādītajām analīzes atrašanās vietām.
 - **BaseSpace** — analīzes sekvenēšanas dati mākonī.
 - **Lokāli** — analīzes sekvenēšanas dati iekārtā, vai ģenerējiet parauga lapu v2 lokālajam vai hibrīdajam režīmam.
7. Atlasiet analīzes tipu un versiju.
Papildinformāciju par sekundārajām analīzēm skatiet sadaļā [DRAGEN sekundārās analīzes izvades faili 61. lpp.](#) vai BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla dokumentācijā. Ja atlasījāt DRAGEN Single Cell RNA analīzi, informāciju par trešo pušu atsevišķu šūnu RNA bibliotēku sagatavošanas komplektu saderību skatiet NextSeq 1000/2000 lapā Products Files (Izstrādājumu faili).
 Veicot analīzi iekārtā, atlasītajai versijai ir jāsakrīt ar iekārtā instalēto DRAGEN versiju. Lai pārbaudītu, kura DRAGEN versija ir instalēta iekārtā, skatiet sadaļu [DRAGEN darbplūsmas un licences atjauninājumi 75. lpp.](#)
8. **[Papildu]** Iestatiet papildu pielāgotus rādītāju kompleksus, kā norādīts tālāk.
Ja izmantojat vairāk nekā vienu bibliotēku, bibliotēku rādītāju lasījumu garumam ir jābūt vienādam.
 - a. Rādītāju adapteru komplektu nolaižamajā izvēlnē atlasiet **Add Custom Index Adapter Kit** (Pievienot pielāgotu rādītāju adaptera komplektu).
 - b. Atlasiet veidnes tipu un ievadiet komplekta nosaukumu, adaptera sekvences, rādītāju stratēģijas un rādītāju sekvences.
Pārliedzieties, ka otrā rādītāja (i5) adaptera sekvences ir uz priekšu vērstā orientācijā.
 - c. Atlasiet **Create New Kit** (Izveidot jaunu komplektu).
9. **[Papildu]** Iestatiet pielāgotu bibliotēkas sagatavošanas komplektu, kā norādīts tālāk.
 - a. Bibliotēku sagatavošanas komplektu nolaižamajā izvēlnē atlasiet **Add Custom Library Prep Kit** (Pievienot pielāgotu bibliotēkas sagatavošanas komplektu).
 - b. Ievadiet pielāgotā bibliotēkas sagatavošanas komplekta nosaukumu, lasījumu tipus, noklusējuma lasījumu ciklus un saderīgus rādītāju adapteru kompleksus.
 - c. Atlasiet **Create New Kit** (Izveidot jaunu komplektu).

10. Atlasiet tālāk norādītos iekārtas iestatījumus. Atkarībā no bibliotēkas sagatavošanas komplekta ieteicamās opcijas tiek atlasītas automātiski. Dažiem bibliotēku sagatavošanas komplektiem ir iekodēts rādītāju lasījumu skaits un lasījumu tipi, ko nevar mainīt.

- Bibliotēkas sagatavošanas komplekts
- Rādītāju adaptera komplekts
- Rādītāju lasījumu skaits
- Lasījumu tips
- Sekvenēšanas ciklu skaits lasījumā

i | Ja bibliotēkas sagatavošanas komplektam ir atlasīta opcija Not Specified (Nav norādīts), rādītāju lasījumu skaits netiek atjaunināts, kamēr rādītāju sekvenču nav ievadītas sadaļā Sample Data (Paraugu dati).

11. Ievadiet paraugu informāciju izklājlapā Sample Data (Paraugu dati), izmantojot vienu no tālāk norādītajām opcijām. Lai grupētu paraugus datu apkopošanai lejupejošās analīzes laikā, piešķiriet grupai nosaukumu kolonnā Project (Projekts).

- Atlasiet **Import Data** (Importēt datus) un pēc tam atlasiet savu parauga lapu. Pārliecinieties, ka jūsu parauga lapa atbilst formatēšanas prasībām. Skatiet sadaļu [Parauga lapa v2 iestatījumi 85. lpp.](#) Ja parauga lapa pēc sākotnējās lejupejošās analīzes tiek mainīta, var rasties analīzes kļūme.
- Ielīmējiet paraugu ID un rādītāju plates viļņu pozīcijas vai i7 un i5 rādītājus tieši no arējā faila. Pirms ielīmēšanas ievadiet paraugu rindu skaitu laukā Rows (Rindas) un pēc tam atlasiet +. Parauga ID var saturēt līdz 20 burtciparu rakstzīmēm, defises un zemsvītras.

i | Fiksēta izkārtojuma rādītāju platēm ir vajadzīgi ieraksti ar viļņu pozīciju. Rādītājiem, kam nav fiksēta izkārtojuma, ir nepieciešami i7 un i5 rādītāju ieraksti. i5 rādītāji ir jāievada uz priekšu vērstā orientācijā.

- Manuāli ievadiet paraugu ID un atbilstošās viļņu pozīcijas vai rādītājus. Ja bibliotēkas sagatavošanas komplektam ir atlasīta opcija Not Specified (Nav norādīts), ievadiet 2. rādītāja (i5) sekvenču uz priekšu vērstā orientācijā.

12. Atlasiet **Next** (Tālāk).

Sekundārās analīzes iestatīšana

Konfigurējiet izpildei atlasītā analīzes tipa iestatījumus. Papildinformāciju par DRAGEN analīzes darbplūsmu skatiet sadaļā [DRAGEN sekundārās analīzes izvades faili 61. lpp.](#)

Illumina DRAGEN BCL konvertēšana

Veiciet tālāk uzskaitītās darbības, lai konfigurētu Illumina DRAGEN BCL konvertēšanas analīzi.

1. Ievadiet tālāk norādītos neobligātos iestatījumus.

Iestatījums	Apraksts
AdapterRead1	1. lasījuma adaptera sekvence. Ja izmantojat Illumina bibliotēku sagatavošanas komplektu, atstājiet lauku AdapterRead1 tukšu.
AdapterRead2	2. lasījuma adaptera sekvence. Ja izmantojat Illumina bibliotēku sagatavošanas komplektu, atstājiet lauku AdapterRead2 tukšu.
BarcodeMismatchesIndex1	Atļauto neatbilstību skaits starp pirmā rādītāja lasījumu un rādītāja sekvenci. Noklusējuma vērtība ir 1. Ja svītrkoda vērtība ir 6 bp, ieteicamā vērtība ir 0.
BarcodeMismatchesIndex2	Atļauto neatbilstību skaits starp otrā rādītāja lasījumu un rādītāja sekvenci. Noklusējuma vērtība ir 1. Ja svītrkoda vērtība ir 6 bp, ieteicamā vērtība ir 0.
OverrideCycles	<p>Virkne, ko izmanto, lai norādītu UMI ciklus un maskētu lasījumu ciklus. Ir atļautas šādas vērtības:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N — norāda ciklus, kas jāignorē; • Y — norāda sekvenējamus ciklus; • I — norāda rādītāju ciklus; • U — norāda UMI ciklus, kas jāsaīsina. <p>Elementi ir atdalīti ar semikolu. Tālāk ir parādīti OverrideCycles ievades piemēri.</p> <p>U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66</p>

2. Atlasiet, vai saglabāt FASTQ failu kopiju. FASTQ faili tiek ģenerēti tikai tad, ja izvēlaties paturēt FASTQ failus.
3. Atlasiet vienu no šīm FASTQ izvades formāta opcijām:
 - **gzip** — saglabājat FASTQ failus gzip formātā;
 - **DRAGEN** — saglabājat FASTQ failus ora formātā.
4. Pabeidziet izpildes konfigurēšanu.
 - Lai nosūtītu cikla konfigurāciju uz savu BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla kontu, atlasiet **Submit Run** (Iesniegt ciklu). BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā iesniegtie cikli ir redzami plānoto ciklu sarakstā un ir pieejami sistēmām, kurās tiek izmantots mākoņa vai hibrīdais režīms.
 - Lai saglabātu cikla konfigurāciju kā parauga lapu v2 failu formātā, nolaižamajā sarakstā **Submit Run** (Iesniegt ciklu) atlasiet **Export Sample Sheet** (Eksportēt parauga lapu). Lai varētu inicializēt ciklus sistēmās, kurās tiek izmantots lokālais režīms, ir nepieciešama paraugu lapa. Šī opcija ir pieejama tikai tad, ja ir atlasīta lokālā analīzes atrašanās vieta.

illumina DRAGEN Enrichment

Veiciet tālāk uzskaitītās darbības, lai konfigurētu illumina DRAGEN Enrichment analīzi.

1. Atlasiet atsauces genomu.
Ja iespējams, izmantojiet atsauces genomu ar ALT atpazīšanu.
2. Atlasiet *.bed failu ar reģioniem, kurus vēlaties iestatīt kā mērķus, vai augšupielādējiet jaunu pielāgoto failu.
Pārliedzinieties, ka BED faila atsauces genoms atbilst atsauces genomam, kas atlasīts 1. darbības laikā. Jaunam pielāgotajam BED failam izmantojiet šādu nosaukuma formātu: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.
 - **Lokālais režīms** — atlasiet **Select Custom File (Local)** (Atlasīt pielāgoto failu (lokāli)), lai augšupielādētu vienu izpildi, vai **Upload Custom File (BaseSpace)** (Augšupielādēt pielāgoto failu (BaseSpace)) atkārtotai lietošanai.
 - **Mākoņa vai hibrīdais režīms** — atlasiet **Upload Custom File (BaseSpace)** (Augšupielādēt pielāgoto failu (BaseSpace)). Pielāgotais BED fails ir pieejams tikai tajā darba grupā, kurā tas tika augšupielādēts.
3. Atlasiet dzimumšūnas līniju vai somatisko variantu noteicēju.
4. **[Papildu]** Ja tiek izmantots somatisko variantu noteicējs, atlasiet trokšņu bāzēlīnijas failu. Papildinformāciju skatiet sadaļā [Trokšņu bāzēlīnijas failu importēšana 18. lpp.](#)
5. Atlasiet karti/salāgojiet izvades formātu.
6. Atlasiet, vai saglabāt FASTQ failu kopiju. FASTQ faili tiek ģenerēti tikai tad, ja izvēlaties paturēt FASTQ failus.
7. Atlasiet vienu no šīm FASTQ izvades formāta opcijām:
 - **gzip** — saglabājiet FASTQ failus gzip formātā;
 - **DRAGEN** — saglabājiet FASTQ failus ora formātā.
8. Pabeidziet izpildes konfigurēšanu.
 - Lai nosūtītu cikla konfigurāciju uz savu BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla kontu, atlasiet **Submit Run** (Iesniegt ciklu). BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā iesniegtie cikli ir redzami plānoto ciklu sarakstā un ir pieejami sistēmām, kurās tiek izmantots mākoņa vai hibrīdais režīms.
 - Lai saglabātu cikla konfigurāciju kā parauga lapu v2 failu formātā, nolaižamajā sarakstā **Submit Run** (Iesniegt ciklu) atlasiet **Export Sample Sheet** (Eksportēt parauga lapu). Parauga lapa un sekundārās analīzes atbalsta faili tiek lejupielādēti *.zip mapē, un cikli sistēmās ir jāinicializē, izmantojot lokālo režīmu. Šī opcija ir pieejama tikai tad, ja ir atlasīta lokālā analīzes atrašanās vieta.

illumina DRAGEN Germline

Veiciet tālāk uzskaitītās darbības, lai konfigurētu illumina DRAGEN Germline analīzi.

1. Atlasiet atsauces genomu.
Ja iespējams, izmantojiet atsauces genomu ar ALT atpazīšanu.
2. Atlasiet karti/salāgojiet izvades formātu.
3. Atlasiet, vai saglabāt FASTQ failu kopiju. FASTQ faili tiek ģenerēti tikai tad, ja izvēlaties paturēt FASTQ failus.
4. Atlasiet vienu no šīm FASTQ izvades formāta opcijām:
 - **gzip** — saglabājiēt FASTQ failus gzip formātā;
 - **DRAGEN** — saglabājiēt FASTQ failus ora formātā.
5. Pabeidziet izpildes konfigurēšanu.
 - Lai nosūtītu cikla konfigurāciju uz savu BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla kontu, atlasiet **Submit Run** (Iesniegt ciklu). BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā iesniegtie cikli ir redzami plānoto ciklu sarakstā un ir pieejami sistēmām, kurās tiek izmantots mākoņa vai hibrīdais režīms.
 - Lai saglabātu cikla konfigurāciju kā parauga lapu v2 failu formātā, nolaižamajā sarakstā **Submit Run** (Iesniegt ciklu) atlasiet **Export Sample Sheet** (Eksportēt parauga lapu). Parauga lapa un sekundārās analīzes atbalsta faili tiek lejupielādēti *.zip mapē, un cikli sistēmās ir jāinicializē, izmantojot lokālo režīmu. Šī opcija ir pieejama tikai tad, ja ir atlasīta lokālā analīzes atrašanās vieta.

Illumina DRAGEN RNA

Veiciet tālāk uzskaitītās darbības, lai konfigurētu Illumina DRAGEN RN1A analīzi.

1. Atlasiet atsauces genomu.
Ja iespējams, izmantojiet atsauces genomu bez ALT atpazīšanas.
2. Atlasiet karti/salāgojiet izvades formātu.
3. Atlasiet, vai saglabāt FASTQ failu kopiju. FASTQ faili tiek ģenerēti tikai tad, ja izvēlaties paturēt FASTQ failus.
4. Atlasiet vienu no šīm FASTQ izvades formāta opcijām:
 - **gzip** — saglabājiēt FASTQ failus gzip formātā;
 - **DRAGEN** — saglabājiēt FASTQ failus ora formātā.
5. **[Papildu]** Augšupielādējiēt RNA anotācijas failu gēnu pārsūtīšanas formātā (GTF).
 - **Lokālais režīms** — atlasiet **Select Custom File (Local)** (Atlasīt pielāgoto failu (lokāli)), lai augšupielādētu vienu izpildi, vai **Upload Custom File (BaseSpace)** (Augšupielādēt pielāgoto failu (BaseSpace)) atkārtotai lietošanai.
 - **Mākoņa vai hibrīdais režīms** — atlasiet **Upload Custom File (BaseSpace)** (Augšupielādēt pielāgoto failu (BaseSpace)). GTF fails ir pieejams tikai tajā darba grupā, kurā tas tika augšupielādēts.

Kad GTF fails ir augšupielādēts BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla darba grupā, nolaižamajā izvēlnē atlasiet RNA anotācijas failu.

6. Izvēlieties, vai iespējot diferenciālo izteiksmi.
7. Ja iespējot diferenciālo izteiksmi, atlasiet kontroles vai salīdzināšanas vērtību katram paraugam. Katrā salīdzināšanas grupā jebkurš paraugs, kurš ir atzīmēts kā kontrolparaugs, tiek salīdzināts ar visiem paraugiem, kas ir atzīmēti salīdzināšanai. Ja paraugs nesatur kontroles vai salīdzināšanas vērtību, kā vērtību atlasiet **na**.
8. Pabeidziet izpildes konfigurēšanu.
 - Lai nosūtītu cikla konfigurāciju uz savu BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla kontu, atlasiet **Submit Run** (Iesniegt ciklu). BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā iesniegtie cikli ir redzami plānoto ciklu sarakstā un ir pieejami sistēmām, kurās tiek izmantots mākoņa vai hibrīdais režīms.
 - Lai saglabātu cikla konfigurāciju kā parauga lapu v2 failu formātā, nolaižamajā sarakstā **Submit Run** (Iesniegt ciklu) atlasiet **Export Sample Sheet** (Eksportēt parauga lapu). Ja ir nodrošināts neobligāts GTF fails, parauga lapa un sekundārās analīzes atbalsta faili tiek lejupielādēti *.zip mapē, un cikli sistēmās ir jāinicializē, izmantojot lokālo režīmu. Šī opcija ir pieejama tikai tad, ja ir atlasīta lokālā analīzes atrašanās vieta.

Illumina DRAGEN Single Cell RNA

Veiciet tālāk uzskaitītās darbības, lai konfigurētu Illumina DRAGEN Single Cell RNA analīzi.

1. Atlasiet atsauces genomu.

Ja iespējams, izmantojiet atsauces genomu bez ALT atpazīšanas.
2. **[Papildu]** Augšupielādējiet RNA anotācijas failu gēnu pārsūtīšanas formātā (GTF).
 - **Lokālais režīms** — atlasiet **Select Custom File (Local)** (Atlasīt pielāgoto failu (lokāli)), lai augšupielādētu vienu izpildi, vai **Upload Custom File (BaseSpace)** (Augšupielādēt pielāgoto failu (BaseSpace)) atkārtotai lietošanai.
 - **Mākoņa vai hibrīdais režīms** — atlasiet **Upload Custom File (BaseSpace)** (Augšupielādēt pielāgoto failu (BaseSpace)). GTF fails ir pieejams tikai tajā darba grupā, kurā tas tika augšupielādēts.

Kad GTF fails ir augšupielādēts BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla darba grupā, nolaižamajā izvēlnē atlasiet RNA anotācijas failu.

3. Atlasiet karti/salāgojiet izvades formātu.
4. Atlasiet, vai saglabāt FASTQ failu kopiju. FASTQ faili tiek ģenerēti tikai tad, ja izvēlaties paturēt FASTQ failus.
5. Atlasiet vienu no šīm FASTQ izvades formāta opcijām:
 - **gzip** — saglabājiet FASTQ failus gzip formātā;
 - **DRAGEN** — saglabājiet FASTQ failus ora formātā.

6. Atlasiet jūsu bibliotēku sagatavošanas komplekta tipam identisku konfigurāciju.
Piemēram, ja kā bibliotēkas sagatavošanas komplekts ir atlasīts Single Cell RNA Library Kit 1, kā konfigurācijas tipu atlasiet Type 1.
7. Atlasiet svītrkodu lasīšanu.
8. **[Papildu]** Rediģējiet bāzu skaitu svītrkodos un UMI. Vērtības tiek aizpildītas automātiski, balstoties uz jūsu atlasīto bibliotēkas sagatavošanas komplektu un konfigurācijas tipu.
9. Atlasiet pavediena orientāciju.
10. **[Papildu]** Atlasiet failu ar jūsu svītrkodu sekvencēm vai augšupielādējiet jaunu pielāgoto failu.
11. Ja izmantojat paplašinātās/pielāgotās konfigurācijas tipu, ievadiet ignorēto ciklu skaitu, svītrkodu pozīciju un UMI pozīciju.
12. Pabeidziet izpildes konfigurēšanu.
 - Lai nosūtītu cikla konfigurāciju uz savu BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla kontu, atlasiet **Submit Run** (Iesniegt ciklu). BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā iesniegtie cikli ir redzami plānoto ciklu sarakstā un ir pieejami sistēmām, kurās tiek izmantots mākoņa vai hibrīdais režīms.
 - Lai saglabātu cikla konfigurāciju kā parauga lapu v2 failu formātā, nolaižamajā sarakstā **Submit Run** (Iesniegt ciklu) atlasiet **Export Sample Sheet** (Eksportēt parauga lapu). Ja ir nodrošināts neobligāts GTF fails, parauga lapa un sekundārās analīzes atbalsta faili tiek lejupielādēti *.zip mapē, un cikli sistēmās ir jāinicializē, izmantojot lokālo režīmu. Šī opcija ir pieejama tikai tad, ja ir atlasīta lokālā analīzes atrašanās vieta.

illumina DRAGEN Amplicon

Veiciet tālāk uzskaitītās darbības, lai konfigurētu illumina DRAGEN Amplicon analīzi.

1. Atlasiet atsauces genomu.
2. Atlasiet *.bed failu ar reģioniem, kurus vēlaties iestatīt kā mērķus, vai augšupielādējiet jaunu pielāgoto failu.
Pārliecinieties, ka BED faila atsauces genoms atbilst atsauces genomam, kas atlasīts 1. darbības laikā. Jaunam pielāgotajam BED failam izmantojiet šādu nosaukuma formātu: `name_of_panel_versionNumber.referencegenome.bed`.
 - **Mākoņa vai hibrīdais režīms** — atlasiet **Upload Custom File (BaseSpace)** (Augšupielādēt pielāgoto failu (BaseSpace)). Pielāgotais BED fails ir pieejams tikai tajā darba grupā, kurā tas tika augšupielādēts.
 - **Lokālais režīms** — atlasiet **Select Custom File (Local)** (Atlasīt pielāgoto failu (lokāli)), lai augšupielādētu vienu izpildi, vai **Upload Custom File (BaseSpace)** (Augšupielādēt pielāgoto failu (BaseSpace)) atkārtotai lietošanai.
3. Atlasiet dzimumšūnas līniju vai somatisko variantu noteicēju.
4. Atlasiet karti/salāgojiet izvades formātu.

5. **[Lokāli]** Atlasiet, vai saglabāt FASTQ failu kopiju. FASTQ faili tiek ģenerēti tikai tad, ja izvēlaties paturēt FASTQ failus.
6. Atlasiet, vai saglabāt FASTQ failu kopiju. FASTQ faili tiek ģenerēti tikai tad, ja izvēlaties paturēt FASTQ failus.
7. Atlasiet vienu no šīm FASTQ izvades formāta opcijām:
 - **gzip** — saglabājiēt FASTQ failus gzip formātā;
 - **DRAGEN** — saglabājiēt FASTQ failus ora formātā.
8. Pabeidziet izpildes konfigurēšanu.
 - Lai nosūtītu cikla konfigurāciju uz savu BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla kontu, atlasiet **Submit Run** (Iesniegt ciklu). BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā iesniegtie cikli ir redzami plānoto ciklu sarakstā un ir pieejami sistēmām, kurās tiek izmantots mākoņa vai hibrīdais režīms.
 - **[Lokāli]** Lai saglabātu cikla konfigurāciju kā parauga lapu v2 failu formātā, nolaižamajā sarakstā **Submit Run** (Iesniegt ciklu) atlasiet **Export Sample Sheet** (Eksportēt parauga lapu). Parauga lapa un sekundārās analīzes atbalsta faili tiek lejupielādēti *.zip mapē, un cikli sistēmās ir jāinicializē, izmantojot lokālo režīmu. Šī opcija ir pieejama tikai tad, ja ir atlasīta lokālā analīzes atrašanās vieta.

Maisiņā ievietotās kasetnes un plūsmas elementa atkausēšana

Šajā posmā tiek atkausēta *neatvērtajā maisiņā* esošā kasetne un sagatavots plūsmas elements. Atkausējiēt maisiņā ievietoto kasetni, izmantojot vienu no trim metodēm: kontrolētas temperatūras ūdens peldi, ledusskapi vai gaisu istabas temperatūrā. Izmantojiēt kasetni tūliēt pēc atkausēšanas, atkārtoti nesusaldējiēt to. Ja nevarat izmantot kasetni tūliēt pēc atkausēšanas, skatjiēt sadaļu [Palīgmateriālu atkārtota glabāšana 80. lpp.](#)

4. attēls Maisiņā ievietota kasetne



Kasetnes atkausēšana kontrolētas temperatūras ūdens peldē

1. Uzvelciet jaunus cimdus bez pulvera un izņemiet kasetni no glabāšanas vietas.
2. Izņemiet kasetni no kastītes, bet *neatveriet sudraboto folijas maisiņu*.

! Caurdurta maisiņa atkausēšana ūdens peldē var izraisīt sekvenēšanas kļūmi. Tādā gadījumā atkausējiet istabas temperatūrā vai ledusskapī.



3. Atkausējiet maisiņā ievietoto kasetni kontrolētas 25 °C temperatūras ūdens peldē 6 stundas:
 - ūdens dziļumam ir jābūt vismaz 9,5–10 cm neatkarīgi no atkausējamo kasetņu skaita;
 - iestatiet ūdens peldes temperatūru 25 °C;
 - pagrieziet maisiņu ar etiķeti uz augšu un ievietojiet ūdens vanniņā, neiegremdējot to;

! Nemēģiniet iegremdēt kasetni, uzliekot tai papildu svaru. Ja maisiņa etiķete nav vērsta uz augšu vai ja kasetne atkausēšanas laikā pagriežas otrādi, tiek negatīvi ietekmēti sekvenēšanas dati.


- ūdens peldes ilgums nedrīkst pārsniegt 8 stundas;
 - neatkausējiet vairāk kasetņu, nekā vienlaikus var ievietot ūdens vanniņā. Informāciju par saderīgām vanniņām skatiet sadaļā [Palīgaprīkojums 28. lpp.](#);
 - nelieciet kasetnes citu virs citas.
4. Izņemiet kasetni no ūdens vanniņas un nosusiniet ar papīra dvieļiem.

Kasetnes atkausēšana ledusskapī

1. Uzvelciet jaunus cimdus bez pūdera.

2. Vienu dienu pirms paredzētā cikla izņemiet kasetni no glabāšanas vietas temperatūrā no -25 °C līdz -15 °C .
3. Izņemiet kasetni no kastītes, bet *neatveriet sudrabeto folijas maisiņu*.
4. Novietojiet kasetni istabas temperatūrā tā, lai etiķete būtu vērsta augšup un gaiss varētu cirkulēt no malām un no augšpusēs.
 Ja maisiņa etiķete nav vērsta uz augšu, tiek negatīvi ietekmēti sekvenēšanas dati.
5. Atkausējiet istabas temperatūrā 6 stundas.
6. Ievietojiet kasetni ledusskapī no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā tā, lai etiķete būtu vērsta augšup un gaiss varētu cirkulēt no malām.
 Ja maisiņa etiķete nav vērsta uz augšu, tiek negatīvi ietekmēti sekvenēšanas dati.
7. Atkausējiet ledusskapī 12 stundas. Ilgums nedrīkst pārsniegt 72 stundas.

Kasetnes atkausēšana istabas temperatūrā

1. Uzvelciet jaunus cimdus bez pūdera.
2. Izņemiet kasetni no glabāšanas vietas temperatūrā no -25 °C līdz -15 °C .
3. Izņemiet kasetni no kastītes, bet *neatveriet sudrabeto folijas maisiņu*.
4. Novietojiet kasetni tā, lai etiķete būtu vērsta augšup un gaiss varētu cirkulēt no malām un no augšpusēs.
 Ja maisiņa etiķete nav vērsta uz augšu, tiek negatīvi ietekmēti sekvenēšanas dati.
5. Atkausējiet istabas temperatūrā 9 stundas. Ilgums nedrīkst pārsniegt 16 stundas.

Plūsmas elementa un kasetnes sagatavošana

1. Sagatavojiet plūsmas elementu, kā norādīts tālāk.
 - a. Izņemiet jaunu plūsmas elementu no glabātuves, kurā ir no 2 °C līdz 8 °C temperatūra.
 - b. Izņemot plūsmas elementu no iepakojuma, turiet neatvērto iepakojumu istabas temperatūrā 10—15 minūtes, lai novērstu kondensāciju. Sagatavojot plūsmas elementu tūlīt, tiek nodrošināts, ka tas sasniedz istabas temperatūru laikā.
2. Ja atkausēšana notiek ledusskapī:
 - a. Izņemiet atkausēto kasetni no glabāšanas vietas temperatūrā no 2 °C līdz 8 °C .
 - b. Pirms sekvenēšanas turiet neatvērto kasetni istabas temperatūrā vismaz 15 minūtes. Ilgums nedrīkst pārsniegt 1 stundu.

Bibliotēku atšķaidīšana

Ja tiek izmantota denaturācija un atšķaidīšana iekārtā, šīs darbības laikā bibliotēkas tiek atšķaidītas līdz piemērotai ievietošanas koncentrācijai. Papildu 2% PhiX¹ paplašinājums nodrošina papildu parametrus, bāzu dažādību vai pozitīvo kontroli. Bibliotēkām ar mazāku bāzu dažādību PhiX paplašinājuma procentuālais rādītājs ir jāpalielina.

Ja bibliotēkas tiek denaturētas un atšķaidītas manuāli, izmantojiet *NextSeq 1000 un 2000 bibliotēku denaturācijas un atšķaidīšanas rokasgrāmatu (dokuments Nr. 1000000139235)*. Šī darbība attiecas tikai uz iekārtā veikto denaturāciju un atšķaidīšanu.

Bibliotēkas atšķaidīšana līdz 2 nM

- [Papildu] Izņemiet 10 nM PhiX no krājumiem, kas atrodas glabātavā ar temperatūru no –25 °C līdz –15 °C.
PhiX ir nepieciešams tikai paplašināšanai pēc izvēles vai izpildei tikai ar PhiX.
- [Papildu] Atkausējiet PhiX istabas temperatūrā 5 minūtes un pēc tam kvantificējiet, izmantojot uz fluorescenci balstītu metodi, piemēram, Qubit, lai apstiprinātu PhiX koncentrāciju.
Ja kvantificēšana nav iespējama, turpiniet ar 10 nM koncentrāciju.
- Īsu brīdi maisiet bibliotēku vai PhiX un pēc tam 1 minūti centrifugējiet ar spēku 280 × g.
- Izmantojot RSB ar Tween 20 kā atšķaidītāju, sagatavojiet vismaz 24 µl 2 nM bibliotēkas mikromēģenē ar mazu saistīšanas spēju.
PhiX paplašinājuma instrukcijas skatiet sadaļā [PhiX Control pievienošana \(pēc izvēles\) 43. lpp.](#)
- Īsu brīdi maisiet un pēc tam 1 minūti centrifugējiet ar spēku 280 × g.

2 nM bibliotēkas atšķaidīšana līdz ievietošanas koncentrācijai

- Mikromēģenē ar mazu saistīšanas spēju samaisiet tālāk norādītos tilpumus, lai sagatavotu 24 µl bibliotēku, kas atšķaidīta līdz atbilstošajai ievietošanas koncentrācijai.

Bibliotēkas tips*	Ievietošanas koncentrācija (pM)	2 nM bibliotēkas tilpums (µl)	RSB ar Tween 20 tilpums (µl)
Ampliseq, kas paredzēta Illumina Library PLUS	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15
Illumina DNA Prep ar bagātināšanu	1000	12	12

¹PhiX ir maza, lietošanai gatava Illumina bibliotēka ar līdzsvarotu nukleotīdu sastāvu.

Bibliotēkas tips*	Ievietošanas koncentrācija (pM)	2 nM bibliotēkas tilpums (µl)	RSB ar Tween 20 tilpums (µl)
Illumina Stranded Total RNA ar Ribo-Zero Plus	750	9	15
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA bez PCR	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

* Ja bibliotēkas tips nav iekļauts sarakstā, sāciet ar ievietošanas koncentrāciju 650 pM un optimizējiet to turpmāko ciklu laikā.

Šajā tabulā ir sniegti ievietošanas koncentrāciju piemēri. Sistēma NextSeq 1000/2000 ir savietojama ar visiem Illumina bibliotēku sagatavošanas komplektiem, taču optimālā ievietošanas koncentrācija var atšķirties.

2. Īsu brīdi maisiet un pēc tam 1 minūti centrifugējiet ar spēku 280 × g.
3. Novietojiet atšķaidītu bibliotēku uz ledus, līdz tā ir gatava sekvenēšanai. Līdz ievietošanas koncentrācijai atšķaidītās bibliotēkas sekvenējiet tajā pašā dienā, kad tās tiek atšķaidītas.
4. Rīkojieties, kā norādīts tālāk.
 - Ja pievienojat PhiX, skatiet sadaļu [PhiX Control pievienošana \(pēc izvēles\) 43. lpp.](#)
 - Ja nepievienojat PhiX vai veicat izpildi tikai ar PhiX, skatiet sadaļu [Paļīgmateriālu ievietošana kasetnē 44. lpp.](#)

PhiX Control pievienošana (pēc izvēles)

1. Mikromēģenē ar mazu saistīšanas spēju sajauciet tālāk norādītos tilpumus, lai sagatavotu 20 µl 1 nM PhiX.
 - 10 nM PhiX (2 µl)
 - RSB ar Tween 20 (18 µl)
2. Īsu brīdi maisiet un pēc tam 1 minūti centrifugējiet ar spēku 280 × g.
3. Pievienojiet 1 µl 1 nM PhiX 24 µl bibliotēkai, kas atšķaidīta līdz galīgajai ievietošanas koncentrācijai. Ar šiem tilpumiem tiek iegūts ~2% PhiX paplašinājums. Faktiskais procentuālais daudzums ir atkarīgs no bibliotēkas kvalitātes un daudzuma.
4. Novietojiet bibliotēku ar PhiX paplašinājumu uz ledus, līdz tā ir gatava sekvenēšanai.

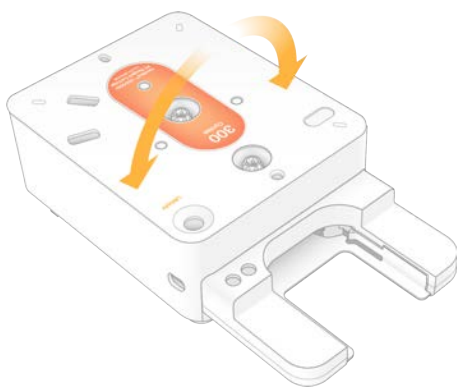
Bibliotēkas ar PhiX paplašinājumu sekvenējiet tajā pašā dienā, kad tās tiek atšķaidītas.

Palīgmateriālu ievietošana kasetnē

Šīs darbības laikā kasetne tiek sagatavota sekvenēšanai, samaisot iepriekš uzpildītos reaģentus un ieviejojot atšķaidītās bibliotēkas un plūsmas elementu.

Kasetnes sagatavošana

1. Atveriet kasetnes maisiņu, atplēšot vai atgriežot ar šķērēm augšējo iegriezumu no jebkuras puses.
2. Izņemiet kasetni no maisiņa. Izmetiet maisiņu un desikantu.
3. Apvēršiet kasetni 10 reizes, lai samaisītu reaģentus.
Apvēršot iekšējās detaļas var grabēt; tas ir normāli.



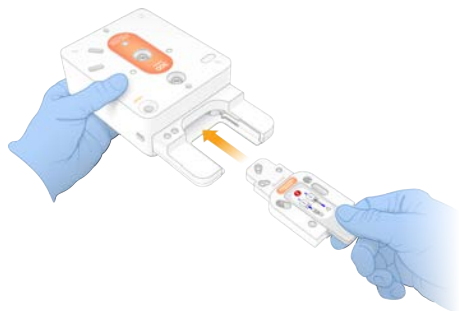
Plūsmas elementa ievietošana

1. Atveriet sudraboto folijas maisiņu, atplēšot vai atgriežot ar šķērēm augšējo iegriezumu no jebkuras puses.
Ja nevarat izmantot plūsmas elementu tūlīt, skatiet sadaļu [Palīgmateriālu atkārtota glabāšana 80. lpp.](#)
2. Izņemiet plūsmas elementu no iepakojuma.
Nolieciet folijas maisiņu un desikantu malā gadījumam, ja plūsmas elements ir jānovieto atpakaļ glabāšanā. Desikants atrodas paciņā folijas maisiņa apakšā. Izmetiet šos priekšmetus, kad sākas sekvenēšana.

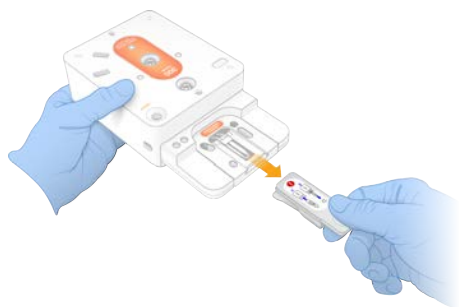


3. Turiet plūsmas elementu aiz pelēkā izciļņa ar etiķeti uz augšu.

4. Iebīdiet plūsmas elementu kasetnes priekšpusē esošajā atverē.
Ja atskan klikšķis, plūsmas elements ir ievietots pareizi. Kad tas ir ievietots pareizi, pelēkais izcilnis izvirzās no kasetnes.



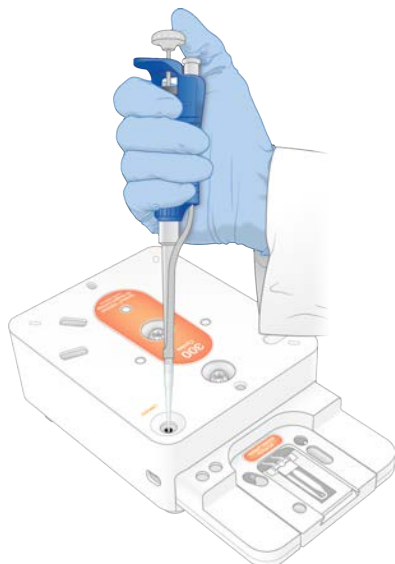
5. Pavelciet un noņemiet pelēko izcilni, lai eksponētu plūsmas elementu. Izmetiet izcilni.



Bibliotēku ievietošana

1. Izmantojot jaunu P1000 pipetes galu, caurduriet bibliotēkas rezervuāru un nospiediet foliju līdz malām, lai palielinātu caurumu.
2. Izmetiet pipetes galu, lai novērstu kontamināciju.

3. Pievienojiet 20 µl atšķaidītas bibliotēkas rezervuāra *apakšpusē*, pirms izdalīšanas lēni nolaižot pipetes galu līdz rezervuāra apakšpusei. Izvairieties no pieskaršanās folijai.



Sekvenēšanas izpildes inicializēšana

Ar šo darbību sekvenēšanas izpilde tiek inicializēta vienā no četriem tālāk norādītajiem režīmiem.


- **Mākoņa režīms** — izpilde tiek atlasīta no plānoto ciklu saraksta NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrā. Sekvenēšanas laikā cBCL dati tiek augšupielādēti BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā. Pēc sekvenēšanas DRAGEN palaišana BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā notiek automātiski.
- **Hibrīdais režīms** — izpilde tiek atlasīta no plānoto ciklu saraksta NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrā. Pēc sekvenēšanas analīze iekārtā tiek sākta automātiski. cBCL dati un DRAGEN sekundārās analīzes izvades faili tiek saglabāti atlasītajā izvades mapē.
- **Lokālais režīms** — parauga lapa v2 failu formātā tiek manuāli importēta NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrā. Pēc sekvenēšanas analīze iekārtā tiek sākta automātiski. cBCL dati un DRAGEN sekundārās analīzes izvades faili tiek saglabāti atlasītajā izvades mapē. Ja ir atlasīta opcija Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana), analīzi var sākt arī no BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā lietojumprogrammām, kad sekvenēšana ir pabeigta.
- **Autonomais režīms** — iestatiet izpildi, ievērojot NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrā sniegtos norādījumus, lai ģenerētu cBCL datus.

⚠ | Viziera atvēršana pirmsizpildes pārbaudes vai izpildes laikā var izraisīt izpildes kļūmi.

⚠ | Viziera atvēršanas un aizvēršanas laikā nepieskarieties iekārtai, lai nepieļautu traumas.

Mākoņa vai hibrīdā režīma inicializēšana

1. Konfigurējiet ciklu režīmu, kā aprakstīts sadaļā [Ciklu režīma konfigurēšana 20. lpp.](#)
2. Atlasiet **Start** (Sākt).
3. Ievadiet savus BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla akreditācijas datus un pēc tam atlasiet **Sign In** (Pieteikties).
4. Ja atlasījāt opciju Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana), atlasiet darbgrupu, kas satur BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla iekārtas izpildes iestatījumos izveidoto ciklu.

 Darbgrupas atlase ir obligāta, lai izvairītos no kļūdām. Pirms turpināšanas pārlicinieties, ka ir atlasīta darbgrupa.


5. Atlasiet **Next** (Tālāk).
6. Atlasiet savu ciklu.
7. Pārlicinieties, ka analīzes, cikla garuma un sekundārās analīzes versija atbilst pareizajam ciklam. Analīzes parametrs Cloud_ norāda, ka analīze tiek veikta BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā.
8. Atlasiet **Review** (Pārskatīt).
9. **[Papildu]** Ievadiet pielāgota lasījumu praimera un pielāgota rādītāju praimera atrašanās vietas. Informāciju par pielāgotu praimeru sagatavošanu un pievienošanu skatiet *NextSeq 1000 un 2000 pielāgoto praimeru rokasgrāmatā (dokuments Nr. 1000000139569)*. Noteikti apmeklējiet saderīgo izstrādājumu lapu, lai pārbaudītu, vai jūsu bibliotēku sagatavošanas komplektam nav nepieciešami Illumina pielāgotie praimeri.
10. **[Papildu]** Atlasiet pielāgotu recepti. Papildinformāciju skatiet sadaļā [Tumsas cikla sekvenēšana 98. lpp.](#)
Ja izmantojat NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras versiju v1.3 un Illumina Stranded Total RNA sagatavošanas komplektu ar Ribo-Zero Plus komplektu vai Illumina Stranded mRNA sagatavošanas komplektu, pielāgotā recepte tiek atlasīta automātiski.
11. **[Papildu]** Lai denaturētu un atšķaidītu bibliotēkas manuāli, noņemiet atlasi no izvēles rūtiņas **Denature and Dilute On Board** (Denaturēt un atšķaidīt iekārtā). Skatiet *NextSeq 1000 un 2000 bibliotēku denaturācijas un atšķaidīšanas rokasgrāmatu (dokuments Nr. 1000000139235)*. Noklusējuma atlase ir konfigurēta NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras iestatījumos.
12. **[Papildu]** Lai mainītu izvades mapi, atlasiet lauku Output Folder (Izvades mape) un ievadiet jaunu atrašanās vietu.
Lauks Output Folder (Izvades mape) tiek aizpildīts automātiski, izmantojot jūsu noklusējuma iestatījumus, un ir obligāts, ja vien nav atlasīta opcija **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana).
Ja atlasījāt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana), opcija Save to BaseSpace Sequence Hub (Saglabāt BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā) ir attēlota kā Enabled (Iespējota).

Ja atlasījāt Proactive and Run Monitoring (Proaktīvais atbalsts un izpildes uzraudzība), opcija Save to BaseSpace Sequence Hub (Saglabāt BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā) ir attēlota kā Disabled (Atspējota).

13. Pārskatiet cikla informāciju un pēc tam atlasiet **Prep** (Sagatavot).

Lokāla cikla inicializēšana


1. Konfigurējiet ciklu režīmu, kā aprakstīts sadaļā [Ciklu režīma konfigurēšana 20. lpp.](#)
2. Atlasiet **Start** (Sākt).
3. Ja atlasījāt opciju Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana) vai Proactive and Run Monitoring (Proaktīvais atbalsts un izpildes uzraudzība), ievadiet savus BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla akreditācijas datus un pēc tam atlasiet **Sign In** (Pieteikties).
4. Ja atlasījāt opciju Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana), atlasiet BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla darbgrupu, kurā saglabāt ciklu, un pēc tam atlasiet **Next** (Tālāk).

 Darbgrupas atlase ir obligāta, lai izvairītos no kļūdām. Pirms turpināšanas pārliecinieties, ka ir atlasīta darbgrupa.

5. Atlasiet **Choose...** (Izvēlēties...) sadaļā Start With Sample Sheet (Sākt ar parauga lapu) un pārejiet uz parauga lapu v2 formātā NextSeq 1000/2000 iekārtā, portatīvajā diskā vai montētajā tīkla diskā. Paraugu lapu failu nosaukumi nedrīkst saturēt speciālās rakstzīmes.

NextSeq 1000/2000 vadības programmatūra v1.3 automātiski nosaka DRAGEN versiju, balstoties uz parauga lapu, un nepieciešamības gadījumā aicina pārslēgt versijas. Sistēmā ir jābūt instalētai DRAGEN versijai. Informāciju par instalēšanu skatiet sadaļā [Programmatūras atjauninājumi 73. lpp.](#)

- **Instrument Run Setup Used** (Tiek izmantoti iekārtas izpildes iestatījumi) — atlasiet .zip mapi ar parauga lapu v2 un atbalsta failiem, ja attiecināms. Pretējā gadījumā atlasiet parauga lapu v2.
- **Instrument Run Setup Not Used** (Netiek izmantoti iekārtas izpildes iestatījumi) — pārliecinieties, ka sekundārās analīzes atbalsta fails atrodas tajā pašā direktorijā, kur atrodas parauga lapa v2.

 Atlasītās parauga lapas formatējumam ir jābūt v2. Lai izveidotu parauga lapu v2, lejupielādējiet ģenerēto parauga lapu no iekārtas izpildes iestatījumiem BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā vai rediģējiet parauga lapas v2 veidni, kas ir pieejama NextSeq 1000/2000 atbalsta lapā. Papildinformāciju par parauga lapas v2 formatējumu un prasībām skatiet sadaļā [Parauga lapas v2 iestatījumi 85. lpp.](#) Pārliecinieties, ka visi faili, uz kuriem ir atsauce parauga lapā, atrodas tajā pašā mapē, kurā atrodas parauga lapa.

6. Atlasiet **Review** (Pārskatīt).

7. **[Papildu]** Ievadiet pielāgota lasījumu praimera un pielāgota rādītāju praimera atrašanās vietas.

Informāciju par pielāgotu praimeru sagatavošanu un pievienošanu skatiet *NextSeq 1000 un 2000 pielāgoto praimeru rokasgrāmatā (dokuments Nr. 1000000139569)*. Noteikti apmeklējiet saderīgo izstrādājumu lapu, lai pārbaudītu, vai jūsu bibliotēku sagatavošanas komplektam nav nepieciešami Illumina pielāgotie praimerī.

8. **[Papildu]** Atlasiet pielāgotu recepti. Papildinformāciju skatiet sadaļā [Tumsas cikla sekvenēšana 98. lpp.](#)
Ja izmantojat NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras versiju v1.3 un Illumina Stranded Total RNA sagatavošanas komplektu ar Ribo-Zero Plus komplektu vai Illumina Stranded mRNA sagatavošanas komplektu, pielāgotā recepte tiek atlasīta automātiski.
9. **[Papildu]** Lai denaturētu un atšķaidītu bibliotēkas manuāli, noņemiet atlasi no izvēles rūtiņas **Denature and Dilute On Board** (Denaturēt un atšķaidīt iekārtā). Skatiet *NextSeq 1000 un 2000 bibliotēku denaturācijas un atšķaidīšanas rokasgrāmatu (dokuments Nr. 1000000139235)*. Noklusējuma atlase ir konfigurēta NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras iestatījumos.
10. **[Papildu]** Lai mainītu izvades mapi, atlasiet lauku Output Folder (Izvades mape) un ievadiet jaunu atrašanās vietu.
Lauks Output Folder (Izvades mape) tiek aizpildīts automātiski, izmantojot jūsu noklusējuma iestatījumus, un ir obligāts, ja vien nav atlasīta opcija Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana).
Ja atlasījāt Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana), opcija Save to BaseSpace Sequence Hub (Saglabāt BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā) tiek attēlota kā Enabled (Iespējota).
Ja atlasījāt Proactive and Run Monitoring (Proaktīvais atbalsts un izpildes uzraudzība), opcija Save to BaseSpace Sequence Hub (Saglabāt BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā) ir attēlota kā Disabled (Atspējota).
11. Pārskatiet cikla informāciju un pēc tam atlasiet **Prep** (Sagatavot).

Autonoma cikla inicializēšana

1. Konfigurējiet ciklu režīmu, kā aprakstīts sadaļā [Ciklu režīma konfigurēšana 20. lpp.](#)
2. Atlasiet **Start** (Sākt).
3. Ja atlasījāt opciju Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana) vai Proactive and Run Monitoring (Proaktīvais atbalsts un izpildes uzraudzība), ievadiet savus BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla akreditācijas datus un pēc tam atlasiet **Sign In** (Pieteikties).
4. Ja atlasījāt opciju Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana), atlasiet BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla darbgrupu, kurā saglabāt ciklu, un pēc tam atlasiet **Next** (Tālāk).
5. Atlasiet **Set Up New Run** (Iestatīt jaunu ciklu).
6. Laukā Run Name (Cikla nosaukums) ievadiet unikālu nosaukumu pēc jūsu izvēles, lai noteiktu pašreizējo ciklu.

Cikla nosaukums var saturēt burtus, ciparus, domuzīmes, defises un zemsvītras.

7. Lasījuma veidam atlasiet, cik daudz secīgu lasījumu ir jāveic:
 - **Viens lasījums**— veiciet vienu lasījumu, kas ir vienkāršāka un ātrāka opcija.
 - **Gala pāris**— veiciet divus lasījumus, kuru apvienojums rada augstākas kvalitātes datus un nodrošina precīzāku savietojumu.
8. Ievadiet ciklu skaitu, kas tiek veikti katrā lasījumā.
Rādītāju cikliem nav maksimālā skaita, bet lasījumu ciklu un rādītāju ciklu summai ir jābūt mazākai par skaitu, kas norādīts uz kasetnes etiķetes + 27.

Read 1 (1. lasījums) — ievadiet **1–151** ciklu.

Index 1 (1. rādītājs) — ievadiet 1. rādītāja (i7) praimera ciklu skaitu. Izpildei tikai ar PhiX ievadiet **0** abos rādītāju laukos.

Index 2 (2. rādītājs) — ievadiet 2. rādītāja (i5) praimera ciklu skaitu.

Read 2 (2. lasījums) — ievadiet vērtību līdz **151** ciklam. Šī vērtība parasti ir tāda pati kā 1. lasījuma vērtība.

9. Ja atlasījāt opciju Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana), atlasiet **Choose...** (Izvēlēties...), lai importētu parauga lapu.
NextSeq 1000/2000 vadības programmatūra v1.3 automātiski nosaka DRAGEN versiju, balstoties uz parauga lapu, un nepieciešamības gadījumā aicina pārslēgt versijas. Sistēmā ir jābūt instalētai DRAGEN versijai. Informāciju par instalēšanu skatiet sadaļā [Programmatūras atjauninājumi 73. lpp.](#)

i | Atlasītās parauga lapas formatējumam ir jābūt v2. Lai izveidotu parauga lapu v2, lejupielādējiet ģenerēto parauga lapu no iekārtas izpildes iestatījumiem BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā vai rediģējiet parauga lapas v2 veidni, kas ir pieejama NextSeq 1000/2000 atbalsta lapā. Papildinformāciju par parauga lapas v2 formatējumu un prasībām skatiet sadaļā [Parauga lapas v2 iestatījumi 85. lpp.](#) Pārliedzieties, ka visi faili, uz kuriem ir atsauce parauga lapā, atrodas tajā pašā mapē, kurā atrodas parauga lapa.

10. **[Papildu]** Ievadiet pielāgota lasījumu praimera un pielāgota rādītāju praimera atrašanās vietas. Informāciju par pielāgotu praimeru sagatavošanu un pievienošanu skatiet *NextSeq 1000 un 2000 pielāgotu praimeru rokasgrāmatā (dokuments Nr. 1000000139569)*. Noteikti apmeklējiet saderīgo izstrādājumu lapu, lai pārbaudītu, vai jūsu bibliotēku sagatavošanas komplektam nav nepieciešami Illumina pielāgotie praimeri.
11. **[Papildu]** Atlasiet pielāgotu recepti. Papildinformāciju skatiet sadaļā [Tumsas cikla sekvenēšana 98. lpp.](#)
12. **[Papildu]** Lai denaturētu un atšķaidītu bibliotēkas manuāli, noņemiet atlasī no izvēles rūtiņas **Denature and Dilute On Board** (Denaturēt un atšķaidīt iekārtā). Skatiet *NextSeq 1000 un 2000 bibliotēku denaturācijas un atšķaidīšanas rokasgrāmatu (dokuments Nr. 1000000139235)*. Noklusējuma atlase ir konfigurēta NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras iestatījumos.

13. **[Papildu]** Lai mainītu izvades mapi, atlasiet lauku Output Folder (Izvades mape) un ievadiet jaunu atrašanās vietu.

Lauks Output Folder (Izvades mape) tiek aizpildīts automātiski, izmantojot jūsu noklusējuma iestatījumus, un ir obligāts, ja vien nav atlasīta opcija Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana).

14. Atlasiet **Prep** (Sagatavot).

Paļīgmateriālu ievietošana iekārtā

1. Pirms plūsmas elementa (pelēkais izcilnis noņemts) un atšķaidītās bibliotēkas ievietošanas raugieties, lai kasetne būtu iepriekš atkausēta un samaisīta, apvēršot 10 reizes.
2. Atlasiet **Load** (Ievietot).
NextSeq 1000/2000 vadības programmatūra atver vizieri un izbīda paplāti.
3. Novietojiet kasetni uz paplātes ar etiķeti uz augšu un plūsmas elementu iekārtas iekšpusē. Bīdiēt kasetni, līdz tā nofiksējas vietā.



4. Atlasiet **Close** (Aizvērt), lai ievilktu kasetni un aizvērtu vizieri.
NextSeq 1000/2000 vadības programmatūra parāda skenēto paļīgmateriālu informāciju pēc ~3 minūtēm.
5. **[Papildu]** Atlasiet **Eject Cartridge** (Izbīdīt kasetni), lai izņemtu kasetni.
Vizieris atveras pēc 1 minūtes un izbīda kasetni.
6. Atlasiet **Sequence** (Sekvenēt).

Pirmsizpildes pārbaudes

Pirmsizpildes pārbaudes ir iekārtas pārbaude un pēc tam šķidrumu pārbaude. Šķidrumu pārbaudes laikā tiek pārdurtas kasetnes plombas, 3–4 reizes radot iekārtā paukšķošu skaņu. Tas ir normāli. Tagad reaģents tiek vadīts caur plūsmas elementu.



Pēc šķidrumu pārbaudes sākšanas paļīgmateriālus nevar lietot atkārtoti.

1. Uzgaidiet aptuveni 15 minūtes, līdz pirmsizpildes pārbaudes tiek pabeigtas. Pēc sekmīgas pārbaudžu izpildes cikls tiek sākts automātiski.
2. Ja iekārtas pārbaudes laikā rodas kļūda, atlasiet **Retry** (Mēģināt vēlreiz), lai pārbaudi veiktu atkārtoti. Pārbaudes laikā attiecīgās pārbaudes aplis tiek animēts.
3. Lai novērstu kļūdu atkārtotu rašanos, skatiet sadaļu [Kļūdas ziņojuma cēloņu novēršana 79. lpp.](#)

Cikla progressa uzraudzība

1. Uzraugiet cikla progresu un rādītājus, kad tie parādās sekvenēšanas ekrānā.
 - **Aptuvenais izpildes laiks** — aptuvenais cikla izpildes datums un laiks. Paredzamajai cikla pabeigšanas metrikai ir nepieciešami 10 iepriekšējie cikli, lai varētu aprēķināt precīzu cikla pabeigšanas laiku.
 - **Average %Q30** (Vidējais %Q30) — vidējais bāzu nosaukšanas procentuālais apjoms pie Q-score ≥ 30 .
 - **Projected Yield** (Plānotais kopējais ienesīgums) — paredzētais cikla bāzu nosaukšanas skaits.
 - **Total Reads PF** (Kopējā lasījumu PF) — sapārotu galu klasteru caurlaides filtru (miljonos) skaits.
 - **Real Time Demux** (Reāllaika demultipl.) — demultipleksēšanas statuss, inicializējot 2. lasījuma sākumā pēc 1. lasījuma, 1. rādītāja un 2. rādītāja ciklu pabeigšanas. Statuss tiks attēlots kā Complete (Pabeigts), pat ja rādītāju cikli nav izpildīti. Nav pieejams mākoņa režīma cikliem.
 - **Real Time Alignment** (Reāllaika izlīdzināšana) — 1. lasījuma izlīdzināšanas statuss, inicializējot 2. lasījuma sākumā pēc 1. lasījuma, 1. rādītāja un 2. rādītāja ciklu pabeigšanas. Nav pieejams mākoņa režīma cikliem.

Q30 un ienesīguma rādītāji parādās pēc 26. cikla (~6 stundas pēc izpildes sākšanas).
2. Lai kontrolētu ciklu procesus, atlasiet vadības programmatūras izvēlni un pēc tam atlasiet **Process Management** (Procesu pārvaldība).
3. Lai atceltu ciklu, atlasiet **End Run** (Beigt ciklu). Papildinformāciju par ciklu atcelšanu skatiet sadaļā [Cikla atcelšana 80. lpp.](#)
4. Izņemiet palīgmateriālus no iekārtas. Izņemiet kasetni no iekārtas 3 dienu laikā.

Palīgmateriālu noņemšana

1. Kad sekvenēšana ir pabeigta, atlasiet **Eject Cartridge** (Izbīdīt kasetni). Programmatūra izbīda izmantoto kasetni no iekārtas.
2. Izņemiet kasetni no paplātes.
3. Izņemiet plūsmas elementu no kasetnes.
4. Utilizējiet plūsmas elementu, kas satur elektroniskos komponentus, ievērojot jūsu reģionā piemērojamos standartus.

5. [Papildu] Izņemiet noteces aizbāzni, kas atrodas zem Illumina logotipa kasetnes pusē, virs piemērotas vietas (piemēram, izlietnes vai bīstamo šķidrumu atkritumu konteinera), vēršot aizbāzni horizontāli vai uz leju virzienā prom no jūsu sejas. Iztukšojiet izmantotos reaģentus, ievērojot jūsu reģionā piemērojamos standartus. Ja nav iespējota automātiskā reaģentu iztīrīšana, iztukšošanas laiks ir atkarīgs no kasetnes izmēra.

! Šajā reaģentu komplektā ir potenciāli bīstamas ķīmiskās vielas. Ieelpojot, norijot, saskaroties ar ādu un saskaroties ar acīm, iespējams gūt traumas. Valkājiet aizsardzības līdzekļus, tostarp acu aizsargus, cimdus un laboratorijas uzsvārci, kas atbilst ietekmes riskam. Apejieties ar lietotiem reaģentiem kā ar ķīmiskiem atkritumiem un atbrīvojieties no tiem saskaņā ar piemērojamiem reģionālajiem, valsts un vietējiem likumiem un noteikumiem. Papildinformāciju par vidi, veselību un drošību skatiet drošības datu lapā vietnē support.illumina.com/sds.html.

6. Utilizējiet reaģentu kasetni.
Šķidrumi tiek izvadīti kopā ar kasetni, tādēļ nav nepieciešama pēcapstrādes mazgāšana.
7. Atlasiet **Close Door** (Aizvērt durvis), lai atkārtoti ielādētu paplāti un atgrieztos sākuma ekrānā. Programmatūra automātiski ielādē paplāti, un sensori apstiprina, ka kasetne ir izņemta.

Kasetnes paplātes tīrīšana

Kasetnes paplāti ir nepieciešams tīrīt tikai tad, ja tajā ir izlijis reaģents.

1. Izņemiet kasetni no iekārtas.
2. Uzvelciet jaunus cimdus bez pūdera un jebkādu papildu aizsargapģērbu.
3. Uzsmidziniet 10% balinātāja šķīdumu uz drānas.
4. Izslaukiet kasetnes paplāti ar drānu un pēc tam tūlīt notīriet balinātāja šķīdumu ar izturīgu salveti. Ja balinātājs netiek nekavējoties notīrīts, uz kasetnes paplātes rodas traipi.
5. Izsmidziniet 70% etanola šķīdumu uz kasetnes paplātes un nekavējoties notīriet ar izturīgu salveti.
6. Nofiksējiet kasetnes paplāti atpakaļ ievietošanas pozīcijā.

Sekvenēšanas izvade

Šajā sadaļā ir aprakstīta reāllaika analīzes programmatūra, kas veic bāzu noteikšanu, piešķir kvalitātes rādītājus un izvada datus. Uzziniet par dažādiem izvades failu tiem un kur tos meklēt pēc cikla izpildes.

Reāllaika analīzes pārskats

NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmas darbina RTA3 nodrošinātu reāllaika analīzes programmatūru iekārtā esošajā Compute Engine (CE). RTA3 izgūst intensitātes no kameras nodrošinātajiem attēliem, veic bāzu noteikšanu, piešķir kvalitātes rādītāju nosauktām bāzēm, veic izlīdzināšanu ar PhiX un nodrošina datus InterOp failos skatīšanai iekārtas vadības programmatūrā.

Lai optimizētu apstrādes laiku, RTA3 glabā informāciju atmiņā. Ja RTA3 tiek apturēta, apstrāde netiek atsākta, un visi atmiņā apstrādātie ciklu dati tiek zaudēti.

RTA3 ievades dati

RTA3 apstrādei ir nepieciešami sektoru attēli, kas atrodas lokālajā sistēmas atmiņā. RTA3 saņem izpildes informāciju un komandas no vadības programmatūras.

RTA3 izvades

Katra krāsu kanāla attēli tiek vadīti atmiņā uz RTA3 kā sektori. No šiem attēliem RTA3 izvada kvalitatīvi iegūto bāzu nosaukšanas failu un filtru failu kopumu. Visas citas izvades atbalsta izvades failus.

Faila veids	Apraksts
Bāzu nosaukšanas faili	Katrs analizētais sektors tiek iekļauts apvienotā bāzu nosaukšanas (*.cbcl) failā. Sektori no vienas joslas un virsmas tiek apkopoti 1 *.cbcl failā katrai joslai un virsmai.
Filtrēšanas faili	Katrs sektors izveido filtra failu (*.filter), kurā ir norādīts, vai klasteris iziet filtrus.
Klasteru atrašanās vietu faili	Klasteru atrašanās vietu (*.locs) failos ir katra klastera X un Y koordinātas elementā. Katram ciklam tiek ģenerēts klastera atrašanās vietas fails.

Izvades faili tiek izmantoti lejupejošai analīzei DRAGEN un BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā.

Kļūdu novēršana

RTA3 izveido žurnālfailus un ieraksta tos mapē Logs. Kļūdas tiek ierakstītas teksta failā *.log faila formātā.

Apstrādes beigās uz izvades galamērķi tiek pārsūtīti tālāk norādītie žurnālfaili.

info_00000.log apkopo svarīgus cikla notikumus.

error_00000.log uzskaita kļūdas, kas radušās cikla laikā.

warning_00000.log uzskaita brīdinājumus, kas radušies cikla laikā.

Plūsmas elementa sektori

Sektori ir mazi attēlveidošanas apgabali plūsmas elementā. Kamera uzņem vienu attēlu katrā sektorā.

NextSeq 1000/2000 P2 plūsmas elementā kopumā ir 132 sektori. NextSeq 1000/2000 P3 plūsmas elementā kopumā ir 264 sektori.

5. tabula Plūsmas elementa sektori

Plūsmas šūnas komponents	NextSeq 1000/2000 P2 plūsmas elements	NextSeq 1000/2000 P3 plūsmas elements	Apraksts
Joslas	1	2	Joslas ir optiski atšķirīgi, bet šķidrumu ziņā neatdalīti kanāli.
Virsmas	2	2	P2 un P3 plūsmas elementu attēlveidošana notiek uz divām virsmām: augšējās un apakšējās. Vispirms notiek sektora augšējās virsmas attēlveidošana.
Strēles uz katru joslu	6	6	Strēle ir plūsmas elementa joslā esoša kolonna.
Sektori uz katru strēli	11	11	Sektors ir strēles daļa un atspoguļo attēloto daļu uz plūsmas elementa.
Kopējais ģenerēto sektoru skaits	132	264	Joslas × virsmas × strēles × sektori uz katru strēli ir sektoru kopējais skaits.

Sektoru nosaukumu piešķiršana

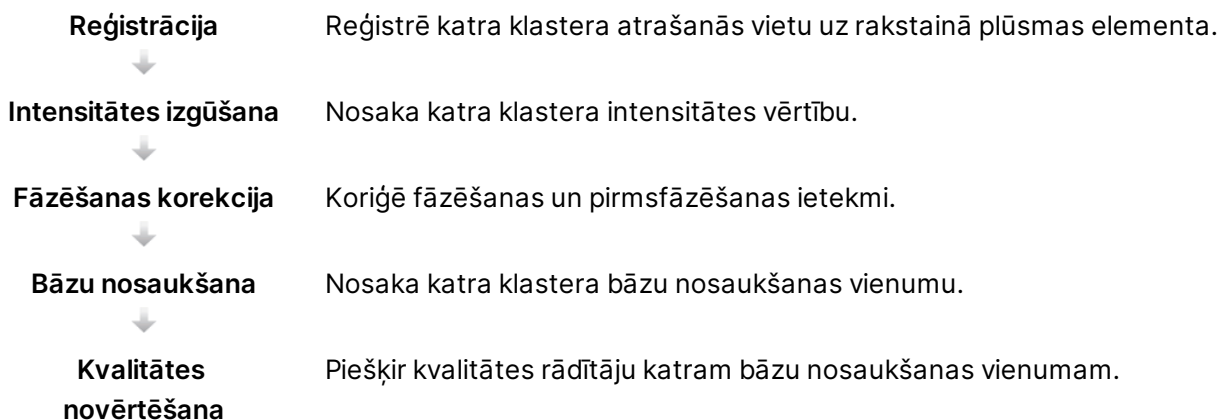
Sektora nosaukums ir četrciparu skaitlis, kas atspoguļo sektora pozīciju plūsmas elementā. Piemēram, sektora nosaukums 1205 norāda augšējo virsmu, 2. strēli, 05. sektoru.

Pirmais cipars norāda virsmu: 1 ir augšpuse, un 2 ir apakšpuse.

Otrais cipars norāda strēles numuru: 1., 2., 3., 4., 5. vai 6.

Pēdējie divi cipari norāda sektora numuru. 1.–4. strēlei numerācija sākas ar 01 plūsmas elementa izvades galā un turpinās līdz 11 ievades galā. 5.–6. strēlei numerācija sākas ar 01 ievades galā un turpinās līdz 11 izvades galā.

Reāllaika analīzes darbplūsma



Reģistrācija

Reģistrācija izlīdzina attēlu ar pagriezto nanoviļņu kvadrātveida masīvu uz rakstainā plūsmas elementa. Nanoviļņu secīgā izkārtojuma dēļ katra klastera X un Y koordinātes sektorā ir iepriekš noteiktas. Klasteru pozīcijas katram ciklam tiek ierakstītas klasteru atrašanās vietas (s.locs) failā.

Ja ciklā neizdodas reģistrēt nevienu cikla attēlu, attiecīgajā ciklā šim elementam netiek ģenerētas bāzu nosaukšanas. Izmantojiet sekvenēšanas analīzes skatītāju, lai identificētu, kurus attēlus neizdevās reģistrēt.

Intensitātes izgūšana

Pēc reģistrācijas intensitātes izgūšana aprēķina intensitātes vērtību katram nanovilnim konkrētajā attēlā. Ja reģistrācija ir nesekmīga, konkrētā sektora intensitāti nevar izgūt.

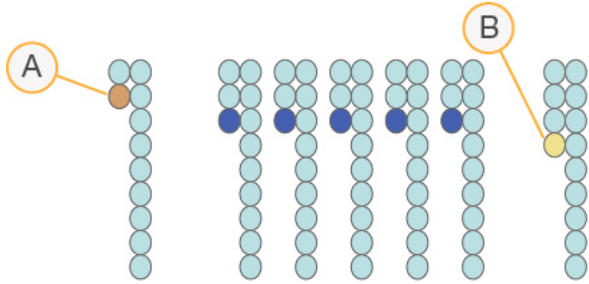
Fāzēšanas korekcija

Sekvenēšanas reakcijas laikā katra klasterī esošā DNS virkne katrā ciklā tiek paplašināta par vienu bāzi. Fāzēšana un pirmsfāzēšana notiek tad, kad virkne ar pašreizējo iekļaušanas ciklu nonāk ārpus fāzes.

Fāzēšana notiek, kad bāze atpaliek.

Pirmsfāzēšana tiek veikta, kad bāze ir soli priekšā.

5. attēls Fāzēšana un pirmsfāzēšana



- A. Lasījums ar bāzi, kam tiek veikta fāzēšana
- B. Lasījums ar bāzi, kam tiek veikta pirmsfāzēšana.

RTA3 labo fāzēšanas un pirmsfāzēšanas sekas, kas katrā ciklā visa cikla laikā maksimāli palielina datu kvalitāti.

Bāzu nosaukšana

Bāzu nosaukšanas funkcija nosaka bāzi (A, C, G vai T) katram noteikta sektora klasterim konkrētā ciklā. NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmās tiek izmantota divu kanālu sekvenēšana, kam nepieciešami tikai divi attēli, lai kodētu datus četrām DNS bāzēm, — viens no zaļā kanāla un otrs no zilā kanāla.

Ja nosaukšana nenotiek, tas tiek identificēts kā N. Nosaukšana neizdodas tad, ja klasteris neiziet cauri filtram, neizdodas reģistrācija vai klasteris ir izbīdīts no attēla.

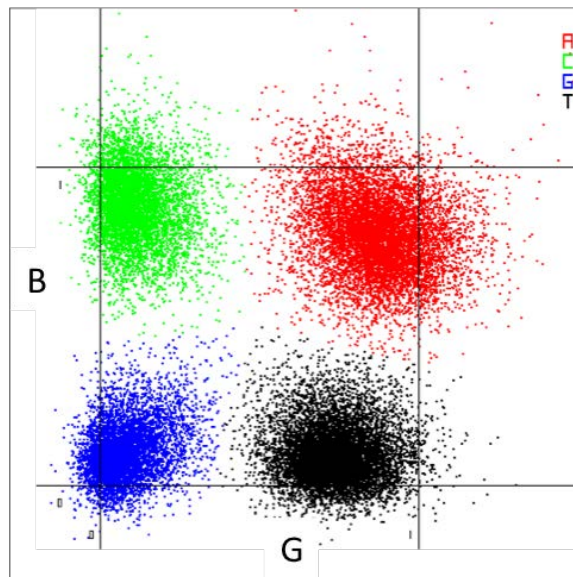
Katra klastera intensitāte tiek izgūta no zaļajiem un zilajiem attēliem un saīdināta ar pārējām, tādējādi iegūstot četras atšķirīgas populācijas. Katra populācija atbilst kādai bāzei. Bāzu nosaukšanas process nosaka, kurai populācijai pieder katrs klasteris.

6. tabula Bāzu nosaukšana divkanālu sekvenēšanā

Bāze	Zaļais kanāls	Zilais kanāls	Rezultāts
A	1 (ir)	1 (ir)	Klasteri, kas uzrāda intensitāti gan zaļajā, gan zilajā kanālā.
C	0 (nav)	1 (ir)	Klasteri, kas uzrāda intensitāti tikai zilajā kanālā.
G	0 (nav)	0 (nav)	Klasteri, kas neuzrāda intensitāti zināmā klastera atrašanās vietā.

Bāze	Zaļais kanāls	Zilais kanāls	Rezultāts
T	1 (ir)	0 (nav)	Klasteri, kas uzrāda intensitāti tikai zaļajā kanālā.

6. attēls Klasteru intensitātes vizualizēšana



i | Katra klastera krāsa korelē ar %Base diagrammām sekvenēšanas analīzes skatītājā (SAV) un BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla izpildes datiem atkarībā no cikla, un tai nav paredzēts korelēt ar zaļo un zilo kanālu.

Klasteru caurlaides filtrs

Cikla laikā RTA3 filtrē neapstrādātos datus, lai noņemtu lasījumus, kas neatbilst datu kvalitātes sliekšnim. Tiek noņemti klasteri, kas pārklājas, un zemas kvalitātes klasteri.

Sekvenēšanā ar diviem kanāliem RTA3 izmanto uz populāciju balstītu sistēmu, lai noteiktu bāzu nosaukšanas precizitāti (intensitātes tīrības mērījumu). Ja pirmo 25 ciklu laikā netiek noteikts vairāk par vienu bāzi, klasteru caurlaides filtra (PF) precizitāte ir zemāka par fiksēto sliekšni. 26. cikla laikā filtram cauri izgājušo klasteru elementu apakškopai tiek veikta PhiX salāgošana, ja tas ir iekļauts. Klasteriem, ko filtrs nelaiž cauri, bāzes netiek noteiktas, un tie netiek salāgoti.

Kvalitātes rādītāji

Kvalitātes rādītājs (Q-score) ir kļūdainas bāzu nosaukšanas iespējamības prognoze. Lielāks Q-score nozīmē, ka bāzu nosaukšanai ir augstāka kvalitāte un tā, visticamāk, ir pareiza. Pēc Q-score noteikšanas rezultāti tiek reģistrēti bāzu nosaukšanas (*.cbcl) failos.

Q-score ir vienkāršs veids, kā paziņot nelielu kļūdu varbūtību. Q-score tiek apzīmēts ar $Q(X)$, kur X apzīmē rezultātu. Nākamā tabula parāda saistību starp kvalitātes rādītāju un kļūdas varbūtību.

Kvalitātes rādītājs $Q(X)$	Kļūdas varbūtība
Q40	0,0001 (1 no 10 000)
Q30	0,001 (1 no 1000)
Q20	0,01 (1 no 100)
Q10	0,1 (1 no 10)

Kvalitātes novērtēšana un ziņošana

Kvalitātes novērtēšanas laikā tiek aprēķināta paredzamo vērtību kopa katrai bāzu nosaukšanas instancei un pēc tam paredzētās vērtības tiek izmantotas, lai meklētu kvalitātes rādītāju kvalitātes tabulā. Kvalitātes tabulas ir izveidotas, lai nodrošinātu optimāli precīzas kvalitātes prognozes cikliem, ko rada noteikta sekvenēšanas platformas konfigurācija un ķīmijas versija.

i | Kvalitātes novērtēšana balstās uz Phred algoritma modificēto versiju.

Lai ģenerētu kvalitātes tabulu NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmām, tika noteiktas trīs bāzu nosaukšanas grupas, balstoties uz šo specifisko prognozējošo īpašību sagrupēšanu klasteros. Balstoties uz šīm bāzu nosaukšanas grupām, empīriski tika aprēķināts vidējais kļūdas koeficients katrai no trim grupām, un atbilstošie kvalitātes rādītāji tika reģistrēti kvalitātes tabulā kopā ar prognozējošajām īpašībām, kas korelē ar attiecīgo grupu. RTA3 pēc būtības ir iespējami tikai trīs kvalitātes rādītāji, un tie atspoguļo grupas vidējo kļūdas koeficientu (*Vienkāršota kvalitātes rādītāju noteikšana ar RTA3 60. lpp.*). Kopumā tiek iegūti vienkāršoti, bet ļoti precīzi kvalitātes rādītāji. Trīs grupas kvalitātes tabulā atbilst marginālām (< Q15), vidējām (~Q20) un augstas kvalitātes (> Q30) bāzu nosaukšanas instancēm, un tām tiek attiecīgi piešķirti specifiskie rādītāji 12, 23 un 37. Turklāt katram nenosaukšanas gadījumam tiek piešķirts nenoteiktības rādītājs 2. Šis Q-score modelis samazina nepieciešamās atmiņas un joslas platuma prasības, neietekmējot precizitāti un veiktspēju.

7. attēls Vienkāršota kvalitātes rādītāju noteikšana ar RTA3



Sekvenēšanas izvades faili

Faila veids	Faila apraksts, atrašanās vieta un nosaukums
Apvienotie bāzu nosaukšanas faili	Katrs analizētais klasteris ir iekļauts apvienotā bāzu nosaukšanas failā, izveidojot vienu failu katram ciklam, joslai un virsmai. Kopsavilkuma fails satur apvienotu bāzu nosaukšanas un katra klastera kodēto kvalitātes rādītāju. Apvienotos bāzu nosaukšanas failus izmanto BaseSpace sekvenēšanas centrmezgls vai bcl2fastq2. Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, piemēram, L001_1.cbcl
Klasteru atrašanās vietu faili	Katram plūsmas elementam binārs klasteru atrašanās vietu fails satur klasteru XY koordinātes sektoros. Koordinātes ir iepriekš definētas, izmantojot sešstūra izkārtojumu, kas atbilst plūsmas elementa nanoviļņu izkārtojumam. Data/Intensities s_[lane].locs
Filtrēšanas faili	Filtrēšanas faili nosaka to, vai klasteri ir izlaisti cauri filtram. Filtrēšanas faili tiek izveidoti 26. cikla laikā, izmantojot 25 ciklu datus. Katram sektoram tiek izveidots viens filtrēšanas fails. Data/Intensities/BaseCalls/L001 s_[lane]_[tile].filter

Faila veids	Faila apraksts, atrašanās vieta un nosaukums
InterOp faili	Bināros pārskatu failus var skatīt iekārtā, izmantojot iekārtas vadības programmatūru, vai ārpus iekārtas SAV vai BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā. InterOp faili tiek atjaunināti visas izpildes garumā. InterOp mape
Cikla informācijas fails	Uzskaita izpildes nosaukumu, ciklu skaitu katrā lasījumā, vai lasījums ir rādītāja lasījums, un strēļu un sektoru skaitu plūsmas elementā. Izpildes informācijas fails tiek izveidots izpildes sākumā. [Saknes direktorijs], RunInfo.xml

DRAGEN sekundārās analīzes izvades faili

DRAGEN Bio-IT platforma papildus analīzē sekvenēšanas izvadi iekārtā, izmantojot vienu no tālāk nosauktajiem analīzes informācijas avotiem.

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

Šajā sadaļā ir sniegta informācija par katru DRAGEN informācijas avotu, tostarp izvades failu informācija. Papildus katram informācijas avotam specifisku failu ģenerēšanai DRAGEN nodrošina analīzes rādītājus `<sample_name>.metrics.json` failā un pārskatus, kas aprakstīti sadaļā [DRAGEN BCL Convert informācijas avots 66. lpp.](#) Papildinformāciju par DRAGEN skatiet [DRAGEN Bio-IT platformas atbalsta vietnes lapā](#).

Visi DRAGEN informācijas avoti atbalsta ievades BCL atspiešanu un izvades BAM/CRAM failu saspiešanu.

Izvades failu apsvērumi:

- Germline, RNA, Enrichment un DNA Amplicon informācijas avotiem, kas darbina analīzi iekārtā, BAM faili netiek augšupielādēti BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā, ja ir atlasīta opcija Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktīvais atbalsts, izpildes uzraudzība un glabāšana).

DRAGEN Enrichment informācijas avots

DRAGEN Enrichment informācijas avots atbalsta tālāk norādītās funkcijas. Ja izmantojat DRAGEN 3.7 vai jaunāku versiju, tiek atbalstīts gan dzimumšūnas līnijas, gan somatiskais (tikai audzēju) režīms.

- Paraugu demultipleksēšana
- Kartēšana un izlīdzināšana, ieskaitot kārtošanu un dublikātu atzīmēšanu

- Nelielu variantu noteikšana
- Strukturālo variantu noteikšana

Lai veiktu variantu noteikšanu, ir nepieciešams *.bed fails, kas jāiekļauj parauga lapā vai jānorāda iekārtas izpildes iestatījumos BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā. Strukturālo variantu noteikšana tiek ģenerēta tikai sapāroto galu lasījumiem un dzimumšūnas līnijas režīmam.

Ja tiek izmantota DRAGEN Enrichment versija 3.8 vai jaunāka, jūs varat importēt trokšņu bāzlīnijas failu, lai uzlabotu somatiskā režīma veiktspēju. Skatiet sadaļu [Trokšņu bāzlīnijas failu importēšana 18. lpp.](#)

Informācijas avots ģenerē tālāk uzskaitītos izvades failus.

Sastāvdaļa	Veids	Izvades faila nosaukums
Kartēšana/izlīdzināšana	BAM vai CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam vai • <sample_name>.cram
Nelielu variantu noteikšana	VCF un gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz
Strukturālo variantu noteikšana	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.sv.vcf.gz

* gVCF izvades faili ir pieejami tikai dzimumšūnas līnijas režīmam.

DRAGEN Germline informācijas avots

DRAGEN Germline informācijas avots atbalsta tālāk norādītās funkcijas.

- Paraugu demultipleksēšana
- Kartēšana un izlīdzināšana, ieskaitot kārtošanu un dublikātu atzīmēšanu
- Nelielu variantu noteikšana
- Strukturālo variantu noteikšana sapāroto galu lasījumiem
- Kopiju skaita variantu noteikšana cilvēka genomam
- Atkārtojumu paplašinājumi cilvēka genomam
- Homozigoti reģioni cilvēka genomam
- **[DRAGEN v3.8 vai jaunāka versija]** CYP2D6 noteikšana

Strukturālo variantu noteikšana tiek ģenerēta tikai sapāroto galu lasījumiem.

Informācijas avots ģenerē tālāk uzskaitītos izvades failus.

Sastāvdaļa	Veids	Izvades faila nosaukums
Kartēšana/izlīdzināšana	BAM vai CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam vai • <sample_name>.cram
Nelielu variantu noteikšana	VCF un gVCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz
Strukturālo variantu noteicējs	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.sv.vcf.gz
Kopiju skaita varianti	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.cnv.vcf.gz
Atkārtojumu paplašinājums	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.repeats.vcf.gz
Homozigoti reģioni	CSV un BED	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.roh_metrics.csv • <sample_name>.roh.bed
CYP2D6 noteikšana	TSV	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.cyp2d6.tsv

DRAGEN DNA Amplicon informācijas avots

DRAGEN informācijas avots atbalsta tālāk norādītās funkcijas.

- Paraugu demultipleksēšana
- Kartēšana un izlīdzināšana, ieskaitot kārtošanu un dublikātu atzīmēšanu
- Nelielu variantu noteikšana dzimumšūnas līnijas vai somatiskajā režīmā.

Lai veiktu variantu noteikšanu, ir nepieciešams *.bed fails, kas jāiekļauj parauga lapā vai jānorāda iekārtas izpildes iestatījumos BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā.

Informācijas avots ģenerē tālāk uzskaitītos izvades failus.

Sastāvdaļa	Veids	Izvades faila nosaukums
Kartēšana/izlīdzināšana	BAM vai CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam vai • <sample_name>.cram
Nelielu variantu noteikšana	VCF un gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz

* gVCF izvades faili ir pieejami tikai dzimumšūnas līnijas režīmā.

DRAGEN RNA informācijas avots

DRAGEN RNA informācijas avots atbalsta tālāk norādītās funkcijas.

- Paraugu demultipleksēšana
- Kartēšana un izlīdzināšana, ieskaitot kārtošanu un dublikātu atzīmēšanu
- Gēnu saplūšanas noteikšana

- Transkripciju kvantifikācija
- [DRAGEN v3.8 vai jaunāka versija] Diferenciālā gēnu izteiksme

Lai ģenerētu izvades failus, norādiet GTF failu parauga lapā vai pārlicinieties, ka kopā ar atsauces genomu pastāv noklusējuma fails `genes.gtf.gz`.

Informācijas avots ģenerē tālāk uzskaitītos izvades failus.

Sastāvdaļa	Veids	Izvades faila nosaukums	Apraksts
Kartēšana/izlīdzināšana	BAM vai CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <code><sample_name>.bam</code> vai • <code><sample_name>.cram</code> 	Izlīdzinājuma izvide, kas atbilst SAM specifikācijām.
Gēnu saplūšanas noteikšana	Vienkāršs teksts	<ul style="list-style-type: none"> • <code><sample_name>.fusion_candidates.preliminary</code> • <code><sample_name>.fusion_candidates.final</code> 	<ul style="list-style-type: none"> • Saplūšanas kandidāti pirms filtru lietošanas. • Saplūšanas kandidāti pēc filtru lietošanas.
Transkripciju kvantifikācija	Vienkāršs teksts	<ul style="list-style-type: none"> • <code>sample_name.quant.genes.sf</code> • <code>sample_name.quant.sf</code> 	<ul style="list-style-type: none"> • Transkripciju kvantifikācijas rezultāti gēnu līmenī. • Visi transkripciju kvantifikācijas rezultāti.
Diferenciālā izteiksme	PNG	Skatiet tālāk redzamo diferenciālo izteiksmju izvades failu tabulu.	Lai ģenerētu izvades failus, paraugu lapā ir jāiestata saīdinājums.

Tālāk uzskaitītie faili ir izvades faili, kad ir iespējota diferenciālā izteiksme.

Faila nosaukums	Apraksts
<code>Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv</code>	Satur diferenciālo izteiksmju analīzes rādītājus.
<code>Control_vs_Comparison.genes.counts.csv</code>	Norāda, cik lasījumu kartēts katram gēnam katrā paraugā kontroles un saīdināšanas grupās.

Faila nosaukums	Apraksts
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Izteiksmju intensitātes karte ar diferenciāli izteiktajiem gēniem no paraugiem kontroles un salīdzināšanas grupās. Intensitātes kartē ir redzami tikai diferenciāli izteikti gēni ar koriģētu P vērtību $< 0,05$. Ja ir vairāk nekā 30 diferenciāli izteiktu gēnu, tiek izmantoti tikai pirmie 30 diferenciāli izteikti gēni. Ja DESeq1 nesavienojas vai ja nav diferenciāli izteiktu gēnu, fails netiek ģenerēts.
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Satur gēnu izteiksmes koeficientu variāciju kā vidējās signāla intensitātes funkciju. Lai parādītu atšķirības starp mērījumiem, kas veikti diviem paraugiem, diagramma transformē datus M (logaritmiskais koeficients) un A (vidējais) skalās un pēc tam parāda vērtības. MA diagramma parāda \log_2 kārtu izmaiņas, kas attiecināmas uz noteiktu mainīgo visu paraugu normalizēto skaitu vidējās vērtības ietvaros. Ja koriģētā P vērtība ir mazāka nekā 0,1, punkti ir sarkanā krāsā. Punkti, kas neietilpst logā, tiek attēloti diagrammā kā atvērti trijstūri. Augšupvērsti trijstūri atspoguļo pozitīvas logaritmisko kārtu izmaiņas. Lejupvērsti trijstūri atspoguļo negatīvas logaritmisko kārtu izmaiņas.
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	Diagrammā ir parādīti pirmie divi galvenie komponenti, kas izskaidro lielāko daļu dispersijas.
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Satur DESeq2 rezultātus, kas apraksta vidējo izteiksmi, \log_2 (kārtu izmaiņas), \log_2 standarta kļūdu, P vērtību, koriģēto P vērtību un katra gēna izteiksmes statusu.
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Satur regularizētus logaritmiski transformētus skaitus, ko aprēķina DESeq2.

DRAGEN Single Cell RNA informācijas avots

DRAGEN atbalsta tālāk norādītās funkcijas.

- Paraugu demultipleksēšana
- Kartēšana un izlīdzināšana, ieskaitot kārtošanu un dublikātu atzīmēšanu
- Šūnu un gēnu klasifikācija

Lai ģenerētu izvades failus, norādiet GTF failu parauga lapā vai pārlicinieties, ka kopā ar atsauces genomu pastāv noklusējuma fails `genes.gtf.gz`.

Informācijas avots ģenerē tālāk uzskaitītos izvades failus.

Sastāvdaļa	Veids	Izvades faila nosaukums
Kartēšana/izlīdzināšana	BAM vai CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <code><sample_name>.bam</code> vai • <code><sample_name>.cram</code>
Šūnu/gēnu klasifikācija	TSV, CSV un MTX	<ul style="list-style-type: none"> • <code><sample_name>.scRNA.barcodeSummary.tsv</code> • <code><sample_name>.scRNA.genes.tsv</code> • <code><sample_name>.scRNA.matrix.mtx</code>
Analīzes pārskati	HTML	<code><sample_name>.dragen.scrna-report.*.html</code>

DRAGEN BCL Convert informācijas avots

DRAGEN BCL Convert informācijas avots izmanto BCL datus, kas ģenerēti sekvenēšanas izpildes laikā, un parauga lapas informāciju, lai ģenerētu FASTQ failu katram paraugam. FASTQ faila nosaukums ir `<sample_name>.fastq.gz`.

Informācijas avots ģenerē tālāk uzskaitītos pārskatus.

Sastāvdaļa	Veids	Izvades faila nosaukums
Demultipleksēšana	CSV	• <code>Demultiplex_Stats.csv</code>
Adaptera rādītāji	CSV	• <code>Adapter_Metrics.csv</code>
Rādītāju lēkums	CSV	• <code>Index_Hopping_Counts.csv</code>
Galvenie nezināmie svītrkodi	CSV	• <code>Top_Unknown_Barcodes.csv</code>

Demultipleksēšanas statistikas pārskats

Demultipleksēšanas statistikas pārskats parāda, cik caurlaides filtra lasījumu ir piešķirts katram paraugam parauga lapā. Visi lasījumi, kas nav skaidri saistīti ar kādu paraugu, tiek klasificēti kā nenoteikti. Pārskatā ir arī iekļauta informācija par bāzu kvalitātes rādītājiem caurlaides filtra (passing filter — PF) lasījumos, kas piešķirti katram paraugam.

Tajā ir ietverta tālāk norādītā informācija.

Rādītāji	Apraksts
Lane	Tā plūsmas elementa josla, kurā tika sekvenēts paraugs.

Rādītāji	Apraksts
SampleID	Parauga ID no parauga lapas. Ja lasījums neatbilst nevienam paraugam, laukā redzams <code>undetermined</code> (nav noteikts).
Index	1. rādītāja lasījuma un 2. rādītāja lasījuma savienojums parauga lapā, kas atdalīts ar defisi. Ja lasījums neatbilst nevienam paraugam, laukā redzams <code>undetermined</code> (nav noteikts).
# Reads	Demultipleksēto PF lasījumu skaits paraugam norādītajā joslā.
# Perfect Index Reads	To lasījumu skaits, kam ir perfekta atbilstība ar kombinētajām rādītāju sekvencēm, kuras norādītas parauga lapā.
# One Mismatch Index Reads	To lasījumu skaits, kam ir viena kļūda kombinētajās rādītāju sekvencēs, kuras norādītas parauga lapā.
# of ≥ Q30 Bases (PF)	Bāzu skaits, ieskaitot adapterus, kas atbilst lasījumiem, kuri pārsniedz Q30 kvalitātes sliekšni.
Mean Quality Score (PF)	Vidējais kvalitātes rādītājs lasījumiem, kas atbilst paraugam norādītajā joslā. Vērtība ietver adapteru bāzes.

Adapteru rādītāju pārskati

Adapteru rādītāju fails satur vairākas adapteru un paraugu bāzes, kas saistītas ar katru lasījumu. Tajā ir ietverta tālāk norādītā informācija.

Rādītāji	Apraksts
Lane	Tā plūsmas elementa josla, kurā tika sekvenēts paraugs.
Sample_ID	Parauga ID no parauga lapas. Ja lasījums neatbilst nevienam paraugam, laukā redzams <code>undetermined</code> (nav noteikts).
index	Sekvence <code>index1</code> no parauga lapas. Lauks ir tukšs, ja <code>index</code> nav norādīts parauga lapā vai ja parauga ID vērtība ir <code>undetermined</code> (nav noteikts).
index2	Sekvence <code>index2</code> no parauga lapas. Lauks ir tukšs, ja <code>index2</code> nav norādīts parauga lapā vai ja parauga ID vērtība ir <code>undetermined</code> (nav noteikts).
R1_AdapterBases	Bāzu skaits, kas atbilst AdapterRead1 parauga lapā.
R1_SampleBases	Saīsināto vai maskēto bāzu skaits no atbilstošās joslas un parauga 1. lasījuma.
R2_AdapterBases	Bāzu skaits, kas atbilst AdapterRead2 parauga lapā.

Rādītāji	Apraksts
R2_ SampleBases	Saīsināto vai maskēto bāzu skaits no atbilstošās joslas un parauga 2. lasījuma.
# Reads	Parauga lasījumu skaits norādītajā joslā.

Rādītāju lēkumu skaita pārskats

Rādītāju lēkumu skaita pārskats satur katra paredzētā un pārlēkušā rādītāja lasījumu skaitu no divkāršās indeksēšanas cikliem. Pārskats satur tikai unikālus divkāršos rādītājus no katras joslas, kur nevienam rādītājam nav konstatēta svītrkodu sadursme. Lai ģenerētu joslas rādītāju lēkuma metriku, katram ierakstu pārim katrā rādītājā ir jābūt ar Heminga attālumu vismaz $2N + 1$, kur N ir rādītājam noteiktā svītrkodu neatbilstības pielaide.

Tajā ir ietverta tālāk norādītā informācija.

Neindeksētiem cikliem, vienkāršās indeksācijas cikliem vai unikālus divkāršos rādītājus nesaturošām joslām fails satur tikai galvenes.

Rādītāji	Apraksts
Lane	Tā plūsmas elementa josla, kurā tika sekvenēts paraugs.
# Reads	Parauga lasījumu skaits norādītajā joslā.
SampleID	Parauga ID no parauga lapas. Ja lasījums neatbilst nevienam paraugam, laukā redzams <code>undetermined</code> (nav noteikts).
index	Sekvence <code>index1</code> no parauga lapas. Lauks ir tukšs, ja lasījums ir ar atsevišķiem galiem vai ja parauga ID vērtība ir <code>undetermined</code> (nav noteikts).
index2	Sekvence <code>index2</code> no parauga lapas. Lauks ir tukšs, ja lasījums ir ar atsevišķiem galiem vai ja parauga ID vērtība ir <code>undetermined</code> (nav noteikts).

Galveno nezināmo svītrkodu pārskats

Galveno nezināmo svītrkodu pārskats satur pirmos 100 rādītājus vai rādītāju pārus no katras joslas, kas parauga lapā netika identificēti atbilstoši atļauto nesakritību skaitam. Ja kā 100. augstākais rādītāju skaita ieraksts ir norādītas vairākas rādītāju vērtības, visas rādītāju vērtības ar šo skaitu izvadē tiek uzrādītas kā 100. ieraksts.

Tajā ir ietverta tālāk norādītā informācija.

Rādītāji	Apraksts
Lane	Tā plūsmas elementa josla, kurā tika sekvenēts paraugs.

Rādītāji	Apraksts
index	Katra nezināmā rādītāja sekvenca 1. rādītāja lasījumā. Ja nav atrasts neviens nezināms rādītājs, lauks ir tukšs.
index2	Katra nezināmā rādītāja sekvenca 2. rādītāja lasījumā. Ja ciklam bija viens lasījums vai ja netika atrasts neviens nezināms rādītājs, lauks ir tukšs.
# Reads	Parauga lasījumu skaits norādītajā joslā.

Illumina DRAGEN QC pārskati

Visu informācijas avotu gadījumā DRAGEN FastQC ģenerē QC diagrammas pēc noklusējuma. Apkopotie QC rezultāti tiek glabāti mapē `AggregatedFastqcMetrics`, un katra parauga rezultāti tiek glabāti mapē `<sample_name>`.

QC pārskati netiek ģenerēti, ja paraugu skaits pārsniedz 512.

Ir pieejamas tālāk norādītās QC diagrammas.

QC diagramma	Apraksts
adapter_content	Sekvenču procentuālais daudzums katram bāzu pārim.
positional_mean_quality	Vidējais Phred skalas bāzu kvalitātes rādītājs katrā lasīšanas pozīcijā.
gc_content	GC saturs procentos katram sekvenēšanas lasījumam.
positional_quality.read_1	Vidējā Phred skalas kvalitātes vērtība bāzēm ar specifisku nukleotīdu un noteiktā atrašanās vietā 1. lasījumā.
gc_quality	
positional_quality.read_2	Vidējā Phred skalas kvalitātes vērtība bāzēm ar specifisku nukleotīdu un noteiktā atrašanās vietā 2. lasījumā.
n_content	
read_length	Katra lasījuma sekvenču garums.
positional_base_content.read_1	Katra specifiskā nukleotīda bāzu skaits noteiktās atrašanās vietās 1. lasījumā.
read_quality	Vidējais Phred skalas kvalitātes rādītājs katram sekvenēšanas lasījumam.
positional_base_content.read_2	Katra specifiskā nukleotīda bāzu skaits noteiktās atrašanās vietās 2. lasījumā.

DRAGEN sekundārās analīzes izvades mapes struktūra

Pēc noklusējuma DRAGEN ģenerē izvades failus izvades mapē, kas atlasīta cilnē Settings (Iestatījumi). Katrai darbplūsmai DRAGEN izveido kopsavilkuma pārskatu `report.html` failā.

📁 Data

📄 `report.html`

📄 `report_files`

📁 AggregateFastQCPlots

📄 `*.png`

📄 `*stderr_.txt`

📄 `*stdout_.txt`

📄 `dragen_prev_48_hrs.log`

📄 `dln_prev_48_hrs.log`

📄 `SampleSheet.csv`

📄 Izpildes ievades faili (epiem., BED, GTF faili)

📁 sample_name

📁 enrich_caller , germline_seq, dna_amplicon_seq, rna_seq un scrna_seq

📁 sample_name

📄 `*.png`

📄 `dragen_*.log`

📄 `sample_name.*.metrics.csv`

📄 **[DNA]** `sample_name.*.vcf.gz`

📄 **[DNA]** `sample_name.*.gvcf.gz` — nav pieejams DRAGEN Bio-IT platformas Amplicon (somatiskajam) informācijas avotam.

📄 `sample_name.*.bam` vai `sample_name.*.cram`

📄 `Logs`

📄 **[RNA]** `sample_name.fusion_candidates.filter_info`

📄 **[RNA]** `sample_name.fusion_candidates.final`

📄 **[RNA]** `sample_name.quant.genes.sf`

📄 **[RNA]** `sample_name.quant.sf`

📄 `sample_name.metrics.json`

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

📁 [RNA] DifferentialExpression

📁 Comparison1

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

📁 ComparisonN

📁 logs

- 📄 *.txt
- 📄 *.csv

📁 **fastq** — pieejama tikai tad, ja KeepFastq iestatījums ir true.

- 📄 *.fastq.gz

📁 **ora_fastq** — pieejama tikai tad, ja FastqCompressionFormat iestatījums ir dragen.

- 📄 *.fastq.ora

📁 RunInstrumentAnalyticsMetrics

📁 0001

- 📄 dataset.json
- 📄 fastqc_metrics.csv

📁 0002

- 📄 dataset.json

fastqc_metrics.csv

Adapter_Metrics.csv

Demultiplex_Stats.csv

Index_Hopping_Counts.csv

Reports

Demultiplex_Stats.csv

RunInfo.xml

Trim_Metrics.csv

fastq_list.csv

SampleSheet.csv

Index_Hopping_Counts.csv

Top_Unknown_Barcodes.csv

Read1InstrumentAnalyticsMetrics — tikai sapārotu galu lasījumiem.

0001

dataset.json

0002

dataset.json

Adapter_Metrics.csv

Demultiplex_Stats.csv

Index_Hopping_Counts.csv

Read1Metrics — tikai sapārotu galu lasījumiem.

Adapter_Metrics.csv


Index_Hopping_Counts.csv

Apkope

Šajā sadaļā ir aprakstītas procedūras, kas nepieciešamas, lai saglabātu sistēmas darbību. Uzziniet, kā instalēt programmatūras atjauninājumus, nomainīt gaisa filtru un veikt citas periodiskās apkopes procedūras. Regulāri atjauninot vadības programmatūru, jūs nodrošināt, ka sistēmā tiek instalēti jaunākie kļūdu labojumi un līdzekļi optimālai veikspējai.

Vietas atbrīvošana cietajā diskā

Sekvenēšanas izpildei ir vajadzīgs aptuveni 200 GB lokālā cietā diska vietas. Ja atlicis maz vietas, tiek parādīts brīdinājums. Lai atbrīvotu vietu un dzēstu pabeigtos ciklus un instalētos atsauces genomus no pagaidu cikla mapes, veiciet tālāk norādītās darbības.

 Dzēsiet ciklus, izmantojot tikai NextSeq 1000/2000 vadības programmatūru, nevis manuāli operētājsistēmā. Dzēšot ciklus manuāli, var tikt negatīvi ietekmēta vadības programmatūra.

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Disk Management** (Diska pārvaldība).
Tiek parādīts ekrāns Disk Management (Diska pārvaldība), kurā redzams saraksts ar cietajā diskā saglabātajiem cikliem un atsauces genomiem.
2. Lai dzēstu kādu ciklu, atlasiet **Delete** (Dzēst).
Izdzēšot ciklu, tiek dzēsta vietējā cikla mape. Izvades mape, kas ir cikla mapes kopija, tiek saglabāta.
3. Dialoglodziņā atlasiet **Yes, Delete Run** (Jā, dzēst ciklu), lai apstiprinātu cikla dzēšanu.
4. Atkārtojiet 2. un 3. darbību katram ciklam, ko vēlaties izdzēst.
5. Lai dzēstu kādu genomu, atlasiet **Delete Genome** (Dzēst genomu).
6. Dialoglodziņā atlasiet **Yes, Delete Genome** (Jā, dzēst genomu).
7. Atkārtojiet 5. un 6. darbību katram genomam, ko vēlaties izdzēst.
8. Kad tas ir paveikts, aizveriet ekrānu Disk Management (Diska pārvaldība), lai atgrieztos sākuma ekrānā.

Programmatūras atjauninājumi

Programmatūras atjaunināšana nodrošina, ka jūsu sistēmā ir jaunākās funkcijas un labojumi. Programmatūras atjauninājumi ir iekļauti sistēmas komplektā, kurā ietilpst šāda programmatūra:

- NextSeq 1000/2000 vadības programmatūra
- NextSeq 1000/2000 receptes
- Universal Copy Service pakalpojums

- Reāllaika analīze

i | DRAGEN moduļi sistēmas komplektā nav iekļauti. Instalējiet tos atsevišķi atkarībā no nepieciešamības. Pieklūstiet DRAGEN moduļu programmatūrai no atbalsta lapām.

Sistēma ir konfigurēta programmatūras atjauninājumu lejupielādēšanai automātiski vai manuāli:

- **Automatic updates** (Automātiska atjaunināšana) — atjauninājumi tiek automātiski lejupielādēti no BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla, lai pēc tam tos varētu instalēt. Lai izmantotu šo opciju, nepieciešams interneta pieslēgums, taču nav nepieciešams BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla konts.
- **Manual updates** (Manuāli atjauninājumi) — atjauninājumi tiek manuāli lejupielādēti no tīmekļa, tad saglabāti lokāli vai portatīvajā diskā un tad instalēti no vietas, kur iepriekš saglabāti. Šai opcijai nav nepieciešams interneta pieslēgums iekārtā.

Automātiska programmatūras atjauninājumu instalēšana

1. Pārlicinieties, ka iekārtā nenotiek sekvenēšanas izpildes vai sekundārā analīze.
2. Piesakieties kontā ilmnadmin.
3. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Software Update** (Programmatūras atjauninājums). Kad ir pieejams programmatūras atjauninājums, sistēmās, kas konfigurētas automātiskajiem atjauninājumiem, tiek parādīts brīdinājuma ziņojums.
4. Lai pārbaudītu, vai nav atjauninājumu, atlasiet **Check Online for Software Update** (Meklēt programmatūras atjauninājumus tiešsaistē).
5. Atlasiet **Update Now** (Atjaunināt tūlīt), lai lejupielādētu jauno programmatūras versiju. Kad lejupielāde ir pabeigta, vadības programmatūra tiek aizvērta, un parādās instalēšanas vednis. Vadības programmatūra restartējas automātiski. Pēc restartēšanas visi programmaparatūras atjauninājumi tiks instalēti automātiski.

i | Pēc instalēšanas sākšanas atjauninājumu vairs nevar atcelt. Atjauninājumus var atcelt tikai lejupielādēšanas laikā.

Manuāla programmatūras atjauninājumu instalēšana

1. Piesakieties kontā ilmnadmin.
2. Pārlicinieties, ka iekārtā nenotiek sekvenēšanas izpildes vai sekundārā analīze.
3. Kad ir pieejams programmatūras atjauninājums, lejupielādējiet komplekta instalēšanas programmu (*.tar.gz), kas pieejama [NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmas atbalsta lapā](#). Saglabājiet instalēšanas programmu lokālajā vai portatīvajā diskā.
4. Ja jūs saglabājat instalēšanas programmu portatīvajā diskā, pievienojiet disku USB 3.0 pieslēgvietai, kas atrodas gan iekārtas sānā, gan aizmugurē.
5. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Software Update** (Programmatūras atjauninājums).

6. Atlasiet **Choose...** (Izvēlēties...), lai pārietu uz instalēšanas programmu.
7. Atlasiet **Update Now** (Atjaunināt tūlīt), lai sāktu instalēšanu.
Instalēšanas laikā vadības programmatūrā tiek attēlots aizņemības indikators.
Vadības programmatūra restartējas automātiski. Pēc restartēšanas visi programmaparatūras atjauninājumi tiks instalēti automātiski.



Pēc instalēšanas sākšanas atjauninājumu vairs nevar atcelt. Atjauninājumus var atcelt tikai lejupielādēšanas laikā.

DRAGEN darbplūsmas un licences atjauninājumi

DRAGEN darbplūsmu instalēšanu un DRAGEN licences atjaunošanu var veikt tikai sistēmas administratori.

DRAGEN licences atjaunošana tiešsaistē

Ja NextSeq 1000/2000 sistēma ir savienota ar internetu, atjauniniet DRAGEN Bio-IT platformas licenci tālāk norādītajā veidā.

1. Sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu, lai saņemtu jaunu licences atslēgu.
2. Uzgaidiet 24 stundas, līdz licence atjauninās automātiski, vai atjauniniet licenci uzreiz tālāk norādītajā veidā.
 - a. Atlasiet vadības programmatūru un pēc tam atlasiet **DRAGEN**.
 - b. Atlasiet **Check Online** (Pārbaudīt tiešsaistē), lai pārbaudītu, vai ir pieejama jauna DRAGEN licences atslēga.
 - c. Ja tā ir pieejama, atlasiet **Update** (Atjaunināt).

DRAGEN licences atjaunošana bezsaistē

Ja NextSeq 1000/2000 sistēma nav savienota ar internetu, atjauniniet DRAGEN Bio-IT platformas licenci tālāk norādītajā veidā.

1. Sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu, lai saņemtu jaunu licences atslēgu. Saglabājiet `license.zip` failu lokālajā vai portatīvajā diskā.
2. Ja jūs saglabājat *.zip failu portatīvajā diskā, pievienojiet disku USB 3.0 pieslēgvietai, kas atrodas gan iekārtas sānā, gan aizmugurē. Ja vajadzīgs, uzmanīgi pārvietojiet iekārtu, lai piekļūtu tās aizmugurei.
3. Atlasiet vadības programmatūru un pēc tam atlasiet **DRAGEN**.
4. Atlasiet **Choose** (Izvēlēties), lai pārietu uz *.zip failu, un pēc tam atlasiet **Open** (Atvērt).

DRAGEN darbplūsmu instalēšana tiešsaistē

Ja NextSeq 1000/2000 sistēma ir savienota ar internetu, varat instalēt DRAGEN darbplūsmas tieši NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrā. DRAGEN darbplūsmu instalēšana tiešsaistē ir pieejama tikai NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras versijā v1.3.

1. Atlasiet vadības programmatūru un pēc tam atlasiet **Process Management** (Procesu pārvaldība).
2. Pārliedzieties, ka iekārtā nenotiek sekvenēšanas izpildes vai sekundārā analīze.
3. Atlasiet vadības programmatūru un pēc tam atlasiet **DRAGEN**.
Sadaļas Version (Versija) sadaļā Available Workflows (Pieejamās darbplūsmas) ir uzskaitītas pašlaik sistēmā instalētās darbplūsmas.
4. Lai instalētu DRAGEN darbplūsmas NextSeq 1000/2000 vadības programmatūrā, atlasiet **Check Online** (Pārbaudīt tiešsaistē).
Ne visas DRAGEN versijas un darbplūsmas ir saderīgas ar tiešsaistes instalāciju. Papildu darbplūsmām izmantojiet bezsaistes instalāciju.
5. Atlasiet to darbplūsmu izvēles rūtiņas, kuras vēlaties instalēt. Vispirms noteikti instalējiet jaunāko BCL Convert versiju, ja tas vēl nav izdarīts.
Informāciju par jaunāko darbplūsmas versiju varat skatīt informācijā par laidieni.
6. Atlasiet **Install** (Instalēt), lai sāktu instalēšanu.
7. Ievadiet ilmnadmin kā sistēmas paroli un pēc tam atlasiet **Authenticate** (Autentificēt).

DRAGEN darbplūsmu instalēšana bezsaistē

1. Kad pieejams DRAGEN darbplūsmas atjauninājums, lejupielādējiet instalēšanas programmu (*.tar.gz) no [DRAGEN atbalsta lapas](#). Saglabājiet instalēšanas programmu lokālajā vai portatīvajā diskā.
2. Ja jūs saglabājat instalēšanas programmu portatīvajā diskā, pievienojiet disku USB 3.0 pieslēgvietai, kas atrodas gan iekārtas sānā, gan aizmugurē. Ja vajadzīgs, uzmanīgi pārvietojiet iekārtu, lai piekļūtu tās aizmugurei.
3. Atlasiet vadības programmatūru un pēc tam atlasiet **Process Management** (Procesu pārvaldība).
4. Pārliedzieties, ka iekārtā nenotiek sekvenēšanas izpildes vai sekundārā analīze.
5. Atlasiet vadības programmatūru un pēc tam atlasiet **DRAGEN**.
6. Sadaļā Version (Versija) atlasiet **Browse for New Version** (Pārlūkot jaunu versiju), lai pārietu uz instalēšanas programmu.
7. Atlasiet **Install** (Instalēt), lai sāktu instalēšanu.
8. Ievadiet ilmnadmin kā sistēmas paroli un pēc tam atlasiet **Authenticate** (Autentificēt).

Gaisa filtra nomaīņa

Lai ik pēc 6 mēnešiem nomainītu gaisa filtru ar beigušos derīguma termiņu, veiciet tālāk aprakstītās darbības.

Gaisa filtrs ir vienreiz lietojama kvadrātveida kasetne, kas nosedz ventilatoru iekārtas labajā pusē. Tas nodrošina pareizu dzesēšanu un neļauj sistēmā iekļūt netīrumiem. Iekārta tiek piegādāta ar vienu uzstādītu gaisa filtru un vienu rezerves filtru. Papildu rezerves daļas tiek iekļautas derīgā iekārtas apkopes līgumā, vai arī tās var iegādāties atsevišķi no Illumina.

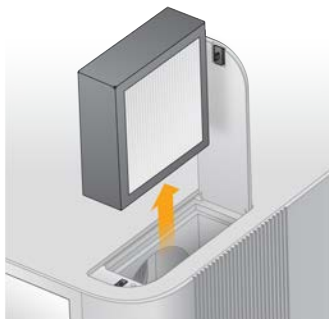
1. Iekārtas augšpusē uzspiediet uz augšējā paneļa labās puses, lai to atvienotu, kā parādīts tālāk redzamajā attēlā.



2. Atveriet paneli.



3. Piespiediet, lai atbrīvotu gaisa filtra kasetni, izņemiet no paneļa centra un utilizējiet to.



4. Ievietojiet turētājā jaunu gaisa filtru un uzspiediet, lai to nofiksētu.

5. Aizveriet un aizspiediet augšējo paneli.



6. Novietojiet iekārtu tās sākotnējā atrašanās vietā.

Problēmu novēršana

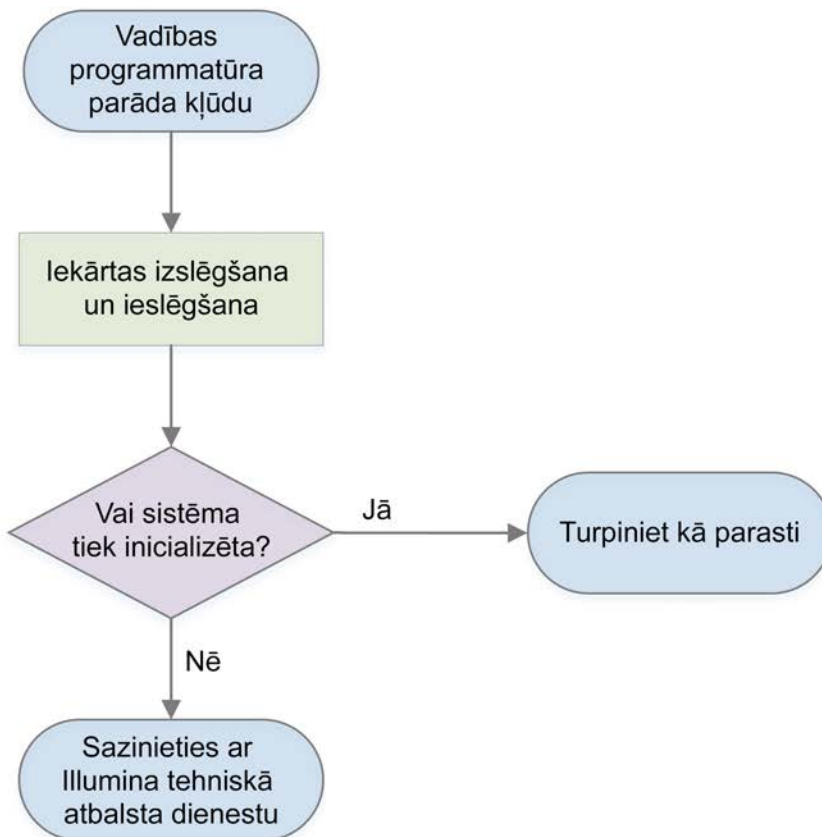
Šajā sadaļā ir sniegtas secīgas instrukcijas par izpildes apturēšanu, iekārtas ieslēgšanu un izslēgšanu un citas problēmu novēršanas procedūras.

Kļūdas ziņojuma cēloņu novēršana

Šajā pielikumā sniegti detalizēti dažādu problēmu novēršanas darbību norādījumi. Tālāk redzamajā plūsmkartē ir sniegts pārskats par problēmu novēršanas darbībām, kas jāveic, ja inicializācijas, izpildes iestatīšanas vai sekvenēšanas laikā tiek rādīti kļūdu ziņojumi, kuru cēloni neizdodas novērst ar darbības atkārtošānu.

Daudzas kļūdas var atrisināt ar enerģijas ciklu: iekārtu izslēdzot un pēc tam atkal ieslēdzot.

Papildinformāciju par iekārtas ieslēgšanu un izslēgšanu skatiet sadaļā [Iekārtas izslēgšana un ieslēgšana 81. lpp.](#)



Paļigmateriālu atkārtota glabāšana

Izmantojiet tālāk sniegtos norādījumus, lai noglabātu atkausētu kasetni un plūsmas elementu gadījumā, ja iekārtas pirmsizpildes pārbaudes laikā pirms šķidrumu pārbaudes tiek konstatēta iekārtas kļūda.

1. Atvienojiet plūsmas elementu no kasetnes.
2. Izņemiet un izmetiet atšķaidīto bibliotēku no rezervuāra (līdz ~18 µl).

! Nākamajam ciklam sagatavojiet svaigu tās pašas bibliotēkas atšķaidījumu, lai nepieļautu savstarpēju kontamināciju ar atlikušo bibliotēku rezervuārā.

3. Noglabājiet kasetni no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā tā, lai etiķete būtu vērsta augšup un gaiss varētu cirkulēt no visām pusēm.
Ilgums nedrīkst pārsniegt 72 stundas. Ja kasetne pa nakti tika atstāta atkausēties ledusskapī 12 stundas, ilgums nedrīkst pārsniegt 60 stundas.
4. Ielieciet plūsmas elementu atpakaļ oriģinālajā sudrabetajā folijas iesaiņojumā ar desikantu.
5. Aizlīmējiet folijas maisiņu un noglabājiet no 2 °C līdz 8 °C temperatūrā.
Ilgums nedrīkst pārsniegt 72 stundas.

Cikla atcelšana

1. Atlasiet **End Run** (Beigt ciklu).
2. Lai automātiski iztīrītu reaģentu kasetni, atlasiet izvēles rūtiņu **Purge Reagent Cartridge** (Iztīrīt reaģentu kasetni).
Noklusējuma atlase ir konfigurēta NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras iestatījumos.
3. Atlasiet **Yes, end the sequencing run** (Jā, beigt sekvenēšanas izpildi).
Cikla atcelšana ir neatgriezeniska. Programmatūra nevar atsākt ciklu, un paļigmateriālus nevar atkārtoti izmantot pēc pirmsizpildes pārbaudžu iekārtas pārbaudes daļas.
4. Atlasiet **Eject Cartridge** (Izbīdīt kasetni), lai atvērtu vizieri un izbīdītu paplāti.
5. Izņemiet kasetni no paplātes.
6. Glabājiet vai utilizējiet kasetni atkarībā no atcelšanas brīža.

Apstākļi	Instance
Jūs atcēlāt pirms iekārtas pirmsizpildes pārbaudes vai tās laikā un vēlaties izmantot paļigmateriālus atkārtoti.	Skatiet sadaļu Paļigmateriālu atkārtota glabāšana 80. lpp.
Visi pārējie apstākļi.	Skatiet sadaļu Paļigmateriālu noņemšana 52. lpp.

7. Atlasiet **Close Door** (Aizvērt durvis), lai ievietotu paplāti atpakaļ un atgrieztos sākuma ekrānā.
Sensori apstiprina, ka kasetne ir izņemta.

Cikla atkārtota ievietošana rindā

Ja sadaļas Process Management (Procesu pārvaldība) apgabalā Status of Secondary Analysis (Sekundārās analīzes statuss) ir redzama kļūda, varat atkārtoti ievietot ciklu rindā, lai vēlreiz veiktu DRAGEN analīzi iekārtā ar ģenerētajiem cBCL failiem. Lai atkārtotas rindā ievietošanas funkcija darbotos, iekārtā joprojām jāatrodas oriģinālā cikla mapei. Izmantojot atkārtotas rindā ievietošanas funkciju, rindā netiek atkārtoti ievietoti cikli BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā. Lai atkārtoti ievietotu rindā BaseSpace sekvenēšanas centrmezglā, skatiet BaseSpace sekvenēšanas centrmezgla palīdzības centra sadaļu Fix Sample Sheet (Parauga lapas labošana).

1. Atjauniniet parauga lapu v2 un pēc tam saglabājiet parauga lapu portatīvajā vai montētajā tīkla diskā.
2. Ja jūs saglabājat parauga lapu portatīvajā diskā, pievienojiet disku USB 3.0 pieslēgvietai, kas atrodas gan iekārtas sānā, gan aizmugurē. Ja vajadzīgs, uzmanīgi pārvietojiet iekārtu, lai piekļūtu tās aizmugurei.
3. Atlasiet vadības programmatūru un pēc tam atlasiet **Process Management** (Procesu pārvaldība).
4. Pārliecinieties, ka iekārtā nenotiek sekvenēšanas izpildes vai sekundārās analīzes.
5. Lai atkārtoti ievietotu rindā, atlasiet **Queue** (Atkārtoti ievietot rindā) blakus pabeigtajam ciklam.
6. Atlasiet **Choose** (Izvēlēties), lai pārietu uz atjaunināto parauga lapu, un pēc tam atlasiet **Open** (Atvērt).
7. Atlasiet **Start Queue** (Sākt atkārtotu ievietošanu rindā).

Iekārtas izslēgšana un ieslēgšana

Enerģijas cikla laikā iekārta droši izslēdzas un restartē sistēmu, lai atjaunotu zaudēto savienojumu, saskaņotu specifikāciju vai atrisinātu inicializācijas kļūdu. Programmatūras ziņojumi norāda, kad iekārta jāizslēdz un jāieslēdz, lai atrisinātu kļūdu vai brīdinājumu.

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **Shut Down Instrument** (Izslēgt iekārtu).
2. Ja sistēma netiek izslēgta, turiet barošanas pogu iekārtas labajā pusē, kamēr lampiņas nodziest.
3. Ja barošanas poga mirgo, nospiediet pārslēgšanas slēdzi, kas atrodas uz aizmugurējā paneļa, izslēgšanas (O) pozīcijā.
Enerģijas poga pēc iekārtas izslēgšanas var turpināt mirgot.

8. attēls Pārslēgšanas slēdža atrašanās vieta



4. Uzgaidiet 30 sekundes.
5. Nospiediet pārslēgšanas slēdzi (I) ieslēgšanas pozīcijā.
6. Ja barošanas poga mirgo, uzgaidiet 30 sekundes un tad nospiediet to.

9. attēls Barošanas pogas atrašanās vieta



7. Uzgaidiet aptuveni 5 minūtes, līdz operētājsistēma ielādējas. Pēc operētājsistēmas ielādes piesakieties sistēmā.
Tiek palaista vadības programmatūra, kas inicializē sistēmu. Uzgaidiet aptuveni 5 minūtes, līdz sistēma tiek inicializēta. Kad inicializācija ir pabeigta, tiek parādīts sākuma ekrāns.

Sistēmas pārbaudes veikšana

Normālai iekārtas darbībai un apkopei nav nepieciešama sistēmas pārbaude. Tomēr Illumina tehniskā atbalsta dienesta pārstāvis var lūgt jūs veikt sistēmas pārbaudi problēmu novēršanas nolūkos.

Četras apakšsistēmas pārbaudes ilgst aptuveni 58 minūtes, kamēr tiek novērstas pirmsizpildes pārbaudes kļūdas un citas problēmas. Testi apliecina, vai komponenti ir pareizi izlīdzināti un funkcionējoši.

Testu rezultātu izvades atrašanās vieta ir `system-check` mape, kas atrodas direktorijā `/usr/local/illumina/system-check`.

Pirms sistēmas pārbaūžu veikšanas noteikti izņemiet kasetni.

Sistēmas pārbaudes veikšana

1. Vadības programmatūras izvēlnē atlasiet **System Checks** (Sistēmas pārbaudes).
2. Atlasiet visu to tālāk norādīto sistēmas pārbaūžu izvēles rūtiņas, ko vēlaties veikt.
 - **Network Connectivity** (Tīkla savienojamība) — pārbauda tīkla savienojuma statusu un veiktspēju.
 - **Enclosure** (Korpuss) — pārbauda termiskās sistēmas un viziera pacelšanas mehānisma darbību.
 - **Motion** (Kustība) — pārbauda Z posma un XY posma kustības ierobežojumus un veiktspēju.
 - **Optics** (Optika) — pārbauda attēlveidošanas moduļa veiktspēju.
3. Atlasiet **Start** (Sākt).

Rūpnīcas iestatījumu atjaunošana

Atjaunojiet sistēmas rūpnīcas noklusējuma iestatījumus, lai pazeminātu programmatūras versiju, atkoptu to pēc nevēlamas konfigurācijas. Šo funkciju drīkst izmantot tikai Illumina pārstāvis.

Instalācijas attēla tveršana

Tveriet sistēmas attēlu, lai dublētu sekmīgi funkcionējošu programmatūras instalāciju. Šo sistēmas attēlu vēlāk var atjaunot. Ieteicams tvert sistēmas attēlu tūlīt pēc sākotnējās instalēšanas un paroles nomaiņas kopā ar Illumina pārstāvi.

1. Restartējiet Linux.
2. Kad tiek parādīta uzvedne izvēlēties operētājsistēmu, atlasiet **Capture Installed Image** (Tvert instalācijas attēlu).

Pirms automātiskās pāriešanas uz NextSeq 1000/2000 vadības programmatūru īsu brīdi ir redzamas operētājsistēmas opcijas.



Atmiņā tiek saglabāts tikai viens attēls, tādēļ, veicot šo darbību, iepriekš tvertais attēls tiek pārrakstīts.

3. Pašreizējās instalācijas attēla tveršana sistēmā ilgst aptuveni 30 minūtes. Tveršanas laikā var tikt veiktas vairākas atsāknēšanas. Pēc pabeigšanas sistēma tiek atsāknēta ar atmiņā saglabātu pašreizējās instalācijas attēlu.

Tverta attēla atjaunošana

Atjaunojiet sistēmas iepriekš tverto attēlu, lai veiktu atkopšanu pēc nevēlamām konfigurācijām.

1. Restartējiet Linux.
2. Kad tiek parādīta uzvedne izvēlēties operētājsistēmu, atlasiet **Restore Installed Image** (Atjaunot instalācijas attēlu).

Pirms automātiskās pāriešanas uz NextSeq 1000/2000 vadības programmatūru īsu brīdi ir redzamas operētājsistēmas opcijas.

i | Paroles ir saistītas ar sistēmas attēlu. Lai pieteiktos sistēmā pēc atjaunošanas, izmantojiet atjaunotā attēla paroli.

3. Uzgaidiet aptuveni 30 minūtes, līdz atjaunošana tiek pabeigta.
Atjaunošanas laikā var tikt veiktas vairākas atsāknēšanas. Pēc pabeigšanas sistēma tiek atsāknēta ar atjaunoto attēlu.

Resursi un atsauces

Parauga lapas v2 iestatījumi

Ja izmantojat lokālo režīmu, varat izmantot parauga lapas v2 failu formātu, lai konfigurētu izpildes iestatījumus. Izveidojiet parauga lapu iekārtas izpildes iestatījumos vai rediģējot *NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmu parauga lapas v2 veidni*. Rediģējot parauga lapu, pārliecinieties, ka tālāk uzskaitītās sadaļas un lauki ir ietverti norādītajā secībā un atbilst prasībām. Pēc rediģēšanas izmantojiet portatīvo vai montēto tīkla disku, lai pārsūtītu parauga lapu uz NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmām. Pārejot uz parauga lapu vadības programmatūrā, tā tiek pārkopēta priekšizpildes mapē iekārtā, lai varētu noņemt portatīvo disku.

Pārliecinieties, ka jūsu parauga lapa v2 atbilst tālāk uzskaitītajām prasībām.

- Rādītāju sekvencēm, kas norādītas parauga lapas sadaļā BCLConvert_Data, ir jāatbilst rādītāju komplektam, kas atlasīts NextSeq 1000/2000 sistēmā.
- Ja izmantojat NextSeq 1000/2000 vadības programmatūru v1.2, parauga lapā norādītajai DRAGEN versijai ir jābūt instalētai sistēmā un aktīvai. Informāciju par instalēšanu skatiet sadaļā [Programmatūras atjauninājumi 73. lpp.](#)
- Ja izmantojat NextSeq 1000/2000 vadības programmatūru v1.3, paraugu lapā norādītajai DRAGEN versijai ir jābūt instalētai sistēmā. Vadības programmatūra automātiski nosaka DRAGEN versiju, balstoties uz parauga lapu, un nepieciešamības gadījumā aicina pārslēgt aktīvās versijas. Informāciju par instalēšanu skatiet sadaļā [Programmatūras atjauninājumi 73. lpp.](#)

Ja izmantojat DRAGEN, ir nepieciešams konfigurēt papildu iestatījumus. Papildinformāciju skatiet sadaļā [DRAGEN parauga lapas iestatījumi 89. lpp.](#)

Lejupielādējiet parauga lapas v2 veidni no Product Files (Izstrādājumu faili) NextSeq 1000 un NextSeq 2000 sekvenēšanas sistēmu atbalsta lapā. Ja izveidojāt parauga lapu, izmantojot iekārtas izpildes iestatījumus, tad parauga lapas mainīšana pēc sākotnējās lejupielādes var izraisīt analīzes kļūmi.

Failu nosaukumi nedrīkst saturēt speciālās rakstzīmes.

[Header] prasības

Sadaļa [Header] satur vispārīgo informāciju par ciklu. Tālāk ir uzskaitīti pieejamie [Header] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
FileFormatVersion	Jā	Parauga lapas versija. Ievadiet vērtību 2.
RunName	Nē	Jūsu izvēlēts unikālais izpildes nosaukums. RunName var saturēt burtciparu rakstzīmes, zemsvītras, defises un punktus. Ja RunName satur atstarpes vai speciālās rakstzīmes, analīze ir nesekmīga.
RunDescription	Nē	Izpildes apraksts.
InstrumentPlatform	Nē	NextSeq 1000/2000
InstrumentType	Nē	NextSeq 1000/2000

[Reads] prasības

Sadaļā [Reads] ir aprakstīts genomu un 1. un 2. rādītāja lasījumiem izmantoto sekvenēšanas ciklu skaits. Tālāk ir uzskaitīti pieejamie [Reads] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
Read1Cycles	Jā	Ciklu skaits pirmajā lasījumā. Vērtībai ir jābūt veselam skaitlim, kas ir lielāks nekā nulle.
Read2Cycles	Nē	Ciklu skaits otrajā lasījumā.
Index1Cycles	Nē	Ciklu skaits pirmā rādītāja lasījumā. Nepieciešams, ja tiek sekvenēts vairāk nekā viens paraugs. Maksimums ir 10 cikli.
Index2Cycles	Nē	Ciklu skaits otrā rādītāja lasījumā. Maksimums ir 10 cikli.

[Sequencing_Settings] prasības

Izmantojiet [Sequencing_Settings] sadaļu, lai norādītu, kuru bibliotēkas sagatavošanas komplektu jūs izmantojat.

Lauks	Obligāts	Apraksts
LibraryPrepKits	Nē	<p>Jūsu bibliotēkas sagatavošanas komplekts. Ir atļauts tikai viens bibliotēkas sagatavošanas komplekts.</p> <p>NextSeq 1000/2000 vadības programmatūras versijā v1.3 nepieciešamā pielāgotā recepte tiek atlasīta automātiski, ja kā bibliotēkas sagatavošanas komplekts ir norādīts Illumina Stranded Total RNA sagatavošanas komplekts ar Ribo-Zero Plus komplektu vai Illumina Stranded mRNA sagatavošanas komplekts.</p> <p>Ievadiet vienu no tālāk nosauktajām vērtībām.</p> <ul style="list-style-type: none"> Illumina Stranded Total RNA sagatavošanas komplekts ar Ribo-Zero Plus komplektu — <code>ILMNStrandedTotalRNA</code> Illumina Stranded mRNA sagatavošanas komplekts — <code>ILMNStrandedmRNA</code>

BCL konvertēšanas prasības

BCL konvertēšanas sadaļas sniedz informāciju par datu konvertēšanu no BCL uz FASTQ. BCL konvertēšanas opcijas ietver divas atsevišķas sadaļas: [BCLConvert_Settings] un [BCLConvert_Data]. BCL konvertēšanas sadaļās ir jānorāda informācija par rādītāju adaptera sekvencēm. Lai identificētu saderīgo adaptera sekvenci katram lasījumam un rādītājam, skatiet dokumentu *Illumina adaptera sekvences (dokuments Nr. 1000000002694)*.

Tālāk norādīti pieejamie [BCLConvert_Settings] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
SoftwareVersion	Jā	Sistēmā pašlaik instalētās DRAGEN programmatūras versija. Izmantojiet visus trīs versijas nosaukumā iekļautos ciparus. Piemēram, 3.5.7.
BarcodeMismatchIndex1	Nē	Atļauto neatbilstību skaits starp pirmā rādītāja lasījumu un rādītāja sekvenci. Vērtības var būt 0, 1 vai 2. Noklusējuma vērtība ir 1.

Lauks	Obligāts	Apraksts
BarcodeMismatchIndex2	Nē	Atļauto neatbilstību skaits starp otrā rādītāja lasījumu un rādītāja sekvenci. Vērtības var būt 0, 1 vai 2. Noklusējuma vērtība ir 1.
FastqCompressionFormat	Nē	Lai ģenerētu FASTQ izvades failus kā *.gz failu, ievadiet <code>gzip</code> . Lai saglabātu FASTQ failus kā *.ora failu un izmantotu to kopā ar DRAGEN atspiešanu, ievadiet <code>dragen</code> .
AdapterRead1	Nē	Sekvence saīsināšanai vai maskēšanai no 1. lasījuma beigām. 1. lasījuma adaptera sekvence, kas satur A, C, G vai T. AdapterRead1 saīsina ciklus pēc noklusējuma.
AdapterRead2	Nē	Sekvence saīsināšanai vai maskēšanai no 2. lasījuma beigām. 2. lasījuma adaptera sekvence, kas satur A, C, G vai T. AdapterRead2 saīsina ciklus pēc noklusējuma.
OverrideCycles	Nē	Virkne, ko izmanto, lai norādītu UMI ciklus un maskētu lasījumu ciklus. Ir atļautas šādas vērtības: <ul style="list-style-type: none"> • N — norāda ciklus, kas jāignorē; • Y — norāda sekvenējamus ciklus; • I — norāda rādītāju ciklus; • U — norāda UMI ciklus, kas jāsaīsina. Elementi ir atdalīti ar semikolu. Tālāk ir parādīti OverrideCycles ievades piemēri. U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

Tālāk norādīti pieejamie [BCLConvert_Data] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
Sample_ID	Jā	Parauga ID. Parauga ID var saturēt līdz 20 burtciparu rakstzīmēm, defises un zemsvītras. ID ir reģistrjutīgs. Atdaliet katru identifikatoru ar defisi vai zemsvītru. Piemēram, Sample1-DQB1-022515.
Index	Nē	Ar paraugu saistītā rādītāja sekvence. Ir atļauti tikai A, C, T, G. Nepieciešams, ja tiek sekvenēts vairāk nekā viens paraugs.
Index2	Nē	Ar paraugu saistītā otrā rādītāja sekvence. Ir atļauti tikai A, C, T, G. Pārliedzieties, ka otrā rādītāja (i5) adaptera sekvenses ir uz priekšu vērsta orientācijā. Sekundārās analīzes laikā DRAGEN automātiski atgriezeniski papildina i5 rādītājus.
Lane	Nē	Plūsmas elementa josla. Joslas tiek apzīmētas ar vienu vesela skaitļa vērtību.

DRAGEN parauga lapas iestatījumi

Šajā sadaļā ir aprakstītas katra DRAGEN informācijas avota prasības attiecībā uz paraugu lapām. Pievienojiet sava DRAGEN informācijas avota iestatījumus kā pēdējo parauga lapas sadaļu. Var izmantot tikai vienu DRAGEN informācijas avotu.

Katrs DRAGEN informācijas avots ietver atsevišķas sadaļas iestatījumiem un datiem.

DRAGEN Germline informācijas avota prasības

Tālāk norādīti pieejamie [DragenGermline_Settings] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
SoftwareVersion	Jā	Sistēmā pašlaik instalētās DRAGEN programmatūras versija. Izmantojiet visus trīs versijas nosaukumā iekļautos ciparus. Piemēram, 3.5.7. Programmatūras versijai ir jābūt tādai pašai, kā norādīts sadaļā BCLConvert_Settings.

Lauks	Obligāts	Apraksts
ReferenceGenomeDir	Jā	Atsauces genoma nosaukums. Piemēram, hg19_alt_aware. Izmantojiet atsauces genoma nosaukumu, kas atrodas šeit: <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Informāciju par atsauces genomu skatiet <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> lietojumprogrammas tiešsaistes palīdzībā.
MapAlignOutFormat	Nē	Izvides faila formatējums. Pieejamās vērtības ir bam vai cram. Ja neviena vērtība nav norādīta, noklusējums ir none.
KeepFastq	Nē	Lai saglabātu FASTQ izvides failus, ievadiet <code>true</code> . Lai noņemtu FASTQ izvides failus, ievadiet <code>false</code> .

Tālāk norādīti pieejamie [DragenGermline_Data] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
Sample_ID	Jā	Parauga ID. Parauga ID var saturēt līdz 20 burtciparu rakstzīmēm. ID ir reģistrjutīgs. Atdaliet katru identifikatoru ar defisi. Piemēram, Sample1-DQB1-022515. Paraugu ID ir jābūt tādiem pašiem kā BCLConvert_Data sadaļā norādītie ID.

DRAGEN RNA informācijas avota prasības

Tālāk norādīti pieejamie [DragenRNA_Settings] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
SoftwareVersion	Jā	Sistēmā pašlaik instalētās DRAGEN programmatūras versija. Izmantojiet visus trīs versijas nosaukumā iekļautos ciparus. Piemēram, 3.5.7. Programmatūras versijai ir jābūt tādai pašai, kā norādīts sadaļā BCLConvert_Settings.

Lauks	Obligāts	Apraksts
ReferenceGenomeDir	Jā	Atsauces genoma nosaukums. Piemēram, hg38_noalt_with_decoy. Izmantojiet atsauces genoma nosaukumu, kas atrodas šeit: <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Informāciju par atsauces genomu skatiet <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> lietojumprogrammas tiešsaistes palīdzībā.
RnaGeneAnnotationFile	Nē	Fails, kas satur RNA gēnu anotācijas. Atļauts izmantot tikai burtciparu rakstzīmes. Ja anotācija nav norādīta, tiek izmantots norādītajā atsauces genomā iekļautais noklusējuma anotācijas fails.
MapAlignOutFormat	Nē	Izvades faila formatējums. Pieejamās vērtības ir bam vai cram. Ja neviena vērtība nav norādīta, noklusējums ir none.
KeepFastq	Nē	Lai saglabātu FASTQ izvades failus, ievadiet <code>true</code> . Lai noņemtu FASTQ izvades failus, ievadiet <code>false</code> .
DifferentialExpressionEnable	Nē	Lai iespējotu diferenciālo gēnu izteiksmi, ievadiet <code>true</code> . Lai izslēgtu diferenciālo gēnu izteiksmi no analīzes, ievadiet <code>false</code> .

Tālāk norādīti pieejamie [DragenRna_Data] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
Sample_ID	Jā	Parauga ID. Parauga ID var saturēt līdz 20 burtciparu rakstzīmēm. ID ir reģistrjutīgs. Atdaliet katru identifikatoru ar defisi. Piemēram, Sample1-DQB1-022515. Paraugu ID ir jābūt tādiem pašiem kā BCLConvert_Data sadaļā norādītie ID.
Comparison<N>	Nē	Katra parauga kontroles vai salīdzināšanas vērtība. Ja paraugam nav kontroles vai salīdzināšanas vērtības, paraugam tiek piešķirta vērtība <code>na</code> . Visi paraugi, kuri ir atzīmēti kā kontrolparaugi, tiek salīdzināti ar visiem paraugiem, kas ir atzīmēti salīdzināšanai. Vērtība <code>N</code> atspoguļo paraugu salīdzināšanas grupu.

DRAGEN Enrichment informācijas avota prasības

Tālāk norādīti pieejamie [DraGenEnrichment_Settings] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
SoftwareVersion	Jā	Sistēmā pašlaik instalētās DRAGEN programmatūras versija. Izmantojiet visus trīs versijas nosaukumā iekļautos ciparus. Piemēram, 3.5.7. Programmatūras versijai ir jābūt tādai pašai, kā norādīts sadaļā BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Jā	Atsauces genoma nosaukums. Piemēram, hg38_alt_aware. Atsauces genomi atrodas šeit: /usr/local/illumina/genomes. Informāciju par atsauces genomu skatiet <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 lietojumprogrammas tiešsaistes palīdzībā</i> .
BedFile	Jā	BED fails, kas satur mērķa reģionus.
GermlineOrSomatic	Jā	Lai veiktu bagātināšanas dzimumšūnas līnijas analīzi, ievadiet <code>germline</code> . Lai veiktu bagātināšanas somatisko analīzi, ievadiet <code>somatic</code> .
KeepFastq	Nē	Lai saglabātu FASTQ izvades failus, ievadiet <code>true</code> . Lai noņemtu FASTQ izvades failus, ievadiet <code>false</code> .
MapAlignOutFormat	Nē	Izvades faila formatējums. Pieejamās vērtības ir <code>bam</code> vai <code>cram</code> . Ja neviena vērtība nav norādīta, noklusējums ir <code>none</code> .
AuxNoiseBaselineFile	Nē	Trokšņu bāzlīnijas faila nosaukums. Varat izmantot <code>*.txt</code> vai <code>*.gz</code> failu formātu. Trokšņu bāzlīnijas ir pieejamas tikai tad, kad tiek izmantots somatiskais režīms. Papildinformāciju skatiet sadaļā Trokšņu bāzlīnijas failu importēšana 18. lpp.

Tālāk norādīti pieejamie [DragenEnrichment_Data] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
Sample_ID	Jā	Parauga ID. Parauga ID var saturēt līdz 20 burtciparu rakstzīmēm. ID ir reģistrjutīgs. Atdaliet katru identifikatoru ar defisi. Piemēram, Sample1-DQB1-022515. Paraugu ID ir jābūt tādiem pašiem kā BCLConvert_Data sadaļā norādītie ID.

DRAGEN DNA informācijas avota prasības

Tālāk norādīti pieejamie [DragenAmplicon_Settings] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
SoftwareVersion	Jā	Sistēmā pašlaik instalētās DRAGEN programmatūras versija. Izmantojiet visus trīs versijas nosaukumā iekļautos ciparus. Piemēram, 3.5.7. Programmatūras versijai ir jābūt tādai pašai, kā norādīts sadaļā BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Jā	Atsauces genoma nosaukums. Piemēram, hg38_alt_aware. Atsauces genomu atrodas šeit: /usr/local/illumina/genomes. Informāciju par atsauces genomu skatiet <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 lietojumprogrammas tiešsaistes palīdzībā</i> .
DnaBedFile	Jā	BED fails, kas satur mērķa reģionus. BED failu ievadīt *.txt vai *.gz failu formātā.
DnaGermlineOrSomatic	Jā	Lai veiktu DNA Amplicon dzimumšūnas līnijas analīzi, ievadiet <code>germline</code> . Lai veiktu DNA Amplicon somatisko analīzi, ievadiet <code>somatic</code> .
KeepFastq	Nē	Lai saglabātu FASTQ izvades failus, ievadiet <code>true</code> . Lai noņemtu FASTQ izvades failus, ievadiet <code>false</code> .
MapAlignOutFormat	Nē	Izvades faila formatējums. Pieejamās vērtības ir <code>bam</code> vai <code>cram</code> . Ja neviena vērtība nav norādīta, noklusējums ir <code>none</code> .

Tālāk norādīti pieejamie [DrogenAmplicon_Data] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
Sample_ID	Jā	Parauga ID. Parauga ID var saturēt līdz 20 burtciparu rakstzīmēm. ID ir reģistrjutīgs. Atdaliet katru identifikatoru ar defisi. Piemēram, Sample1-DQB1-022515. Paraugu ID ir jābūt tādiem pašiem kā BCLConvert_Data sadaļā norādītie ID.
DnaOrRna	Jā	Veicamās Amplicon analīzes tips. DRAGEN v3.8 atbalsta tikai DNS analīzi. Ievadiet dna.

DRAGEN Single Cell RNA informācijas avota prasības

Tālāk norādīti pieejamie [DrogenSingleCellRNA_Settings] lauki un apraksti. Informāciju par trešo pušu komplektu saderību skatiet DRAGEN Bio-IT platformas izstrādājumu saderības atbalsta lapā.

Single Cell bibliotēku komplekts 1–5

Tālāk uzskaitītie paraugu lapu iestatījumi attiecas uz bibliotēku sagatavošanas komplektiem, kuriem ir tāda pati ģenētiskā struktūra kā DRAGEN Single Cell bibliotēku komplektiem 1–5. Izmantojiet DRAGEN Bio-IT platformas izstrādājumu saderības atbalsta lapu, lai apstiprinātu jūsu komplekta ģenētisko struktūru.

Lauks	Obligāts	Apraksts
SoftwareVersion	Jā	Sistēmā pašlaik instalētās DRAGEN programmatūras versija. Izmantojiet visus trīs versijas nosaukumā iekļautos ciparus. Piemēram, 3.5.7. Programmatūras versijai ir jābūt tādai pašai, kā norādīts sadaļā BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Jā	Atsauces genoma nosaukums. Piemēram, hg38_alt_aware. Atsauces genomi atrodas šeit: /usr/local/illumina/genomes. Informāciju par atsauces genomu skatiet <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 lietojumprogrammas tiešsaistes palīdzībā</i> .

Lauks	Obligāts	Apraksts
RnaLibraryType	Nē	Ievadiet vienu no šīm vērtībām: <ul style="list-style-type: none"> SF — pavediens uz priekšu. SF ir noklusējuma vērtība; SR — pavediens atpakaļ; U — nav pavediena.
RnaGeneAnnotationFile	Nē	Fails, kas satur RNA gēnu anotācijas. Atļauts izmantot tikai burtciparu rakstzīmes. Ja anotācija nav norādīta, tiek izmantots norādītajā atsauces genomā iekļautais noklusējuma anotācijas fails.
BarcodeRead	Nē	Svītrkodu lasīšanas atrašanās vieta sekvenēšanas izpildē, kas satur gan svītrkodu, gan UMI. Vērtības var saturēt Read1 vai Read2. Noklusējuma vērtība ir Read1.
BarcodePosition	Jā	To bāzu atrašanās vieta, kas atbilst svītrkodam laukā BarcodeRead ievadītās vērtības robežās. Bāzu pozīcijas tiek indeksētas no nulles pozīcijas. Ievadiet BarcodePosition vērtību šādā formātā: 0_<svītrkoda beigu pozīcija> Piemēram, ja svītrkods satur 16 bāzes, vērtība ir 0_15.
UmiPosition	Jā	To bāzu atrašanās vieta, kas atbilst UMI lauka BarcodeRead ievadītās vērtības robežās. Ievadiet UmiPosition vērtību šādā formātā: <UMI sākuma pozīcija>_<UMI beigu pozīcija> Piemēram, ja UMI satur 10 bāzes un ja svītrkods satur 16, vērtība ir 16_25.
BarcodeSequenceWhitelist	Nē	Iekļaujamās svītrkodu sekvenču saturošā faila nosaukums. Faila nosaukums var saturēt tikai burtciparu rakstzīmes, defises, zemsvītras un punktus.
KeepFastq	Nē	Lai saglabātu FASTQ izvades failus, ievadiet true. Lai noņemtu FASTQ izvades failus, ievadiet false.

Lauks	Obligāts	Apraksts
MapAlignOutFormat	Nē	Izvades faila formatējums. Pieejamās vērtības ir bam vai cram. Ja neviena vērtība nav norādīta, noklusējums ir none.

Tālāk norādīti pieejamie [DragenSingleCellRNA_Data] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
Sample_ID	Jā	Parauga ID. Parauga ID var saturēt līdz 20 burtciparu rakstzīmēm. ID ir reģistrjūtīgs. Atdaliet katru identifikatoru ar defisi. Piemēram, Sample1-DQB1-022515. Paraugu ID ir jābūt tādiem pašiem kā BCLConvert_Data sadaļā norādītie ID.

Single Cell bibliotēku komplekts 6

Tālāk norādītie paraugu lapu iestatījumi attiecas uz bibliotēku sagatavošanas komplektiem, kuriem ir tāda pati ģenētiskā struktūra kā DRAGEN Single Cell bibliotēku komplektiem 6. Izmantojiet DRAGEN Bio-IT platformas izstrādājumu saderības atbalsta lapu, lai apstiprinātu jūsu komplekta ģenētisko struktūru.

Lauks	Obligāts	Apraksts
SoftwareVersion	Jā	Sistēmā pašlaik instalētās DRAGEN programmatūras versija. Izmantojiet visus trīs versijas nosaukumā iekļautos ciparus. Piemēram, 3.5.7. Programmatūras versijai ir jābūt tādai pašai, kā norādīts sadaļā BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Jā	Atsauces genoma nosaukums. Piemēram, hg38_alt_aware. Atsauces genomu atrodas šeit: <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Informāciju par atsauces genomu skatiet <i>Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0 lietojumprogrammas tiešsaistes palīdzībā</i> .
RnaLibraryType	Nē	Ievadiet vienu no šīm vērtībām: <ul style="list-style-type: none"> SF — pavediens uz priekšu; SR — pavediens atpakaļ; U — nav pavediena.

Lauks	Obligāts	Apraksts
RnaGeneAnnotationFile	Nē	Fails, kas satur RNA gēnu anotācijas. Atļauts izmantot tikai burtciparu rakstzīmes. Ja anotācija nav norādīta, tiek izmantots norādītajā atsauces genomā iekļautais noklusējuma anotācijas fails.
BarcodeRead	Nē	Svītrkodu lasīšanas atrašanās vieta sekvenēšanas izpildē, kas satur gan svītrkodu, gan UMI. Vērtības var saturēt Read1 vai Read2. Noklusējuma vērtība ir Read1.
BarcodePosition	Jā	To bāzu atrašanās vieta, kas atbilst svītrkodiem laukā BarcodeRead ievadītās vērtības robežās. Bāzu pozīcijas tiek indeksētas no nulles pozīcijas. Ievadiet BarcodePosition vērtību šādā formātā: 0_<pirmā svītrkoda beigu pozīcija>+<otrā svītrkoda sākuma pozīcija>_<otrā svītrkoda beigu pozīcija>+<trešā svītrkoda sākuma pozīcija>_<trešā svītrkoda beigu pozīcija> Piemēram, vērtība 0_8+21_29+43_51 atbilstu šādai struktūrai: <ul style="list-style-type: none"> • 9 bāzes pirmajā svītrkodā (0_8); • 12 bāzes starp pirmo un otro svītrkodu; • 9 bāzes otrajā svītrkodā (21_29); • 13 bāzes starp otro un trešo svītrkodu; • 9 bāzes trešajā svītrkodā (43_51).
UmiPosition	Jā	To bāzu atrašanās vieta, kas atbilst UMI norādītā BarCodeRead robežās. Ievadiet virkni šādā formātā: <UMI sākuma pozīcija>_<UMI beigu pozīcija> Piemēram, ja UMI satur 8 bāzes un kopējais bāzu skaits pirms UMI ir 51, vērtība ir 52_59.
BarcodeSequenceWhitelist	Nē	Tā faila nosaukums, kas satur baltajam sarakstam pievienojamā svītrkoda sekvenci. Faila nosaukums var saturēt tikai burtciparu rakstzīmes, defises, zemsvītras un punktus.

Lauks	Obligāts	Apraksts
KeepFastq	Nē	Lai saglabātu FASTQ izvades failus, ievadiet <code>true</code> . Lai noņemtu FASTQ izvades failus, ievadiet <code>false</code> .
MapAlignOutFormat	Nē	Izvades faila formatējums. Pieejamās vērtības ir <code>bam</code> vai <code>cram</code> . Ja neviena vērtība nav norādīta, noklusējums ir <code>none</code> .

Tālāk norādīti pieejamie [DragenSingleCellRNA_Data] lauki un apraksti.

Lauks	Obligāts	Apraksts
Sample_ID	Jā	Parauga ID. Parauga ID var saturēt līdz 20 burtciparu rakstzīmēm. ID ir reģistrjūtīgs. Atdaliet katru identifikatoru ar defisi. Piemēram, <code>Sample1-DQB1-022515</code> . Paraugu ID ir jābūt tādiem pašiem kā <code>BCLConvert_Data</code> sadaļā norādītie ID.

Tumsas cikla sekvenēšana

Šajā sadaļā ir aprakstīts, kā izmantot tumsas cikla sekvenēšanu receptei.

Tumsas cikla sekvenēšana tiek izmantota, lai izpildītu tikai sekvenēšanas cikla ķīmiskos posmus. Pārskatiet sava bibliotēku sagatavošanas komplekta saderīgo izstrādājumu lapu [Illumina atbalsta vietnē](#), lai redzētu, vai ir nepieciešama tumsas cikla sekvenēšana.

Izpildiet tālāk norādītās darbības, lai veiktu tumsas cikla sekvenēšanu.

Receptes faila rediģēšana

- Lejupielādējiet receptes XML failu no [Illumina atbalsta vietnes](#).
- Rediģējiet receptes XML failu.
 - Identificējiet atbilstošo protokola sadaļu, balstoties uz lasījumu un rādītāju sekvenēšanas konfigurāciju. Katrai pielāgotajai receptei, ko var rediģēt, ir seši dažādi iespējamie protokoli. Piemēram, viena 1. lasījuma protokols bez rādītāju sekvenēšanas konfigurācijas būtu `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
 - Pirms `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` un `<ReadRef ReadName="Read 2"/>` jaunā rindiņā ievadiet šādu tumsas cikla posmu: `<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />`.
 - Katram nepieciešamajam tumsas ciklam ievadiet tumsas cikla posmu jaunā rindiņā.
- Saglabājiet receptes XML failu.

Tālāk ir sniegts receptes paraugs ar tumsas ciklu:

```
<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="BIX Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Transfer" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <Obdd ChemistryName="Library Denaturation and Dilution" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <Obcg ChemistryName="Cluster Generation" />
  <ChemistryRef ChemistryName="SBS Prime" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Read Prep" />
  <DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />
  <ReadRef ReadName="Read 1" />
  <SetThermalZoneTemp Enable="false" Zone="FlowCellHeater" />
</Protocol>
<Protocol Name="1 Read 1 Index" ProtocolType="1Read1Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="2min 60C Vacuum Hold" />
  ...
```

Receptes pievienošana ciklam

1. Vadības programmatūras izpildes iestatīšanas sadaļā Custom Recipe (Pielāgota recepte) atlasiet **Choose** (Izvēlēties).
2. Pārejiet uz atjaunināto receptes XML failu.
3. Atlasiet **Open** (Atvērt).
4. Atgriezieties sadaļā [Sekvenēšanas izpildes inicializēšana 46. lpp.](#)

Rādītājs

%

%PF 58

A

amplifikācija 8

analīze

metodes 5, 9

atbalsta lapas 73

attēla analīze 5

attēli 54

attēlveidošana 54-55

audio iestatījumi 21

automātiska atjaunināšana 73

B

balinātāja salvetes 28

balti papīri 59

barošanas poga 3, 81

barošanas vads 4

BaseSpace sekvenēšanas centrmezgls 1

dokumentācija 13

iestatījumi 13

bāzu nosaukšanas faili 9, 54, 60

bāzu noteikšana 5

BCL faili 6

bcl2fastq2 54

bibliotēkas

denaturācija 8

bibliotēku atšķaidīšana 8

brīdinājumi 6, 73, 81

C

caurlaides filtrs (PF) 58

CBCL faili 58

CE 54

cietais disks 6, 73

cikla mape 73

cikla statuss 6

cikli

metrika 54

ciklu dzēšana 6, 73

ciklu numuri 31

ciklu parametri 49

ciklu parametru rediģēšana 49

ciklu skaits 6

Compute Engine 54

D

D disks 73

datora nosaukums 6

datu kvalitāte 58

denaturācija 8

derīguma termiņi 77

diska atmiņa 6

divu kanālu sekvenēšana 57

dokumentācija 104

domēni 13

durvis

aizvēršana 51

E

enerģijas cikls 79

Enterprise abonements 13

Ethernet kabelis 4

Ethernet ports 4

F

FASTQ konversija 54

fāzēšana un pirmsfāzēšana 56

filtru faili 54, 60

G

gaisa filtri

atrašanās vieta 77

rezerves daļas 28

gaismas josla 3

gala pāris 49
garantija 28

I

iekārtas veiktspējas dati 13
ikonas 6
Illumina proaktīvais atbalsts 14
inicializācija 82
 kļūda 81
intensitātes vērtības 56
interneta savienojums 13
InterOp faili 54, 60
IP adrese 6
izpildes iestatīšana
 piemēri 31
izpildes lielums 73
izslēgšana 81
izvades mape 49, 73

J

jaudas slēdzis 4
joslas 55

K

kameras 55
kartēti diski 49
kasetne
 ievietošanas virziens 51
katalogu numuri 27
klasteru atrašanās vietas 54, 60
klasteru filtrēšana 58
klasteru intensitātes 56
klientu atbalsts 104
kļūdas 6, 81
 varbūtība 58-59
 ziņojumi 79
kļūdu žurnāli 55
komplekti 27
 kataloga numuri 28
kvalitātes rādītāji 58-59

kvalitātes tabulas 59

L

lasījumu cikli 31
lasījumu garums 31
ledusskapja specifikācijas 28
līdzekļi 73
līdzekļu fragmenti 6
Local Run Manager 5

M

maiņstrāvas jauda
 ieeja 4
manuāla programmatūras atjaunināšana 73
mākonī bāzēta analīze 1
monitors 3

N

nanoviļņi 56
nav nosaukšanas 57
nav noteikšanas 56
NextSeq 1000/2000 reaģenti 27
noklusējuma izvades mape 49
nosaukums
 datora nosaukums 6
 iekārtas nosaukums 21
 iekārtas nosaukums, segvārds 21
nukleotīdi 57

O

operētājsistēma 82

P

paliktņi 28
palīdzība, tehniskā 104
palīgmateriāli
 izsekošana 1
 skenēšana 51
palīgmateriālu izsekošana 1

- paļigmateriālu nodalījums 3
- papildu cikli 31
- pārslēgšanas slēdzis 81
- pārvietošana 4
- pele 4
- PhiX 28
 - izlīdzināšana 54
- PhiX vadība v3 27
- Phred algoritms 59
- pilienu uztvērējtrauks
 - paliktņi 28
- pirmā iestatīšana 77, 83-84
- privātais domēns 13
- procesu pārvaldība 73
- programmatūra
 - brīdinājumi par atjauninājumiem 22
 - instalēšana 73
 - pazemināšana,atsāknēšana 83-84
- programmatūras instalēšana 73
- programmatūras komplekts 1, 5
- programmatūras versijas pazemināšana 83-84

R

- rādītājs
 - cikli 31
- reģistrācijas kļūmes 56
- resuspensijas buferis 27
- rezerves daļas 77
- RSB aizvietotājs 27
- RunInfo.xml 60
- rūpnīcas noklusējuma iestatījumi 83-84

S

- saldētavas specifikācijas 28
- sarkanais kanāls 57
- savienojuma zudums 81
- sektori 54
- sektoru numurēšana 56
- sekvenēšanas analīzes skatītājs 54, 56
- servera atrašanās vieta 13

- sērijas numurs 6
- sistēmas pārbaudes 79
- System Suite instalēšanas programma 73
- sīktēli 60
- skaņas iestatījumi 21
- specifikāciju saskaņošana 81
- spirta salvetes 28
- statusa josla 3
- strēle 55
- strēles 56

T

- tastatūras 4
- tehniskā palīdzība 104
- testa komplekts 28
- tīrības filtrs 58

U

- UNC ceļi 49
- Universal Copy Service 5, 73
- USB porti 4

V

- veidnes ģenerēšana 56
- veiktspējas dati 13
- ventilatori 77
- viens lasījums 49
- viesošanas atrašanās vieta 13
- vieta diskā 73
- vietējā analīze 1
- virsmas numurēšana 56

W

- Windows
 - pieteikšanās 82

Z

- zaļais kanāls 57

Ž

žurnālfaili 55

Tehniskā palīdzība

Lai saņemtu tehnisko palīdzību, sazinieties ar Illumina tehniskā atbalsta dienestu.

Tīmekļa vietne: www.illumina.com

E-pasta adrese: techsupport@illumina.com

Illumina tehniskā atbalsta dienesta tālrunu numuri

Reģions	Bezmaksas	Starptautiskais modelis
Amerikas Savienotās Valstis	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Apvienotā Karaliste	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
Austrālija	+61 1800 775 688	
Austrija	+43 800 006249	+43 1 9286540
Beļģija	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
Dānija	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
Dienvidkoreja	+82 80 234 5300	
Filipīnas	+63 180016510798	
Francija	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Honkonga, Ķīna	+852 800 960 230	
Indija	+91 8006500375	
Indonēzija		0078036510048
Itālija	+39 800 985513	+39 236003759
Īrija	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Japāna	+81 0800 111 5011	
Jaunzēlande	+64 800 451 650	
Kanāda	+1 800 809 4566	
Ķīna		+86 400 066 5835
Malaizija	+60 1800 80 6789	
Nīderlande	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Norvēģija	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Singapūra	1 800 5792 745	

Reģions	Bezmaksas	Starptautiskais modelis
Somija	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
Spānija	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Šveice	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Taivāna, Ķīna	+886 8 06651752	
Taizeme	+66 1800 011 304	
Vācija	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Vjetnama	+84 1206 5263	
Zviedrija	+46 2 00883979	+46 8 50619671

Drošības datu lapas (DDL) — pieejamas Illumina tīmekļa vietnē: support.illumina.com/sds.html.

Produkta dokumentācija — pieejama lejupielādei tīmekļa vietnē support.illumina.com.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122, ASV

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (ārpus Ziemeļamerikas)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Tikai pētniecības nolūkiem. Nav izmantojams diagnostikas procedūrās.

© 2021. gads Illumina, Inc. Visas tiesības paturētas.

illumina[®]