

NextSeq 1000 og 2000

Veiledning for sekvenseringssystem

ILLUMINA-PROPRIETÆR

Dokumentnr. 1000000109376 v04 NOR

April 2021

Kun til forskningsbruk. Ikke for bruk ved diagnostiske prosedyrer.

Dette dokumentet og dets innhold er opphavsrettslig beskyttet for Illumina, Inc. og tilknyttede selskaper («Illumina»), og er ment utelukkende for kontraktbruk av kunden i forbindelse med bruk av produktet (produktene) beskrevet her, og for intet annet formål. Dette dokumentet og dets innhold skal ikke brukes eller distribueres til andre formål og/eller på annen måte kommuniseres, fremlegges eller reproduseres på noen måte uten forutgående, skriftlig samtykke fra Illumina. Illumina overfører ikke noen lisens under sitt patent, varemerke, opphavsrett eller sedvanerett eller lignende rettigheter til tredjeparter gjennom dette dokumentet.

Instruksjonene i dette dokumentet skal følges strengt og tydelig av kvalifisert og tilfredsstillende utdannet personell for å sikre riktig og sikker bruk av produktet (produktene) som er beskrevet i dette dokumentet. Alt innhold i dette dokumentet skal leses fullt ut og være forstått før produktet (produktene) brukes.

HVIS DET UNNLATES Å LESE FULLSTENDIG OG UTTRYKkelig FØLGE ALLE INSTRUKSJONENE I DETTE DOKUMENTET, KAN DET FØRE TIL SKADE PÅ PRODUKTET (PRODUKTENE), SKADE PÅ PERSONER, INKLUDERT BRUKERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANNEN EIENDOM, OG DETTE VIL UGYLDIGGJØRE EVENTUELL GARANTI SOM GJELDER FOR PRODUKTET (PRODUKTENE).

ILLUMINA PÅTAR SEG IKKE ANSVAR SOM FØLGE AV FEIL BRUK AV PRODUKTET (PRODUKTENE) SOM ER BESKREVET I DETTE DOKUMENTET (INKLUDERT DELER AV DETTE ELLER PROGRAMVARE).

© 2021 Illumina, Inc. Med enerett.

Alle varemerker tilhører Illumina, Inc. eller deres respektive eiere. Ytterligere informasjon om varemerker finner du på www.illumina.com/company/legal.html.

Revisjonshistorikk

Dokumentnr.	Dato	Beskrivelse av endring
1000000109376 v04	April 2021	La til instruksjoner for å importere baselinefiler. La til DRAGEN DNA Amplicon-arbeidsprosess. La til funksjoner for NextSeq 1000/2000- kontrollprogramvare v1.3. La til informasjon om å velge en proxy-server. Oppdaterte transport- og oppbevaringstemperatur for RSB med Tween 20. Oppdaterte DRAGEN RNA-arbeidsprosess slik at den omfatter differensiell genekspressjon. Oppdaterte sekvenseringsutdatamappens struktur. Oppdaterte formateringsanbefalinger for prøveark v2.
1000000109376 v03	November 2020	Korrigerte katalognumre. La til informasjon om å legge til nye brukere.

Dokumentnr.	Dato	Beskrivelse av endring
1000000109376 v02	Oktober 2020	<p>La til NextSeq 1000/2000 P3-reagenssett.</p> <p>La til DRAGEN Single Cell RNA-arbeidsprosess.</p> <p>La til DRAGEN Enrichment-arbeidsprosess.</p> <p>La til alternativer for FASTQ-komprimering.</p> <p>La til instruksjoner for å installere DRAGEN-rør og -lisensoppdateringer.</p> <p>La til instruksjoner for å importere tilpassede referansegener.</p> <p>Oppdaterte lastevolum og konsentrasjoner for bibliotektyper.</p> <p>Oppdaterte instruksjoner for bibliotekfortynning.</p> <p>La til instruksjoner som automatisk skylling av reagenskasset.</p> <p>Oppdaterte informasjon om støttet antall sykluser.</p> <p>Oppdaterte alternativer for instrumenttilpasning.</p> <p>Oppdaterte instruksjoner for Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring).</p> <p>Oppdaterte DRAGEN-sekvenseringsutdatastruktur.</p> <p>La til informasjon om DRAGEN-kvalitetsrapporter.</p> <p>La til informasjon om å fjerne tilpassede referansegener fra harddisken.</p> <p>La til informasjon om å utføre systemkontroller.</p> <p>Oppdaterte innstillinger for prøveark v2.</p>

Dokumentnr.	Dato	Beskrivelse av endring
1000000109376 v01	Juni 2020	<p>Oppdaterte programvarebeskrivelser for NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare.</p> <p>Tydeliggjorde forskjellen mellom skybasert, hybrid-, lokal og frittstående modus gjennom hele veiledningen.</p> <p>Oppdaterte instruksjoner for oppbevaring og tining av kassett.</p> <p>Oppdaterte informasjon om antall støttede sykluser.</p> <p>Oppdaterte instruksjoner for å konfigurere sekundæranalyse.</p> <p>Oppdaterte katalognumre for reagenssett.</p> <p>Oppdaterte diagram for sekvenseringsprotokoll.</p> <p>Oppdaterte instruksjoner for å angi en nettverksstasjon som standard utdatamappe.</p> <p>Oppdaterte tabell over støttede bibliotektyper.</p> <p>La til instruksjoner for å importere et tilpasset referansegenom.</p> <p>La til instruksjoner for å konfigurere en kjøring ved hjelp av et tilpasset indekssett og et tilpasset bibliotekklargjøringssett.</p> <p>Oppdaterte krav til brukerkonto og passord.</p> <p>La til data om DRAGEN-utdatamappestruktur.</p> <p>Tydeliggjorde instruksjoner for tapping av brukte reagenser fra kassett.</p> <p>La til bakgrunnsinformasjon om Q-tabellen.</p> <p>Oppdaterte instruksjoner for installasjon av oppdateringer for kontrollprogramvare.</p> <p>La til instruksjoner om hvordan en kjøring settes i kø på nytt.</p> <p>La til instruksjoner om å oppdatere DRAGEN-rør og -lisenser.</p> <p>La til instruksjoner for instrumenttilpasning.</p> <p>Oppdaterte illustrasjoner for å gjenspeile ny merking.</p> <p>Byttet dør til deksel gjennom hele veiledningen.</p> <p>La til beskrivelse av de to Ethernet-portene.</p>

Dokumentnr.	Dato	Beskrivelse av endring
1000000109376 v00	Mars 2020	Første versjon.

Innholdsfortegnelse

Systemoversikt	1
Tilleggsressurser	1
Instrumentmaskinvare	2
Integrert programvare	5
Prosessbehandling	6
Diagram for sekvenseringsprotokoll	7
Slik fungerer sekvensering	7
Systemkonfigurasjon	10
Krav til brukerkonti	10
Konfigurere BaseSpace Sequence Hub og proaktiv støtte	12
Spesifisere standardplassering for utdatamappe	13
Importere tilpassede referansegener	17
Importere støybaselinefiler	17
Konfigurere kjøringsmodus	18
Instrumenttilpasning	19
Forbruksmateriell og utstyr	22
Forbruksmateriell for sekvensering	22
Tilhørende forbruksmateriell	26
Tilhørende utstyr	27
Protokoll	29
Ting du må ta hensyn til i forbindelse med sekvensering	29
Planlegge en sekvenseringskjøring i BaseSpace Sequence Hub	30
Tine kassetten i pose og strømningscellen	38
Fortynne biblioteker	41
Laste forbruksmateriell inn i kassetten	43
Starte en sekvenseringskjøring	45
Utdata for sekvensering	53
Oversikt over sanntidsanalyse	53
Arbeidsprosess for sanntidsanalyse	55
Sekvenseringsutdatafiler	59
Utdatafiler for DRAGEN-sekundæranalyse	60
Utdatamappestruktur for DRAGEN-sekundæranalyse	69
Vedlikehold	72
Frigjøre plass på harddisken	72
Programvareoppdateringer	72
Oppdateringer for DRAGEN-arbeidsprosesser og -lisensen	74

Skifte ut luftfilteret	76
Feilsøking	78
Løse feilmeldinger	78
Sette forbruksmateriell tilbake til oppbevaring	79
Avbryte en kjøring	79
Sette en kjøring i kø på nytt	80
Foreta en omstart av instrumentet	80
Utføre en systemkontroll	81
Gjenopprette til fabrikkinnstillinger	82
Ta bilde av installasjon	82
Gjenopprette tatt bilde	83
Ressurser og referanser	84
Innstillinger for prøveark v2	84
Mørk syklus-sekvensering	97
Indeks	100
Teknisk hjelp	104

Systemoversikt

Illumina® NextSeq™ 1000-sekvenseringssystemet og Illumina® NextSeq™ 2000-sekvenseringssystemet sørger for en målrettet tilnærming til neste generasjons sekvensering (next generation sequencing – NGS¹). Dette programfokuserte systemet pakker Illumina-sekvenseringsteknologi inn i et kostnadseffektivt skrivebordsinstrument, som tilbyr følgende funksjoner:

- **Accessibility and reliability** (Tilgjengelighet og pålitelighet) – NextSeq 1000/2000 har lokal DRAGEN-analyse, og denaturering og fortykning i instrumentet. En avbildningsmodul er innebygd i systemet, og væskekomponenter er innebygd i forbruksmateriellet, noe som gjør det enklere å vedlikeholde instrumentet.
- **Single-step consumable loading** (Ettrinns innlasting av forbruksmaterie) – En kassett til engangsbruk er forhåndsfylt med alle reagenser som kreves for en kjøring. Bibliotek og strømningscelle lastes direkte inn i kassetten, som deretter lastes inn i instrumentet. Integrert identifisering muliggjør nøyaktig sporing.
- **NextSeq 1000/2000-programvare** – En serie med integrert programvare styrer instrumentoperasjoner, behandler bilder og genererer basebetegnelser.
 - **Skybasert modus** – Planlegg kjøringen med Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) på BaseSpace Sequence Hub. Den valgte arbeidsprosessen for analyse startes automatisk i skyen. Kjøringsdata og analyseresultater gis også i skyen.
 - **Hybridmodus** – Planlegg kjøringen med Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) på BaseSpace Sequence Hub. Den valgte arbeidsprosessen for analyse startes deretter via DRAGEN på instrumentet.
 - **Lokal modus** – Planlegg kjøringen lokalt med et v2-filformat for prøveark. Den valgte arbeidsprosessen for analyse startes automatisk via DRAGEN på instrumentet.
 - **Frittstående modus** – Planlegg kjøringen uten et prøveark.

Denne delen gir en oversikt over systemet, inkludert informasjon om maskinvare, programvare og dataanalyse. Den samler dessuten nøkkelkonsepter og terminologi som er integrert i hele dokumentasjonen. Detaljerte spesifikasjoner, datablad, programmer og tilknyttede produkter finnes på [produktiden for NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemene](#) på Illuminas nettsted.

Tilleggsressurser

[Støttesidene til NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemene](#) på nettstedet til Illumina har tilleggsressurser for systemet. Disse ressursene inkluderer programvare, opplæring, kompatible produkter og følgende dokumentasjon. Sjekk alltid støttesider for de nyeste versjonene.

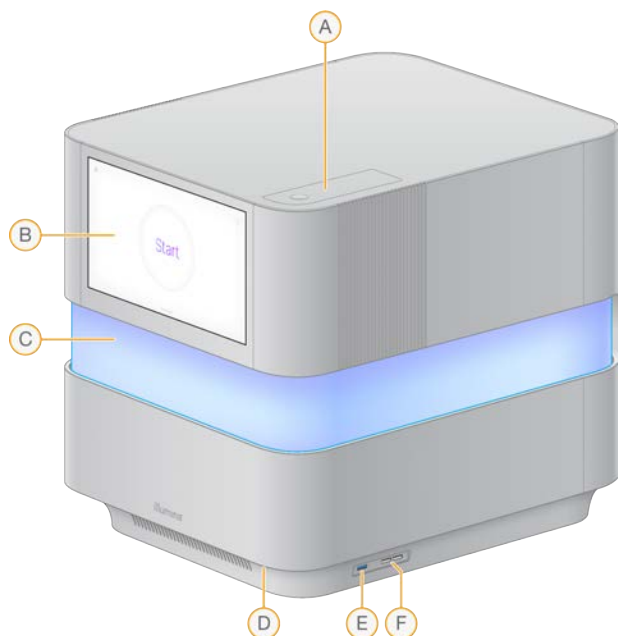
¹neste generasjons sekvensering

Ressurs	Beskrivelse
Tilpasset protokollvelger	Et verktøy for å generere ende-til-ende-instruksjoner skreddersydd til din metode for bibliotekklargjøring, kjøringsparametere og analysemetode, med muligheter for å finjustere detaljnivået.
<i>Sikkerhets- og samsvarsveiledning for NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystem (dokumentnr. 1000000111928)</i>	Gir informasjon om operative sikkerhetshensyn, samsvarserklæringer og instrumentdokumentasjon.
<i>Samsvarsveiledning for RFID-lesermodul (dokumentnr. 1000000002699)</i>	Gir informasjon om RFID-leseren i instrumentet, samsvarssertifiseringer og sikkerhetshensyn.
<i>Veiledning for denaturering og fortynning av biblioteker for NextSeq 1000 og 2000 (dokumentnr. 1000000139235)</i>	Du får instruksjoner om hvordan du denaturerer og fortynner klargjorte biblioteker for en sekvenseringskjøring manuelt, og hvordan du klargjør en valgfri PhiX-kontroll.
<i>Veiledning om tilpassede primere for NextSeq 1000- og NextSeq 2000 (dokumentnr. 1000000139569)</i>	Gir informasjon om hvordan du bytter ut Illumina-sekvenseringsprimere med tilpassede sekvenseringsprimere.
<i>Veiledning for klargjøring av stedet for NextSeq 2000-sekvenseringssystem (dokumentnr. 1000000109378)</i>	Gir spesifikasjoner for laboratorieplass, elektriske krav og miljømessige og nettverksmessige hensyn.
<i>Hjelp for BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Gir informasjon om hvordan du bruker BaseSpace™ Sequence Hub og tilgjengelige analysealternativer.
<i>Veiledning om sammenslåing av indeksadaptere (dokumentnr. 1000000041074)</i>	Gir retningslinjer for sammenslåing og strategier for dobbel indeksering.
<i>Illumina-adaptersekvenser (dokumentnr. 1000000002694)</i>	Gir lister over adaptersekvenser for Illumina bibliotekklargjøringssett.

Instrumentmaskinvare

NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemer har en på/av-knapp, monitor, statuslinje, forbruksmaterielkammer og USB-porter.

Figur 1 Eksterne systemkomponenter



- A. **Luftfilterkammer** – Gir tilgang til det utskiftbare luftfilteret.
- B. **Berøringsskjermmonitor** – Gjør konfigurasjon og oppsett mulig på instrumentet ved hjelp av kontrollprogramvarens grensesnitt.
- C. **Statuslinje** – Lysfargen utvikler seg etter hvert som systemet går gjennom arbeidsprosessen. Blå og lilla angir interaktivitet (f.eks. før kjøring-kontroller) og flerfarge angir betydningsfulle øyeblikk og data (f.eks. fullføring av sekvensering). Kritiske feil angis av et rødt lys.
- D. **På/av-knapp** – Styrer strømmen til instrumentet og angir om systemet er på (lyser), av (mørk) eller av, men med vekselstrøm (blinker).
- E. **3.0 USB-port** – For tilkobling av en ekstern bærbar stasjon for dataoverføring.
- F. **2.0 USB-porter** – For tilkobling av en mus og et tastatur.

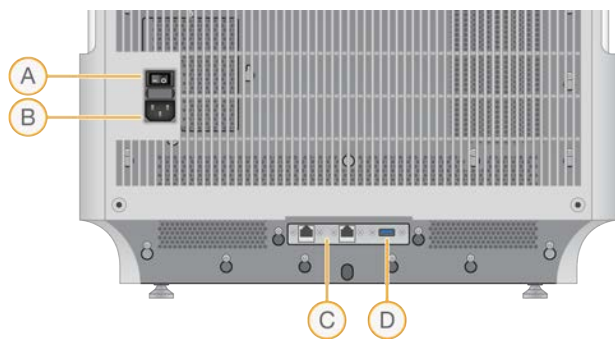
Strøm- og hjelpetilkoblinger

Du kan flytte forsiktig på instrumentet for å få tilgang til av/på-bryteren, USB-port og andre hjelpekoblinger bak på instrumentet.

Bak på instrumentet er det en bryter og et inntak som styrer strøm til instrumentet, samt to Ethernet-porter for en valgfri Ethernet-tilkobling. En 3.0 USB-port gjør det mulig å koble til en ekstern bærbar stasjon for dataoverføring (exFAT støttes ikke på denne Linux-baserte plattformen).

NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemer leveres utstyrt med to Ethernet-porter for å gi systemet mer kapasitet og gjøre det mer fleksibelt. For eksempel kan en Ethernet-port være tilegnet kommunikasjon med en intern nettverksstasjon, og den andre porten tilegnet ekstern kommunikasjon som f.eks BaseSpace Sequence Hub eller proaktiv støtte.

Figur 2 Komponenter på baksiden

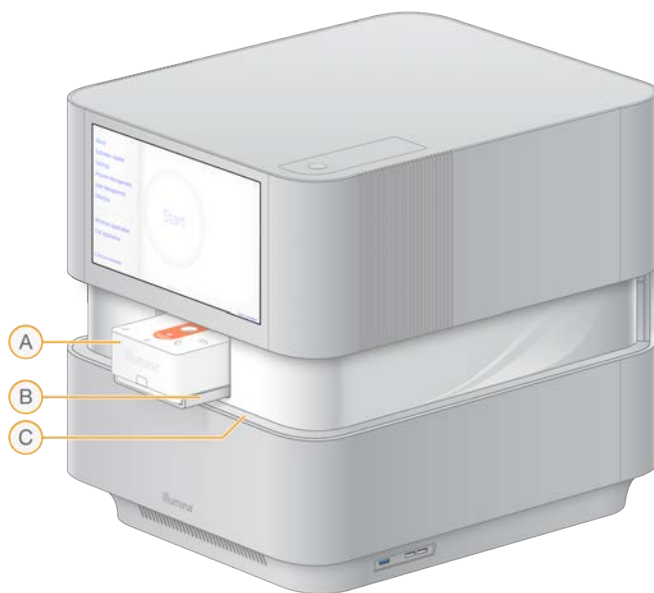


- A. **Vekslebryter** – Slår strømmen til instrumentet på og av.
- B. **Strøminntak** – Tilkobling av strømledning.
- C. **Ethernet-porter (2)** – Valgfri tilkobling av Ethernet-kabel.
- D. **3.0 USB-port** – For tilkobling av en ekstern harddisk for dataoverføring.

Forbruksmateriellkammer

Forbruksmateriellkammeret inneholder kassetten, inkludert strømningscellen og det fortynnede biblioteket, for en sekvenseringskjøring.

Figur 3 Lastet forbruksmateriellkammer



- A. **Kassett** – Inneholder strømningscellen, biblioteket og reagensene, og samler opp brukte reagenser under kjøringen.
- B. **Brett** – Rommer kassetten under sekvensering.
- C. **Deksel** – Åpner seg slik at du får tilgang til forbruksmateriellkammeret.

Integrert programvare

Instrumentprogramvaren inneholder integrerte programmer som utfører sekvenseringskjøringer og analyse.

- **NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare** – Styrer instrumentoperasjoner og gir et grensesnitt for konfigurasjon av systemet, oppsett av en sekvenseringskjøring og overvåking av kjøringsstatistikk etter hvert som sekvensering går fremover.
- **Sanntidsanalyse (RTA3)** – Utfører bildeanalyse og basebetegnelse under kjøringen. Mer informasjon finnes under [Utdata for sekvensering på side 53](#).
- **Universal Copy Service** – Kopierer utdatafiler for sekvensering fra kjøringsmappen til BaseSpace Sequence Hub (hvis det er aktuelt) og utdatamappen, hvor du kan oppnå tilgang til dem.

Kontrollprogramvaren er interaktiv, og kjører automatiserte bakgrunnsprosesser. Sanntidsanalyse og Universal Copy Service kjører kun bakgrunnsprosesser.

Systeminformasjon

Velg kontrollprogramvaremenyen øverst i venstre hjørne for å åpne delen About (Om). Delen About (Om) inneholder Illumina-kontaktinformasjon og følgende systeminformasjon:

- Instrumentets serienummer
- Datamaskinnavn
- Systemserieversjon
- Bildeoperativsystemversjon
- Totalt kjøringsantall

Meldinger og varsler

Varslingsikonet er plassert øverst i høyre hjørne. Når det oppstår en advarsel eller feil, glir høyre panel ut for å angi varslinger. Velg når som helst ikonet hvis du vil se en liste over varslingene Current (Aktuelle) eller Historic (Historiske) for advarsler og feil.

- Advarsler krever oppmerksomhet, men verken stopper en kjøring eller krever annen handling enn kvittering.
- Feil krever handling før du kan starte eller fortsette med en kjøring.

Minimere kontrollprogramvaren

Oppnå tilgang til andre programmer ved å minimere kontrollprogramvaren. Du kan for eksempel bla til utdatamappen i Filutforsker, eller finne et prøveark.

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Minimize Application** (Minimer program). Kontrollprogramvaren minimeres.

2. Hvis du vil maksimere kontrollprogramvaren, velger du **NextSeq 1000/2000 Control Software** (NextSeq1000/2000-kontrollprogramvare) på verktøylinjen.

Prosessbehandling

Skjermbildet Process Management (Prosessbehandling) viser midlertidige kjøring som er lagret på `/usr/local/illumina/runs`. Hver kjøring identifiseres med kjøringens dato, navn og ID. Informasjon, f.eks. status for Run (Kjøring), Secondary Analysis (Sekundæranalyse), Output Folder (Utdatamappe) og Cloud (Sky), vises også for hver kjøring. Velg kjøringen for å vise tilleggsinformasjon, deriblant Workflow (Arbeidsprosess), Average % Q30 (Gjennomsnittlig % Q30), Total Reads PF (PF-avlesninger totalt) og Total Yield (Total produksjon). Informasjon om hvordan du sletter kjøring og frigjør plass finnes under [Frigjøre plass på harddisken på side 72](#). Informasjon om hvordan du setter en analyse på instrumentet i kø på nytt finnes under [Sette en kjøring i kø på nytt på side 80](#).

Kjøringsstatus

Denne delen viser sekvenseringskjøringens status:

- **In progress** (Pågå) – Sekvenseringskjøring pågå.
- **Complete** (Fullført) – Sekvenseringskjøringen er fullført.
- **Stopped** (Stoppet) – Sekvenseringskjøringen ble stoppet.
- **Errored** (Med feil) – Sekvenseringskjøringen har en feil.

Status for sekundæranalyse

Denne delen viser statusen for DRAGEN-sekundæranalysen på instrumentet. Dette vil vise N/A (I/A) hvis en analyse pågår i BaseSpace Sequence Hub.

- **Not Started** (Ikke startet) – DRAGEN-analysen har ikke startet.
- **In Progress** (Pågå) – DRAGEN-analysen pågå.
- **Stopped** (Stoppet) – DRAGEN-analysen er stoppet.
- **Errored** (Med feil) – DRAGEN-analysen har en feil.
- **Complete** (Fullført) – DRAGEN-analysen er fullført.

Status for utdatamappe

Denne delen viser statusen for filer som kopieres til utdatamappen:

- **In Progress** (Pågå) – Filer blir kopiert til utdatamappen.
- **Complete** (Fullført) – Filer er kopiert til utdatamappen.

Skystatus (BaseSpace Sequence Hub)

Delen viser statusen for filer som lastes opp til BaseSpace Sequence Hub via skyen:

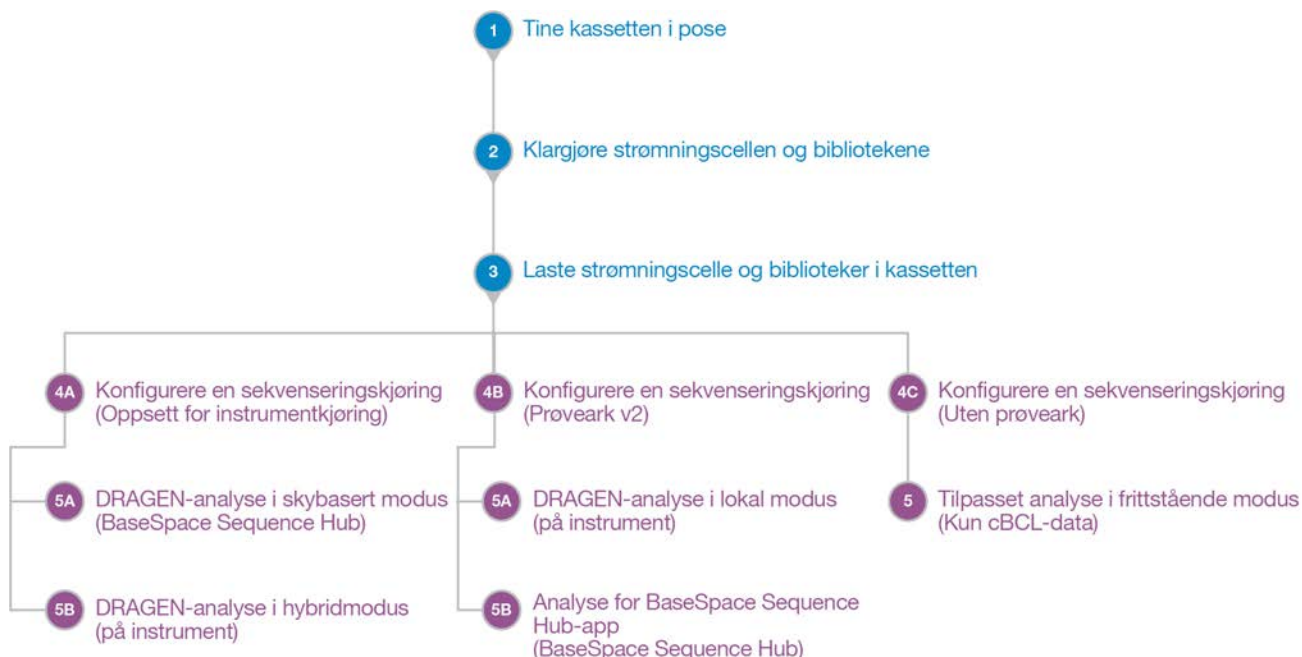
- **In Progress** (Pågår) – Kontrollprogramvaren laster opp filer til BaseSpace Sequence Hub.
- **Complete** (Fullført) – Filer er lastet opp til BaseSpace Sequence Hub.

Feilsøke et statusproblem

- Hvis kjøringen pågår, lukker du skjermbildet Process Management (Prosessbehandling), venter i ca. fem minutter og åpner det på nytt.
- Hvis ikke kjøringen pågår, foretar du en omstart av instrumentet, og deretter åpner du skjermbildet Process Management (Prosessbehandling) på nytt. Se [Foreta en omstart av instrumentet på side 80](#).

Diagram for sekvenseringsprotokoll

Diagrammet som følger illustrerer sekvenseringsprotokollen ved hjelp av NextSeq 1000/2000.



Slik fungerer sekvensering

Klyngegenerering, sekvensering og analyse omfatter sekvensering på NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemene. Hvert trinn skjer automatisk under en sekvenseringskjøring. Avhengig av systemkonfigurasjonen utføres ytterligere analyse utenfor instrumentet etter at kjøringen er fullført.

Klyngegenerering

Bibliotek¹ denatureres automatisk til enkle strenger, og fortynnes ytterligere i instrumentet. Under klyngegenerering blir enkle DNA-molekyler bundet til overflaten på strømningscellen og forsterket for å danne klynger². Klyngegenerering tar ~4 timer.

Sekvensering

Klynger blir avbildet ved hjelp av tokanals kjemi, én grønn kanal og én blå kanal, for å kode data for de fire nukleotidene. Etter at én flis på strømningscellen er avbildet, avbildes den neste flisen. Prosessen gjentas for hver sekvenseringscyklus (~5 minutter per syklus). Etter bildeanalysen utfører programvaren for sanntidsanalyse basebetegnelse³, filtrering og kvalitetsscoreing.⁴

Primæranalyse

Utover i kjøringen overfører kontrollprogramvaren basebetegnelsesfiler⁵ (*.cbcl) til den spesifiserte utdatamappen for dataanalyse. Under sekvenseringskjøringen utfører programvaren for sanntidsanalyse (RTA3) bildeanalyse, basebetegnelse og demultipleksing⁶. Når sekvensering er fullført, begynner sekundæranalyse. Metoden for sekundær dataanalyse avhenger av programmet og systemkonfigurasjonen.

Sekundæranalyse

BaseSpace Sequence Hub er Illumina-skyberegningssmiljø for kjøringsovervåking, dataanalyse, lagring og samarbeid. Det er vert for DRAGEN- og BaseSpace Sequence Hub-apper, som støtter vanlige analysemetoder for sekvensering.

Etter at den innledende sekvenseringsanalysen er fullført, utfører DRAGEN en sekundæranalyse ved å bruke et av de tilgjengelige analyserørene.

¹En DNA- eller RNA-prøve som har adaptere festet for sekvensering. Klargjøringsmetoder varierer.

²En klonal gruppe av DNA-strenger på en strømningscelle som produserer én sekvenseringsavlesning. Hver DNA-streng på en strømningscelle gir opphav til en mal som forsterkes til klyngen består av hundrevis eller tusenvis av kopier. For eksempel produserer en strømningscelle med 10 000 klynger 10 000 enkeltavlesninger eller 20 000 paired-end-avlesninger.

³Bestemmer en base (A, C, G eller T) for hver klynge i en flis ved en spesifikk syklus.

⁴Beregner et sett med kvalitetsprediktorer for hver basebetegnelse, og bruker deretter prediktorverdien for å slå opp Q-scoren.

⁵Inneholder basebetegnelsen og tilhørende kvalitetsscore for hver klynge i hver sekvenseringscyklus.

⁶En analyseprosess som differensierer avlesninger for hvert bibliotek i en blanding.

Ved bruk av skybasert modus eller hybridmodus henter DRAGEN prøveark, referansegenom og kjøringssinndatafiler fra Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) i BaseSpace Sequence Hub. I skybasert modus lastes cBCL-data automatisk opp til BaseSpace Sequence Hub, og BaseSpace Sequence Hub starter DRAGEN-sekundæranalyse. I hybridmodus utføres DRAGEN-sekundæranalyse på instrumentet, og utdatafiler kan lagres i en valgt mappe eller i skyen.

Ved bruk av lokal modus henter DRAGEN prøvearket, referansegenomet og kjøringssinndatafilene som følger med fra NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemene. DRAGEN-sekundæranalyse utføres på instrumentet, og utdatafiler lagres i en valgt utdatamappe. Hvis Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring) er valgt, kan analyse også startes via BaseSpace Sequence Hub-apper etter at sekvensering er fullført.

I frittstående modus konfigureres en kjøring uten et prøveark. Denne arbeidsprosessen anbefales som arbeidsprosess for tilpassede analyser som starter fra cBCL-data.

- Mer informasjon om BaseSpace Sequence Hub finnes under [Elektronisk hjelp for BaseSpace Sequence Hub](#).
- Mer informasjon om DRAGEN finnes på [støttesiden for DRAGEN Bio-IT-plattformen](#).
- En oversikt over alle apper finnes under [BaseSpace-apper](#).

Systemkonfigurasjon

Denne delen gir instruksjoner om hvordan du konfigurerer systemet, inkludert beskrivelser av programvareinnstillinger.

Disse instruksjonene beskriver hovedsakelig kontrollprogramvaren, med litt informasjon om konfigurasjon av nettverket og operativsystemet.

i | Hvis du bruker Google Chrome på instrumentet, blir du bedt om å låse opp innloggingsnøkkelringen. Du kan trygt ignorere og fjerne meldingen.

Krav til brukerkonti

Linux-operativsystemet har tre konti:

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

Administratorkontoen er kun ment for å iverksette systemoppdateringer, f.eks. oppdatering av NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare, eller for bruk av IT-ansatte for å montere en vedvarende nettverksstasjon.

Utfør alle andre funksjoner, deriblant sekvensering, fra brukerkontoen.

Passordkrav

Feltserviceteknikeren setter i gang en passordendring for alle tre konti etter at instrumentinstallasjonen er fullført. Oppdater hvert passord hver 180. dag, når du blir bedt om det.

Tabell 1 Standard passordpolicyer

Policy	Innstilling
Tving passordhistorikk	Husker fem passord
Terskel for låsing	Ti ugyldige påloggingsforsøk
Minimum passordlengde	Ti tegn
Minimum tegnvariasjon	Tre hver av: tall, store bokstaver, små bokstaver og symbol
Maksimalt gjentatte tegn	Tre tegn

Policy	Innstilling
Passord må oppfylle kravene til kompleksitet	Deaktivert
Lagre passord med reversibel kryptering	Deaktivert

Legge til en ny bruker

1. Logg inn på ilmnadmin.
2. Velg på/av-knappen, og åpne deretter rullegardinlisten ilmnadmin.
3. Velg **Account Settings** (Kontoinnstillinger).
4. Velg **Unlock** (Lås opp), og deretter angir du passordet for ilmnadmin.
5. Velg **Add User** (Legg til bruker).
6. Velg kontotypen Standard, og angi deretter et nytt brukernavn.
7. Velg **Set password now** (Konfigurer passord nå), og angi deretter et passord.
8. Velg **Add** (Legg til).
Den nye brukeren legges til i listen Users (Brukere).
9. Gi brukeren tilgang til NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren på følgende måte.
 - a. Åpne terminalen.
 - b. Angi følgende:

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <nytt brukernavn>
```
 - c. Hvis du blir bedt om det, angir du passordet for ilmnadmin.
10. Bekreft at brukertillatelsene ble konfigurert ved å gjøre følgende.
 - a. Logg inn på den nye brukerkontoen.
 - b. Naviger til NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren.
 - c. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
 - d. Under Default Output Folder (Standard utdatamappe) må du sørge for at du kan velge og lagre utdatamappebanen.
Hvis du kan velge og lagre utdatamappebanen uten feil, er tillatelsene konfigurert.

Tilbakestille passord

Denne delen forklarer hvordan du tilbakestiller passordet for ilmnuser, ilmnadmin eller root. Det er ikke mulig å gjenopprette passord. Tilbakestilling av passordet ditt omgår ikke kontolåsing etter for mange feil passordforsøk. Du må vente i 10 minutter før du kan tilbakestille passordet eller prøve å logge inn.

Tilbakestille passord for ilmnuser

Du kan tilbakestille passordet for ilmnuser hvis du kjenner til passordet for ilmnadmin eller root.

1. Logg inn på ilmnadmin.

2. Åpne terminalen.
3. Angi `sudo passwd ilmnuser`.
4. Angi passordet for ilmnadmin når du blir bedt om det.
5. Angi et nytt passord for ilmnaduser når du blir bedt om det.
6. Bekreft det nye passordet for ilmnuser ved å skrive det inn på nytt når du blir bedt om det.

Tilbakestille passord for ilmnadmin

Du kan tilbakestille passordet for ilmnadmin hvis du kjenner til passordet for root.

1. Logg inn på root.
2. Åpne terminalen.
3. Angi `passwd ilmnadmin` for å endre passordet for ilmadmin, eller `passwd ilmnuser` for å endre passordet for ilmnuser.
4. Angi det nye passordet når du blir bedt om det.
5. Bekreft det nye passordet ved å skrive det inn på nytt når du blir bedt om det.

Tilbakestille passord for root

Tilbakestill passordet for root ved å benytte ett av følgende alternativer:

- Hvis du vet passordet fra det siste OS-bildet ble tatt, kan du gjenopprette det lagrede bildet.
- Hvis du ikke husker passordet, kontakter du teknisk støtte hos Illumina.

Konfigurerer BaseSpace Sequence Hub og proaktiv støtte

Bruk følgende instruksjoner til å konfigurere BaseSpace Sequence Hub og proaktiv støtte på systemet. Informasjon om hvordan du konfigurerer en BaseSpace Sequence Hub-konto finnes under [Elektronisk hjelp for BaseSpace Sequence Hub](#).

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
2. For innstillinger for BaseSpace Sequence Hub og proaktiv støtte velger du ett av følgende alternativer:

Alternativ	Beskrivelse og krav
Proactive Support Only (Kun proaktiv støtte)*	Send instrumentytelsesdata til Illumina for raskere feilsøking. Krever en Internett-tilkobling.

Alternativ	Beskrivelse og krav
Proactive and Run Monitoring (Proaktiv og kjøringsovervåking)	Send InterOp- og loggfiler til BaseSpace Sequence Hub for fjernkjøringsovervåking. Dette alternativet er standard. Krever en BaseSpace Sequence Hub-konto og en Internett-tilkobling.
Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring)	Send InterOp-filer, loggfiler og kjøningsdata til BaseSpace Sequence Hub for fjernovervåking og analyse. Krever en BaseSpace Sequence Hub-konto, en Internett-tilkobling og et prøveark.
None (Ingen)	Koble kjøringene fra BaseSpace Sequence Hub-konti, og ikke send instrumentytelsesdata til Illumina proaktiv støtte.

* Avhengig av kontrollprogramvareversjonen, kan navnet på denne innstillingen i programvaregrensesnittet avvike fra navnet i denne håndboken.

Når alle alternativer bortsett fra None (Ingen) er valgt, er proaktiv støtte aktivert. Dette er en gratistjeneste som gjør at du kan se ytelsesdataene dine på MyIllumina kundeinstrumentbord og gjør at Illuminas serviceteam kan feilsøke problemer raskere.



Proactive and Run Monitoring (Proaktiv og kjøringsovervåking) er slått på som standard. Velg bort denne tjenesten ved å velge **None** (Ingen).

- Hvis du valgte None (Ingen) i trinn 2, velger du **Save** (Lagre) for å avslutte. Ellers fortsetter du til og med trinn 6.
- I listen Hosting Location (Vertsplassering) velger du plasseringen til BaseSpace Sequence Hub-serveren som data lastes opp til.
Bruk vertsplasseringen som er nærmest der du holder til.
- Hvis du har et Enterprise-abonnement, angir du domenenavnet (URL-adressen) som brukes til BaseSpace Sequence Hub-kontoen din.
For eksempel: <https://yourlab.basespace.illumina.com>.
- Velg **Save** (Lagre).

Spesifisere standardplassering for utdatamappe

Bruk instruksjonene i denne delen til å velge en standardplassering for utdatamappe. Du kan endre utdatamappen for hver kjøring under kjøningsoppsett. Programvaren lagrer cBCL-filer¹ og andre kjøningsdata i utdatamappen.

¹Inneholder basebetegnelsen og tilhørende kvalitetsscore for hver klynge i hver sekvenseringssyklus.

Det er nødvendig med en utdatamappe med mindre BaseSpace Sequence Hub er konfigurert for Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring). Bruk kun en ekstern eller nettverksstasjon som standard utdatamappe. Å bruke en utdatamappe på instrumentet har negativ innvirkning på sekvenseringskjøringen.

Angi en ekstern stasjon som utdatamappe

Bruk følgende instruksjoner for å velge en ekstern bærbar stasjon som standard utdatamappe. Det anbefales å brukes en batteridrevet stasjon som er formatert til NFTS eller GPT/EXTA.

1. Koble til en ekstern bærbar stasjon ved hjelp av 3.0 USB-porten på siden eller baksiden av instrumentet.
Kontroller at den eksterne bærbare stasjonen tillater skrive tillatelser. Hvis den er konfigurert som Read Only (Skrivebeskyttet), kan ikke kontrollprogramvaren lagre data til den.
2. Opprett en ny mappe på den eksterne bærbare stasjonen. Denne mappen vil bli standard utdatamappeplassering.
NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare krever minst to nivåer av nestede mapper for å gjenkjenne plasseringen som en ekstern bærbar stasjon.
3. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
4. Under Default Output Folder (Standard utdatamappe) velger du den eksisterende mappebanen og navigerer til den nye mappen på den eksterne bærbare stasjonen.
5. **[Valgfritt]** Hvis du har valgt **Online Run Setup** (Kjøringsoppsett på nettet) under Run Mode (Kjøringsmodus), velger du et alternativ i rullegardinmenyen Hosting Location (Vertsplassering).
6. Velg **Save** (Lagre).

Angi en standard utdatamappe for nettverksstasjon

Bruk følgende instruksjoner for å montere en fast nettverksstasjon og angi standard utdatamappeplassering. Servermeldingsblokk (SMB) / Common Internet File Systems (CIFS) og Network File System (NFS) er de eneste metodene som støttes for fast montering av en nettverksstasjon på NextSeq 1000/2000.

Monteringsinstruksjoner for SMB/CIFS

1. Hvis NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare er åpen, velger du **Minimize Application** (Minimer program).
2. Logg inn på ilmnadmin.
3. Velg **Applications** (Programmer).
4. Velg **Terminal** under Favorites (Favoritter).
5. Angi `sudo touch /root/.smbcreds`, og deretter velger du **Enter**.
6. Skriv inn ilmnadmin-passordet når du blir bedt om det.
ilmnadmin-passordet kreves hver gang du bruker en `sudo`-kommando.

7. Angi `sudo gedit /root/.smbcreds`, og velg deretter **Enter** for å åpne tekstfilen som heter `smbcreds`.
8. Når tekstfilen `.smbcreds` åpnes, angir du innloggingsinformasjonen for nettverket i følgende format.

```
username=<user name>
password=<password>
domain=<domain_name>
```

Hakeparenteser er ikke nødvendig for brukernavn-, passord- og domenelegitimasjon. Domenelegitimasjon er kun nødvendig hvis den eksterne kontoen er del av et domene.
9. Velg **Save** (Lagre), og gå ut av filen.
10. Identifiser servernavnet og delenavnet til SMB/CIFs-serveren. Servernavnet og delenavnet kan ikke ha mellomrom, for eksempel:
Servernavn: `192.168.500.100` eller `Myserver-myinstitute-03`
Delenavn: `/share1`
11. I terminalen angir du `sudo chmod 400 /root/.smbcreds`, og deretter velger du **Enter** for å gi tilgang til tekstfilen `.smbcreds`.
12. Angi `sudo mkdir /mnt/<local name>`.
`<local name>` er navnet på den nye katalogen i nettverksstasjonen, og kan inneholde mellomrom. Dette er katalogen som vises på instrumentet.
13. Velg **Enter**.
14. Angi `sudo gedit /etc/fstab`, og deretter velger du **Enter**.
15. Når `fstab`-filen åpnes, angir du følgende på slutten av filen, og deretter velger du **Enter**.

```
//<Server name>/<Share name> /mnt/<local name> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```
16. Velg **Save** (Lagre), og gå ut av filen.
17. I terminalen angir du `sudo mount -a -vvv`, og deretter velger du **Enter**.
Nettverksstasjonen er nå montert som `/mnt/<local name>`.
18. Bekreft om monteringen var vellykket ved å angi `<df | grep <local name>>` og deretter velge **Enter**.
Navnet på fildelingen skal vises.
19. Angi `sudo mkdir /mnt/<local name>/<output directory>` for å oppgi en undermappe i den lokale katalogen. `<output directory>` representerer standard utdatamappeplassering. NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare krever minst to nivåer av nastede mapper for å gjenkjenne plasseringen som en montert nettverksstasjon.
20. Foreta en omstart av instrumentet. Se [Foreta en omstart av instrumentet på side 80](#).
21. Konfigurer den faste monterte nettverksstasjonen som standard utdatamappe. Se [Angi den faste nettverksstasjonen som standard utdatamappe på side 16](#).

Monteringsinstruksjoner for NFS

1. Hvis NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare er åpen, velger du **Minimize Application** (Minimer program).
2. Logg inn på ilmnadmin.
3. Identifiser servernavnet til NFS-serveren.
Servernavnet kan ikke ha mellomrom, for eksempel:
Servernavn: 192.168.500.100 eller Myserver-myinstitute-03
4. Velg **Applications** (Programmer).
5. Velg **Terminal** under Favorites (Favoritter).
6. Angi `sudo mkdir /mnt/<local name>`, og deretter velger du **Enter**.
<local name> er navnet på den nye katalogen i nettverksstasjonen.
7. Angi `sudo gedit /etc/fstab`, og deretter velger du **Enter**.
8. Når fstab-filen åpnes, angir du følgende, og deretter velger du **Enter**.
`Servernavn:/share //mnt/<local name> nfs x-systemd.automount,defaults 0 0`
9. Velg **Save** (Lagre), og gå ut av filen.
10. I terminalen angir du `sudo mount -a -vvv`, og deretter velger du **Enter**.
Nettverksstasjonen er nå montert i `/mnt/directory` i mappen <local name>.
11. Opprett en ny <sub folder> i mappen <local name>. Undermappen representerer standard utdatamappeplassering.
NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare krever minst to nivåer av nestede mapper for å gjenkjenne plasseringen som en montert nettverksstasjon.
12. Foreta en omstart av instrumentet. Se [Foreta en omstart av instrumentet på side 80](#).
13. Konfigurer den faste monterte nettverksstasjonen som standard utdatamappe. Se [Angi den faste nettverksstasjonen som standard utdatamappe på side 16](#).

Angi den faste nettverksstasjonen som standard utdatamappe

1. Logg inn på ilmnuser.
2. I NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
3. Under Default Output Folder (Standard utdatamappe) velger du den monterte faste nettverksstasjonen som er plassert under `/mnt/<local name>/<output directory>`.
4. **[Valgfritt]** Hvis du har valgt **Online Run Setup** (Kjøringsoppsett på nettet) under Run Mode (Kjøringsmodus), velger du et alternativ i rullegardinmenyen Hosting Location (Vertsplassering).
5. Velg **Save** (Lagre).

Importere tilpassede referansegenomer

Nye tilpassede referansegenomer kan kun importeres ved hjelp av administratorkontoen. Du finner en liste over alle kompatible referansegenomer ved å gå inn på siden Kompatibilitet for NextSeq 1000/2000-produkter.

1. Opprett et referansegenom ved å bruke BaseSpace Sequence Hub-appen Referanseverktøy for Illumina-instrumenter. Mer informasjon finnes under *Elektronisk apphjelp for referanseverktøy for Illumina-instrumenter v1.0.0*.
2. Velg kontrollprogramvaremenyen, og velg deretter **Process Management** (Prosessbehandling).
3. Kontroller at det ikke pågår sekvenseringskjøringer eller sekundæranalyser på instrumentet.
4. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Minimize Application** (Minimer program).
5. Logg inn på ilmnadmin.
6. Velg kontrollprogramvaremenyen, og velg deretter **DRAGEN**.
7. I delen Genome (Genom) velger du **View Installed Genomes** (Vis installerte genomer) for å vise en liste over alle installerte Illumina- og tilpassede genomer.
8. Lukk modalen.
9. Velg **Choose** (Velg) under Import New Reference Genomes (Importer nye referansegenomer), naviger til referansegenomfilen (*.tar.gz) på den bærbare eller monterte nettverksstasjonen, og deretter velger du **Open** (Åpne).
10. Velg **Import** (Importer).

Importere støybaselinefiler

Hvis du bruker DRAGEN Enrichment-arbeidsprosessen i somatisk modus, kan du benytte et støybasefilter til å filtrere bort sekvenserings- eller systemstøy. Du kan laste ned standard, tilpassede støyfiler fra [Illuminas nettsted for kundestøtte](#) eller opprette en tilpasset støybaselinefil.

Generere en tilpasset støybaselinefil

Hvis du bruker somatisk modus, kan du generere en tilpasset støybaselinefil. Støybaselinefilen lages ved hjelp av normale prøver som ikke samsvarer med pasienten prøvene er fra. Det anbefalte antallet normale prøver er 50.

Bruk én av følgende metoder for å generere en tilpasset støybaselinefil:

- Bruk DRAGEN Bio-IT-plattformserveren. Instruksjoner finnes i *Elektronisk hjelp* for DRAGEN Bio-IT-plattformen.
- Bruk appen DRAGEN-baselineverktøy på BaseSpace Sequence Hub. Bruk BCL Convert-røret i Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) på BaseSpace Sequence Hub for å generere FASTQ-filer. Etter at sekvenseringskjøringen er fullført og 50 prøver er tilgjengelige, mater du FASTQ-filene inn i appen DRAGEN-baselineverktøy.

Importere baselinefiler ved hjelp av brukergrensesnittet

Etter å ha importert baselinefilen, kan du konfigurere sekvenseringskjøringen ved hjelp av DRAGEN Enrichment-arbeidsprosessen i somatisk modus.

1. Last ned en standard baselinefil fra [Illuminas nettsted for kundestøtte](#), eller last ned den tilpassede baselinefilen fra DRAGEN-serveren eller appen DRAGEN-baselineverktøy.
2. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Minimize Application** (Minimer program).
3. Logg inn på ilmnadmin.
4. Velg **Applications** (Programmer), og velg deretter **Favorites** (Favoritter).
5. Velg **+Other Locations** (+Andre plasseringer), og velg deretter **Computer** (Datamaskin).
6. Dobbeltklikk på **usr** og deretter **local** (lokal).
7. Dobbeltklikk på **illumina** og deretter **aux_files**.
8. Dra støybaselinefilen til **aux_files**.

Importere baselinefiler ved hjelp av terminal

Etter å ha importert baselinefilen, kan du konfigurere sekvenseringskjøringen ved hjelp av DRAGEN Enrichment-arbeidsprosessen i somatisk modus.

1. Last ned en standard baselinefil fra [Illuminas nettsted for kundestøtte](#), eller last ned den tilpassede baselinefilen fra DRAGEN-serveren eller appen DRAGEN-baselineverktøy.
2. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Minimize Application** (Minimer program).
3. Logg inn på ilmnadmin.
4. Velg **Applications** (Programmer).
5. Velg **Terminal** under Favorites (Favoritter).
6. Angi følgende kommando.

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

Konfigurere kjøringsmodus

Kjøringsmodus gjelder for alle kjøring og bestemmer hvor du skal angi kjøringsparametere og hvordan data skal analyseres.

Skybasert eller hybridmodus

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
2. Velg **Online Run Setup** (Kjøringsoppsett på nettet) under BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support (Tjenester og proaktiv støtte for BaseSpace Sequence Hub).
3. Konfigurer tilleggsinnstillinger på riktig måte ved å velge følgende:
 - a. **Proactive and Run Monitoring** (Proaktiv og kjøringsovervåking) eller **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring).

- b. Rullegardinmeny for **Hosting Location** (Vertsplassering).
 - c. **[Valgfritt]** Angi et **Private Domain Name** (Privat domenenavn).
4. Velg **Save** (Lagre).

Lokal eller frittstående modus

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
2. Velg **Lokal Run Setup** (Lokalt kjøringsoppsett) under BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support (Tjenester og proaktiv støtte for BaseSpace Sequence Hub).
3. Konfigurer tilleggsinnstillinger på riktig måte ved å velge følgende:
 - a. **Proactive Support Only** (Kun proaktiv støtte), **Proactive and Run Monitoring** (Proaktiv og kjøringsovervåking), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring) eller **None** (Ingen).



BaseSpace Sequence Hub vil kun tillate funksjonalitet for å sette i kø på nytt hvis **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring) er valgt. Hvis det skulle være et ugyldig prøveark, vil dette gjøre det mulig å foreta rettelser på prøvearket og sette demultiplekseringsanalyse i kø på nytt. Informasjon om funksjonalitet for å sette i kø på nytt på instrumentet finnes under [Sette en kjøring i kø på nytt på side 80](#).

- b. Rullegardinmeny for **Hosting Location** (Vertsplassering).
 - c. **[Valgfritt]** Angi et **Private Domain Name** (Privat domenenavn).
4. Velg **Save** (Lagre).

Prøvearkhensyn for lokal eller frittstående modus

Du må bruke v2-filformatet for prøveark når du skal analysere med DRAGEN. v2-filformatet for prøveark er også kompatibelt med BaseSpace Sequence Hub-apper som ikke er DRAGEN-aktivert. Informasjon om hvordan et prøveark opprettes i v2-filformatet finnes under [Innstillinger for prøveark v2 på side 84](#).

Instrumenttilpasning

Denne delen inneholder informasjon om konfigurering av tilgjengelige tilpasningsinnstillinger. Informasjon om hvordan du konfigurerer en standard utdatamappe finnes under [Spesifisere standardplassering for utdatamappe på side 13](#).

Navngi instrumentet

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
2. Velg Instrument Nickname (Instrumentets kallenavn), og angi et foretrukket navn for instrumentet. Navnet vises øverst i hvert skjermbilde.

3. Velg **Save** (Lagre).

Konfigurere innstillinger for denaturering og fortynning

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
2. Velg om du vil at biblioteker skal denatureres og fortynnes automatisk i instrumentet. Innstillingen er som standard alternativet som er valgt for den forrige kjøringen.
 - Hvis du vil denaturere og fortynne biblioteker automatisk i instrumentet, velger du avmerkingsboksen **Denature and Dilute On Board** (Denaturere og fortynne i instrumentet).
 - Hvis du vil denaturere og fortynne biblioteker manuelt, velger du bort avmerkingsboksen **Denature and Dilute On Board** (Denaturere og fortynne i instrumentet).Instruksjoner om manuell denaturering og fortynning av biblioteker finnes i *Veiledning for denaturering og fortynning av biblioteker for NextSeq 1000 og 2000 (dokumentnr. 1000000139235)*.

Konfigurere innstillinger for automatisk reagensskylling

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
2. Velg om systemet automatisk skal rense ubrukte reagenser til kammeret for brukte reagenser etter hver kjøring for å effektivisere avfallshåndtering av reagens etter fullført kjøring:
 - Hvis du vil skylle automatisk, velger du avmerkingsboksen **Purge Reagent Cartridge** (Skyll reagenskasset).
 - Hvis du vil hoppe over automatisk rensing, velger du bort avmerkingsboksen **Purge Reagent Cartridge** (Skyll reagenskasset) (dette er standardinnstilling).Arbeidsprosessen tar opptil 2 timer lenger hvis brukte reagenser skal skylles bort.
3. Velg **Save** (Lagre).

Konfigurere programvareoppdateringer

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
2. Velg om systemet skal se etter programvareoppdateringer automatisk:
 - Vil du se automatisk, velger du avmerkingsboksen **Autocheck for software updates** (Se etter programvareoppdateringer automatisk).
 - Vil du se manuelt, velger du bort avmerkingsboksen **Autocheck for software updates** (Se etter programvareoppdateringer automatisk).Å se etter programvareoppdateringer automatisk krever en Internett-tilkobling. Mer informasjon om å installere programvareoppdateringer finnes under [Programvareoppdateringer på side 72](#).
3. Velg **Save** (Lagre).

Endre lysstyrke for LCD-skjermen

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
2. Flytt glidebryteren LCD Brightness (Lysstyrke for LCD-skjerm) til ønsket prosentandel.
3. Velg **Save** (Lagre).

Konfigurere en proxy-server

Proxy-serverstøtte er kun tilgjengelig i NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare v1.3.

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Settings** (Innstillinger).
2. Velg de aktuelle proxy-innstillingene for å åpne skjermbildet Proxy Settings (Proxy-innstillinger).
3. Velg avmerkingsboksen **Enable Proxy** (Aktiver proxy), og angi deretter serverens IP-portadresse.
4. **[Valgfritt]** Hvis proxy-serveren krever godkjenning, velger du avmerkingsboksen **Requires Username and Password** (Krever brukernavn og passord), og deretter angir du brukernavn og passord.
5. Velg **Save** (Lagre) for å lagre og validere proxy-informasjonen.
6. Velg ett av følgende alternativer:
 - Velg **Yes, I'm Finished** (Ja, jeg er ferdig) for å starte systemet på nytt og bruke de nye proxy-innstillingene.
 - Velg **No, Take Me Back** (Nei, gå tilbake) for å gå tilbake til skjermbildet Settings (Innstillinger). De nye proxy-innstillingene lagres, men brukes ikke før du starter systemet på nytt.

Forbruksmaterieell og utstyr

Denne delen oppgir alt som følger med i reagenssettet med oppbevaringsforhold. Du kan også se hva slags tilhørende forbruksmaterieell og utstyr du må kjøpe for å fylle ut protokollen og utføre prosedyrer for vedlikehold og feilsøking.

Forbruksmaterieell for sekvensering

Sekvensering på NextSeq 1000/2000 krever ett Illumina NextSeq 1000/2000 P2-reagenssett til engangsbruk eller ett Illumina NextSeq 1000/2000 P3-reagenssett til engangsbruk. NextSeq 1000/2000 P2-reagenssettet fås i tre størrelser (100 sykluser, 200 sykluser, 300 sykluser), og NextSeq 1000/2000 P3-reagenssettet fås i fire størrelser (50 sykluser, 100 sykluser, 200 sykluser, 300 sykluser).

NextSeq 1000-sekvenseringssystemet er kun kompatibelt med Illumina NextSeq 1000/2000 P2-reagenssettet.

Reagenssettet inneholder kassetten og strømningscellen for sekvensering. Når du mottar NextSeq 1000/2000 P2-reagens- eller Illumina NextSeq 1000/2000 P3-reagenssett:

- Komponentene må straks settes til oppbevaring ved angitt temperatur for å sikre riktig ytelse.
- Ikke åpne aluminiumsfolieposer før du blir bedt om å gjøre det.
- Oppbevar kassetter i den tilhørende esken for å unngå at folieposen rives opp eller gjennomhulles.
- Oppbevar kassetter med pilene pekende oppover.

 Hvis kassetetiketten ikke vender opp, vil sekvenseringsdata påvirkes negativt.

Tabell 2 Settkomponenter

Forbruksmaterieell	Antall	Oppbevaringstemperatur	Dimensjoner
Kassett	1	-25 °C til -15 °C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm
Strømningscelle	1	2 °C til 8 °C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm
RSB med Tween 20	1	-25 °C til -15 °C	4 cm x 6,6 cm x 5 cm

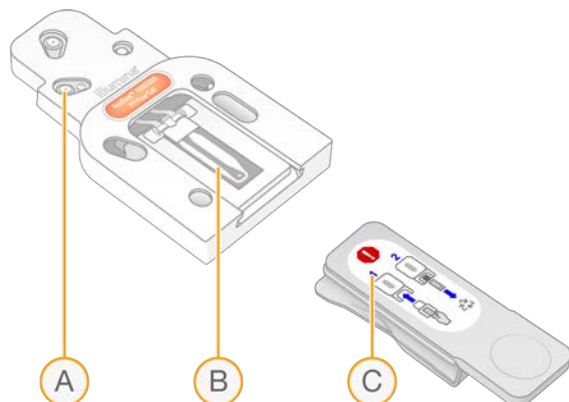
*Sendes ved romtemperatur.

Begge forbruksmaterieellene har identifikatorer som gjør sporing mulig og sikrer kompatibilitet. Kassetten og strømningscellen bruker RFID¹.

¹radiofrekvensidentifikasjon

Strømningscelle

Strømningscellen er en mønstret strømningscelle med én bane. En plastkassett omgir den glassbaserte strømningscellen. En grå tapp dekker til og stikker frem fra strømningscellen for å sikre trygg håndtering.

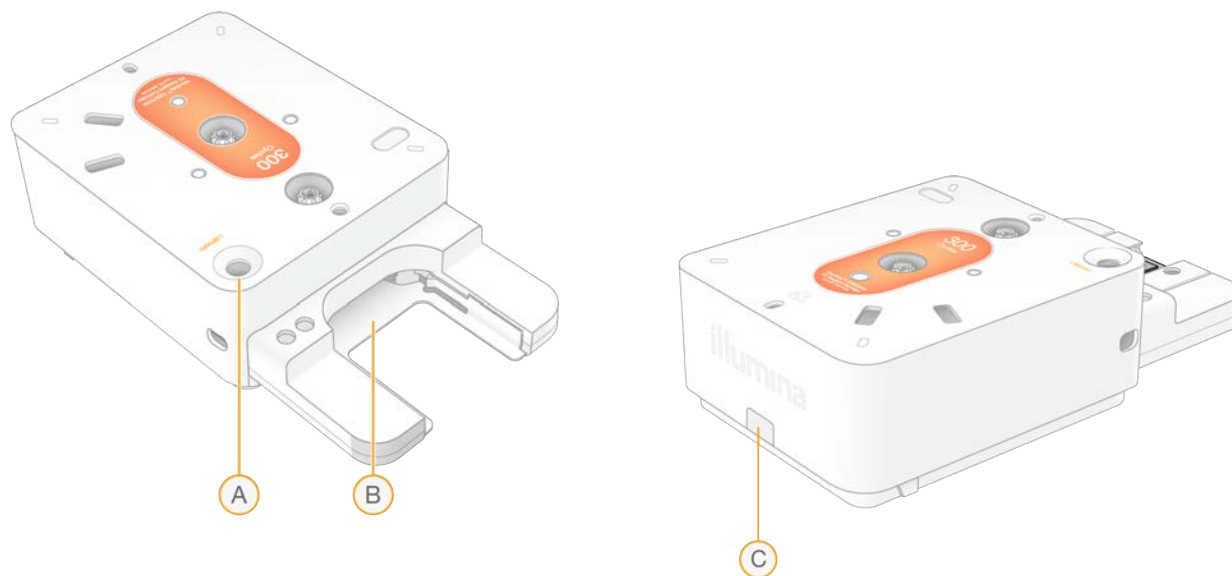


- A. Plastkassett
- B. Strømningscelle
- C. Grå tapp

Millioner av nanoceller dekker innsiden på strømningscellen. Klynger genereres i nanobrønnene. Derfra utføres deretter sekvenseringsreaksjonen. Nanobrønnenes mønstrede fordeling øker utdataavlesninger og data.

Kassett

Sekvenseringsreagenskassetten er forhåndsfylt med klynge-, sekvenserings-, paired-end- og indekseringsreagenser. En folieforseglet beholder er forbeholdt biblioteker, og et spor på forsiden er forbeholdt strømningscellen.



- A. Bibliotekbeholder
- B. Strømningscellespor
- C. Avløpsplugg

Kassetten inneholder alt forbruksmaterieell for en kjøring: reagenser, bibliotek og strømningscelle. Biblioteket og strømningscellen lastes inn i den tinte kassetten, som deretter lastes på instrumentet. Etter at kjøringen har begynt, overføres reagenser og bibliotek automatisk fra kassetten til strømningscellen.

Kassetten inneholder pumper, ventiler og all væske for systemet, inkludert en beholder på undersiden til å samle opp brukte reagenser. Kassetten kastes etter en kjøring, så det er ikke nødvendig å vaske instrumentet.

Antall sykluser som støttes

Etiketten på kassetten angir hvor mange sykluser som analyseres, ikke hvor mange sykluser som utføres. Strømningscellen er kompatibel med hvilket som helst antall sykluser og hvilken som helst avlesningstype.

Alle kassetter for 100 sykluser og 200 sykluser inneholder 38 sykluser i tillegg. Kassetten for 300 sykluser inneholder 27 sykluser i tillegg. For eksempel sørger kassetten for 300 sykluser for tilstrekkelig med reagenser for opptil 327 sekvenseringssykluser. Informasjon om hvor mange sykluser som skal sekvenseres finnes under [Antall sykluser i en avlesning på side 30](#).

Symbolbeskrivelser

Følgende tabell beskriver symbolene på forbruksmateriellet eller forbruksmateriellets emballasje.

Symbol	Beskrivelse
	Dato da forbruksmateriellet utløper. De beste resultatene oppnås ved å bruke forbruksmateriellet før denne datoen.
	Angir produsenten (Illumina).
	Tiltentk bruk er Kun til forskningsbruk (RUO).
	Angir delenummeret slik at forbruksmateriellet kan identifiseres. ¹
	Angir partikoden for å identifisere partiet eller loten som forbruksmateriellet ble fremstilt i. ¹
	Angir en helsefare.
	Temperaturområde for oppbevaring i grader celsius. Oppbevar forbruksmateriellet innenfor det angitte området. ²

Tilhørende forbruksmateriell

Kjøp følgende forbruksmateriell for sekvensering og vedlikehold.

Forbruksmateriell for sekvensering

Tabell 3 Forbruksmateriell for sekvensering

Forbruksmateriell	Leverandør	Formål
Engangshansker, puddefrie	Generell laboratorieleverandør	Generelt formål.
NextSeq 1000/2000 P2 (v3) reagenssett	Illumina: katalognr. 20046811 (100 sykluser) katalognr. 20046812 (200 sykluser) katalognr. 20046813 (300 sykluser)	Inneholder reagenskassetten, strømningscellen og NextSeq 1000/2000 RSB med Tween 20 for én kjøring. Kompatibelt med NextSeq 1000 and NextSeq 2000.
NextSeq 2000 P3-reagenssett	Illumina: katalognr. 20046810 (50 sykluser) katalognr. 20040559 (100 sykluser) katalognr. 20040560 (200 sykluser) katalognr. 20040561 (300 sykluser)	Inneholder reagenskassetten, strømningscellen og NextSeq 1000/2000 RSB med Tween 20 for én kjøring. Kun kompatibel med NextSeq 2000.
Mikrorør, 1,5 ml	Fisher Scientific, katalognr. 14-222-158, eller tilsvarende rør med lav binding	Fortynne biblioteker til lastekonsentrasjonen.
Dråpetellerspisser, 10 µl	Generell laboratorieleverandør	Fortynne biblioteker.
Dråpetellerspisser, 20 µl	Generell laboratorieleverandør	Fortynne og laste biblioteker.
Dråpetellerspisser, 200 µl	Generell laboratorieleverandør	Fortynne biblioteker.
Dråpetellerspisser, 1000 µl	Generell laboratorieleverandør	Stikke hull på bibliotekreservoarets folie.

Forbruksmaterieell	Leverandør	Formål
[Valgfritt] PhiX Control v3	Illumina, katalognr. FC-110-3001	Utføre en kjøring kun med PhiX eller tilsetning i en PhiX-kontroll.
[Valgfritt] Papirservietter	Generell laboratorieleverandør	Tørke kassetten etter et vannbad.

Forbruksmaterieell for vedlikehold

Tabell 4 Forbruksmaterieell for vedlikehold

Forbruksmaterieell	Leverandør	Formål
Engangshansker, puddefrie	Generell laboratorieleverandør	Generelt formål.
NextSeq 1000/2000 ekstra luftfilter*	Illumina, katalognr. 20029759	Luftfilter skal byttes hver sjette måned.

* Instrumentet leveres med ett installert og ett ekstra. Hvis instrumentet ikke er underlagt garanti, har brukeren ansvaret for utskiftninger. Oppbevares innpakket frem til bruk.

Tilhørende utstyr

Kjøp følgende utstyr for sekvenseringsformål.

Vare	Kilde	Formål
Fryser, -25 °C til -15 °C	Generell laboratorieleverandør	Oppbevare kassetten.
Isbøtte	Generell laboratorieleverandør	Sette biblioteker til side frem til sekvensering.
Dråpeteller, 10 µl	Generell laboratorieleverandør	Fortynne biblioteker til lastekonsentrasjonen.
Dråpeteller, 20 µl	Generell laboratorieleverandør	Fortynne biblioteker til lastekonsentrasjon og laste biblioteker i kassetten.
Dråpeteller, 200 µl	Generell laboratorieleverandør	Fortynne biblioteker til lastekonsentrasjonen.
Kjøleskap, 2 °C til 8 °C	Generell laboratorieleverandør	Oppbevare strømningscellen eller tine kassetten.

Vare	Kilde	Formål
<p>[Valgfritt] Et av følgende temperaturstyrte vannbad eller tilsvarende som kan holdes på 25 °C:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Thermo Scientific Precision 35 l vannbad med sirkulasjon (rommer 5 kassetter samtidig) • SHEL LAB 22 l digitalt vannbad med sirkulasjon (rommer 3 kassetter samtidig) 	<ul style="list-style-type: none"> • Thermo Fisher Scientific, katalognr. TSCIR 35 • Shel Lab, katalognr. SWBC22 	<p>Tine kassetten.</p>

Protokoll

Denne delen gir trinnvise instruksjoner om hvordan du klargjør forbruksmaterieell, fortynner biblioteker og konfigurerer en sekvenseringskjøring i én av fire kjøringsmodi (skybasert, hybrid- og lokal modus bruker DRAGEN eller BaseSpace Sequence Hub, mens frittstående modus er en frittstående kjøring som er beregnet på å generere cBCL-data kun for tilpassede arbeidsprosesser for analyse).

Når du håndterer reagenser og andre kjemikalier, må du ha på deg vernebriller, en laboratoriefrakk og pulverfrie hansker.

Kontroller at du har det nødvendige forbruksmateriellet og utstyret før du starter en protokoll. Se [Forbruksmaterieell og utstyr på side 22](#).

Følg protokollene i den viste rekkefølgen, og bruk de angitte volumene, temperaturene og varighetene.

Ting du må ta hensyn til i forbindelse med sekvensering

Før du starter protokollen, må du lese følgende informasjon for å gjøre klart til å fortynne biblioteker og konfigurere kjøringen. Å oppnå optimal lastekonsentrasjon er avgjørende for vellykket sekvensering og analyse. Å angi riktig antall sykluser i en avlesning bidrar til å sikre optimale utdata.

Lastevolum og -konsentrasjoner

Lastevolum er 20 µl. Lastekonsentrasjon varierer etter bibliotektype:

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

For andre bibliotektyper anbefales 650 pM som en startlastekonsentrasjon. Optimaliser denne konsentrasjonen i løpet av påfølgende kjøring slik at en lastekonsentrasjon som konsekvent gir data som oppfyller spesifikasjonene, identifiseres.

i | Hvis du vil optimalisere lastekonsentrasjonen, bruker du metrikken % Loading Concentration (% lastekonsentrasjon) i utdatafilen `PrimaryAnalysisMetrics.csv`, som blir tilgjengelig når kjøringen er fullført. Hvis % Loading Concentration (% lastekonsentrasjon) er < 95 %, øker du lastekonsentrasjonen i trinn på 100 pM i løpet av påfølgende kjøring.

Antall sykluser i en avlesning

Hvis du legger inn minimum 26 sykluser og maksimalt 151 sykluser for hver avlesning, bidrar det til å sikre datakvaliteten. Det nøyaktige antallet sykluser avhenger av forsøket du utfører. NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare krever minst 1 syklus for Read 1 (Avlesning 1), mens viser en advarsel når antall sykluser i Read 1 (Avlesning 1) er mindre enn 26.

Totalt antall sykluser for Read 1 (Avlesning 1), Index 1 (Indeks 1), Index 2 (Indeks 2) og Read 2 (Avlesning 2) kan ikke være større enn antall sykluser som støttes av settet pluss 38 sykluser for sett à 100 sykluser og sett à 200 sykluser, og 27 sykluser for P3-sett à 300 sykluser. NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare vil vise en advarsel når Index 1 (Indeks 1) og Index 2 (Indeks 2) er mindre enn 6 sykluser. Advarselen vises ikke hvis Index 1 (Indeks 1) eller Index 2 (Indeks 2) er 0 sykluser.

Minimum og maksimalt antall sykluser inkluderer en ekstra syklus. Legg alltid én syklus til den ønskede avlesningslengden slik at virkningene av fasing og prefasing korrigeres. Avlesningslengde er antall **sekvenseringssykluser** i Read 1 (Avlesning 1) og Read 2 (Avlesning 2), som ekskluderer ekstra sykluser og indekssykluser. Mer informasjon finnes i Fasekorrigering under [Arbeidsprosess for sanntidsanalyse på side 55](#).

Eksempel på kjøringssoppsett:

- Hvis du ønsker en avlesningslengde på 35 (enkel avlesning), oppgir du **36** i feltet Read 1 (Avlesning 1).
- Hvis du ønsker en avlesningslengde på 150 per avlesning (paired-end), oppgir du **151** i feltet Read 1 (Avlesning 1) og **151** i feltet Read 2 (Avlesning 2).


Planlegge en sekvenseringskjøring i BaseSpace Sequence Hub

Bruk Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) i BaseSpace Sequence Hub til å opprette og konfigurere kjøringssinnstillingene. Hvis du skal konfigurere en kjøring i skybasert modus eller hybridmodus, sender du kjøringssinnstillingene til listen over planlagte kjøring for BaseSpace Sequence Hub-kontoen din på fanen Planned Runs (Planlagte kjøring). Kjøring som er tilgjengelige for sekvensering på NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemer vises på fanen Planned Runs (Planlagte kjøring). Hvis du skal konfigurere en kjøring i lokal modus, bruker du Instrument Run

Setup (Oppsett for instrumentkjøring) til å opprette og eksportere prøvearket ditt i v2-filformat. Alternativt finner du informasjon under [Innstillinger for prøveark v2 på side 84](#) om hvordan du oppretter et prøveark uten BaseSpace Sequence Hub ved hjelp av en medfølgende mal.

Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) på BaseSpace Sequence Hub støtter ikke mer enn 1536 prøver.

Konfigurere en kjøring

1. Naviger til BaseSpace Sequence Hub.
2. Angi e-postadressen din og BaseSpace Sequence Hub-passordet, og deretter velger du **Sign In** (Logg inn).
3. Velg fanen **Runs** (Kjøringer), og deretter velger du rullegardinmenyen **New Run** (Ny kjøring).
4. Velg **NextSeq 1000/2000**.
5. I feltet Run Name (Kjøringsnavn) angir du et unikt navn etter ønske, som identifiserer den aktuelle kjøringen.
Kjøringsnavnet kan inneholde maksimalt 225 alfanumeriske tegn, mellomrom, tankestreker og understrekingstegn.
6. Velg én av følgende analyseplasseringer.
 - **BaseSpace** – Analyser sekvenseringsdata i skyen.
 - **Local** (Lokal) – Analyser sekvenseringsdata på instrumentet, eller generer et prøveark v2 for lokal eller hybridmodus.
7. Velg en analysetype og -versjon.
Mer informasjon finnes under [Utdatafiler for DRAGEN-sekundæranalyse på side 60](#) og i dokumentasjonen for BaseSpace Sequence Hub-appen. Hvis du valgte DRAGEN Single Cell RNA-analyse, finner du informasjon om kompatibilitet med tredjeparts bibliotekklargjøringssett for RNA med én celle på siden NextSeq 1000/2000-produktfiler.
 Når det gjelder analyse på instrumentet, må den valgte versjonen samsvare med DRAGEN-versjonen som er installert på instrumentet. Informasjon om hvordan du bekrefter hvilken DRAGEN-versjon som er installert på instrumentet finnes under [Oppdateringer for DRAGEN-arbeidsprosesser og -lisensen på side 74](#).
8. **[Valgfritt]** Konfigurer tilpassede indekssett på følgende måte.
Hvis du bruker mer enn ett bibliotek, må bibliotekene ha samme indekssavlesningslengder.
 - a. Velg **Add Custom Index Adapter Kit** (Legg til tilpasset indeksadaptersett) under rullegardinlisten Index Adapter Kit (Indeksadaptersett).
 - b. Velg en maltype, og angi settnavnet, adaptersekvenser, indeksstrategier og indeksssekvenser. Sørg for at adaptersekvensene for den andre indeksen (i5) er rettet fremover.
 - c. Velg **Create New Kit** (Opprett nytt sett).

9. **[Valgfritt]** Konfigurer et tilpasset bibliotekklargjøringssett på følgende måte.
- Velg **Add Custom Library Prep Kit** (Legg til tilpasset bibliotekklargjøringssett) under rullegardinlisten Library Prep Kit (Bibliotekklargjøringssett).
 - Angi navnet, avlesningstyper, standard avlesningscykluser og kompatible indeksadaptersett for det tilpassede bibliotekklargjøringssettet.
 - Velg **Create New Kit** (Opprett nytt sett).
10. Velg følgende instrumentinnstillinger. Anbefalte alternativer velges automatisk avhengig av bibliotekklargjøringssettet. Noen bibliotekklargjøringssett har hardkodete antall indeksavlesninger og avlesningstyper som ikke kan endres.

- Bibliotekklargjøringssett
- Indeksadaptersett
- Antall indeksavlesninger
- Avlesningstype
- Antall sekvenseringscykluser per avlesning

i | Hvis Not Specified (Ikke angitt) er valgt for bibliotekklargjøringssett, oppdateres ikke antall indeksavlesninger før indekssekvenser angis i delen Sample Data (Prøvedata).

11. Angi prøveinformasjon i regnearket Sample Data (Prøvedata) ved hjelp av ett av følgende alternativer. Hvis du vil gruppere prøver for dataaggregering under nedstrømsanalyse, tilordner du et navn til gruppen i kolonnen Project (Prosjekt).

- Velg **Import Data** (Importer data), og deretter velger du prøvearket ditt. Sørg for at prøvearket oppfyller formateringskravene. Se [Innstillinger for prøveark v2 på side 84](#). Analysen kan mislykkes hvis du endrer prøvearket etter første nedlasting.
- Lim inn prøve-ID-er og enten brønnposisjoner i indeksplate eller i7- og i5-indekser direkte fra en ekstern fil. Før du limer inn angir du antall prøverader i feltet Rows (Rader), og deretter velger du +. Prøve-ID-er kan inneholde opptil 20 alfanumeriske tegn, bindestreker og understrekningstegn.

i | Indeksplater med fast oppsett krever oppføringer for brønnposisjon. Indekser som ikke har et fast oppsett krever oppføringer for i7- og i5 indekser. i5-indekser må angis rettet fremover.

- Angi prøver-ID-er og de tilsvarende brønnposisjonene eller indeksene manuelt. Hvis Not Specified (Ikke angitt) er valgt for bibliotekklargjøringssettet, angir du sekvensene Index 2 (i5) (Indeks 2 (i5)) rettet fremover.

12. Velg **Next** (Neste).

Konfigurere sekundæranalyse

Konfigurer innstillingene for analysetypen som er valgt for kjøringen. Mer informasjon om arbeidsprosesser for DRAGEN-analyse finnes under [Utdatafiler for DRAGEN-sekundæranalyse på side 60](#)

Illumina DRAGEN BCL Convert

Bruk følgende trinn for å konfigurere Illumina DRAGEN BCL Convert-analyse.

1. Angi følgende valgfrie innstillinger.

Innstilling	Beskrivelse
AdapterRead1	Adaptersekvens for avlesning 1. Hvis du bruker et Illumina-bibliotekklargjøringssett, lar du feltet AdapterRead1 stå tomt.
AdapterRead2	Adaptersekvens for avlesning 2. Hvis du bruker et Illumina-bibliotekklargjøringssett, lar du feltet AdapterRead2 stå tomt.
BarcodeMismatchesIndex1	Antall tillatte misforhold mellom den første indeksavlesningen og indekssekvensen. Standardverdien er 1. Hvis en strekkode er 6 bp, er den anbefalte verdien 0.
BarcodeMismatchesIndex2	Antall tillatte misforhold mellom den andre indeksavlesningen og indekssekvensen. Standardverdien er 1. Hvis en strekkode er 6 bp, er den anbefalte verdien 0.
OverrideCycles	Streng som brukes til å spesifisere UMI-sykluser og dekke over sykluser i en avlesning. Følgende verdier er tillatt: <ul style="list-style-type: none"> • N – Angir sykluser som skal ignoreres. • Y – Angir sekvenseringssykluser. • I – Angir indekssykluser. • U – Angir UMI-sykluser som skal tilpasses. Hvert element er atskilt med semikolon. Følgende er eksempler på OverrideCycles-inndata. U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

2. Velg om du vil lagre en kopi av FASTQ-filene. FASTQ-filer genereres kun hvis du velger å beholde FASTQ-filer.

3. Velg ett av følgende alternativer for FASTQ-utdataformat:
 - **gzip** – Lagre FASTQ-filene i gzip-format.
 - **DRAGEN** – Lagre FASTQ-filer i ora-format.
4. Fullfør kjøringskonfigurasjonen.
 - Hvis du vil sende kjøringskonfigurasjonen til BaseSpace Sequence Hub-kontoen din, velger du **Submit Run** (Send kjøring). Kjøringer som sendes til BaseSpace Sequence Hub vises i listen over planlagte kjøring, og er tilgjengelige for systemer som bruker skybasert modus eller hybridmodus.
 - Hvis du vil lagre kjøringskonfigurasjonen som et prøveark i v2-filformat, velger du **Export Sample Sheet** (Eksporter prøveark) i rullegardinlisten **Submit Run** (Send kjøring). Prøvearket er nødvendig for å starte kjøring på systemer ved hjelp av lokal modus. Dette alternativet er kun tilgjengelig hvis Local (Lokal) ble valgt som analyseplassering.

Illumina DRAGEN Enrichment

Bruk følgende trinn for å konfigurere Illumina DRAGEN Enrichment-analyse.

1. Velg et referansegenom.

Bruk et referansegenom med ALT-Aware hvis det er mulig.
2. Velg en *.bed-fil som inneholder regionene du vil målrette, eller last opp en ny egendefinert fil. Sørg for at BED-filens referansegenom samsvarer med referansegenomet som ble valgt i trinn 1. Til en ny egendefinert BED-file bruker du følgende navneformat: `navn_på_panel_ versjonNummer.referansegenom.bed`.
 - **Lokal modus** – Velg **Select Custom File (Local)** (Velg egendefinert fil (lokal)) for å laste opp en enkel kjøring eller **Upload Custom File (BaseSpace)** (Last opp egendefinert fil (BaseSpace)) for gjentatt bruk.
 - **Skybasert eller hybridmodus** – Velg **Upload Custom File (BaseSpace)** (Last opp egendefinert fil (BaseSpace)). Den egendefinerte BED-filen er kun tilgjengelig i arbeidsgruppen den ble lastet opp til.
3. Velg enten kimbane- eller den somatiske variantbetegneren.
4. **[Valgfritt]** Hvis du bruker den somatiske variantbetegneren, velger du en støybaselinefil. Mer informasjon finnes under [Importere støybaselinefiler på side 17](#).
5. Velg et tilordne/innrett utdataformat.
6. Velg om du vil lagre en kopi av FASTQ-filene. FASTQ-filer genereres kun hvis du velger å beholde FASTQ-filer.
7. Velg ett av følgende alternativer for FASTQ-utdataformat:
 - **gzip** – Lagre FASTQ-filene i gzip-format.
 - **DRAGEN** – Lagre FASTQ-filer i ora-format.
8. Fullfør kjøringskonfigurasjonen.

- Hvis du vil sende kjøringskonfigurasjonen til BaseSpace Sequence Hub-kontoen din, velger du **Submit Run** (Send kjøring). Kjøringer som sendes til BaseSpace Sequence Hub vises i listen over planlagte kjøring, og er tilgjengelige for systemer som bruker skybasert modus eller hybridmodus.
- Hvis du vil lagre kjøringskonfigurasjonen som et prøveark i v2-filformat, velger du **Export Sample Sheet** (Eksporter prøveark) i rullegardinlisten **Submit Run** (Send kjøring). Filene som støtter prøvearket og sekundæranalysen lastes ned i en *.zip-mappe, og er nødvendige for å starte kjøring på systemer som bruker lokalmodus. Dette alternativet er kun tilgjengelig hvis Local (Lokal) ble valgt som analyseplassering.

ILLUMINA DRAGEN GERMLINE

Bruk følgende trinn for å konfigurere Illumina DRAGEN Germline-analyse.

1. Velg referanseggenomet.
Bruk et referanseggenom med ALT-Aware hvis det er mulig.
2. Velg et tilordne/innrett utdataformat.
3. Velg om du vil lagre en kopi av FASTQ-filene. FASTQ-filer genereres kun hvis du velger å beholde FASTQ-filer.
4. Velg ett av følgende alternativer for FASTQ-utdataformat:
 - **gzip** – Lagre FASTQ-filene i gzip-format.
 - **DRAGEN** – Lagre FASTQ-filer i ora-format.
5. Fullfør kjøringskonfigurasjonen.
 - Hvis du vil sende kjøringskonfigurasjonen til BaseSpace Sequence Hub-kontoen din, velger du **Submit Run** (Send kjøring). Kjøringer som sendes til BaseSpace Sequence Hub vises i listen over planlagte kjøring, og er tilgjengelige for systemer som bruker skybasert modus eller hybridmodus.
 - Hvis du vil lagre kjøringskonfigurasjonen som et prøveark i v2-filformat, velger du **Export Sample Sheet** (Eksporter prøveark) i rullegardinlisten **Submit Run** (Send kjøring). Filene som støtter prøvearket og sekundæranalysen lastes ned i en *.zip-mappe, og er nødvendige for å starte kjøring på systemer som bruker lokalmodus. Dette alternativet er kun tilgjengelig hvis Local (Lokal) ble valgt som analyseplassering.

ILLUMINA DRAGEN RNA

Bruk følgende trinn for å konfigurere Illumina DRAGEN RNA-analyse.

1. Velg referanseggenomet.
Bruk et referanseggenom uten ALT-Aware hvis det er mulig.
2. Velg ditt tilordne/innrett utdataformat.

3. Velg om du vil lagre en kopi av FASTQ-filene. FASTQ-filer genereres kun hvis du velger å beholde FASTQ-filer.
4. Velg ett av følgende alternativer for FASTQ-utdataformat:
 - **gzip** – Lagre FASTQ-filene i gzip-format.
 - **DRAGEN** – Lagre FASTQ-filer i ora-format.
5. **[Valgfritt]** Last opp en RNA-kommentarfil i genoverføringsformat (Gene Transfer Format – GTF).
 - **Lokal modus** – Velg **Select Custom File (Local)** (Velg egendefinert fil (lokal)) for å laste opp en enkel kjøring eller **Upload Custom File (BaseSpace)** (Last opp egendefinert fil (BaseSpace)) for gjentatt bruk.
 - **Skybasert eller hybridmodus** – Velg **Upload Custom File (BaseSpace)** (Last opp egendefinert fil (BaseSpace)). GTF-filen er kun tilgjengelig i arbeidsgruppen den ble lastet opp til.

Når en GTF-fil er lastet opp til en BaseSpace Sequence Hub-arbeidsgruppe, velger du RNA-kommentarfilen i rullegardinmenyen.

6. Velg om du vil aktivere differensiell ekspresjon.
7. Hvis du aktiverer differensiell ekspresjon, velger du en kontroll- eller sammenligningsverdi for hver prøve.

I hver sammenligningsgruppe sammenlignes alle prøver som er merket som kontroll med alle prøver som er merket som sammenligning. Hvis prøven ikke inneholder en kontroll- eller sammenligningsverdi, velger du **na** (ja) som verdien.

8. Fullfør kjøringsskriptet.
 - Hvis du vil sende kjøringsskriptet til BaseSpace Sequence Hub-kontoen din, velger du **Submit Run** (Send kjøring). Kjøringer som sendes til BaseSpace Sequence Hub vises i listen over planlagte kjøringer, og er tilgjengelige for systemer som bruker skybasert modus eller hybridmodus.
 - Hvis du vil lagre kjøringsskriptet som et prøveark i v2-filformat, velger du **Export Sample Sheet** (Eksporter prøveark) i rullegardinlisten **Submit Run** (Send kjøring). Filene som støtter prøvearket og sekundæranalysen lastes ned i en *.zip-mappe hvis en valgfri GTF-fil følger med, og er nødvendige for å starte kjøringer på systemer som bruker lokalmodus. Dette alternativet er kun tilgjengelig hvis Local (Lokal) ble valgt som analyseplassering.

Illumina DRAGEN Single Cell RNA

Bruk følgende trinn for å konfigurere Illumina DRAGEN Single Cell RNA-analyse.

1. Velg referansegenomet.
Bruk et referansegenom uten ALT-Aware hvis det er mulig.

2. **[Valgfritt]** Last opp en RNA-kommentarfil i genoverføringsformat (Gene Transfer Format – GTF).
 - **Lokal modus** – Velg **Select Custom File (Local)** (Velg egendefinert fil (lokal)) for å laste opp en enkel kjøring eller **Upload Custom File (BaseSpace)** (Last opp egendefinert fil (BaseSpace)) for gjentatt bruk.
 - **Skybasert eller hybridmodus** – Velg **Upload Custom File (BaseSpace)** (Last opp egendefinert fil (BaseSpace)). GTF-filen er kun tilgjengelig i arbeidsgruppen den ble lastet opp til.

Når en GTF-fil er lastet opp til en BaseSpace Sequence Hub-arbeidsgruppe, velger du RNA-kommentarfilen i rullegardinmenyen.
3. Velg tilordne/innrett utdataformatet ditt.
4. Velg om du vil lagre en kopi av FASTQ-filene. FASTQ-filer genereres kun hvis du velger å beholde FASTQ-filer.
5. Velg ett av følgende alternativer for FASTQ-utdataformat:
 - **gzip** – Lagre FASTQ-filene i gzip-format.
 - **DRAGEN** – Lagre FASTQ-filer i ora-format.
6. Velg konfigurasjonen som er identisk med bibliotekklargjøringssettet du har valgt.

Hvis du for eksempel valgte Single Cell RNA Library Kit 1 som bibliotekklargjøringssett, velger du Type 1 som Configuration Type (Konfigurasjonstype).
7. Velg strekkodeavlesningen.
8. **[Valgfritt]** Rediger antall baser i strekkodene og i UMI. Verdiene fylles i automatisk basert på bibliotekklargjøringssettet og konfigurasjonstypen du valgte.
9. Velg strengretningen.
10. **[Valgfritt]** Velg en fil som inneholder strekkodesekvensene dine, eller last opp en ny egendefinert fil.
11. Hvis du bruker en avansert/egendefinert konfigurasjonstype, angir du verdier for antall overstyringssykluser, strekkodeposisjon og UMI-posisjon.
12. Fullfør kjøringskonfigurasjonen.
 - Hvis du vil sende kjøringskonfigurasjonen til BaseSpace Sequence Hub-kontoen din, velger du **Submit Run** (Send kjøring). Kjøringer som sendes til BaseSpace Sequence Hub vises i listen over planlagte kjøringer, og er tilgjengelige for systemer som bruker skybasert modus eller hybridmodus.
 - Hvis du vil lagre kjøringskonfigurasjonen som et prøveark i v2-filformat, velger du **Export Sample Sheet** (Eksporter prøveark) i rullegardinlisten **Submit Run** (Send kjøring). Filene som støtter prøvearket og sekundæranalysen lastes ned i en *.zip-mappe hvis en valgfri GTF-fil følger med, og er nødvendige for å starte kjøringer på systemer som bruker lokalmodus. Dette alternativet er kun tilgjengelig hvis Local (Lokal) ble valgt som analyseplassering.

ILLUMINA DRAGEN AMPLICON

Bruk følgende trinn for å konfigurere Illumina DRAGEN Amplicon-analyse.

1. Velg referansegenomet.
2. Velg en *.bed-fil som inneholder regionene du vil målrette, eller last opp en ny egendefinert fil. Sørg for at BED-filens referansegenom samsvarer med referansegenomet som ble valgt i trinn 1. Til en ny egendefinert BED-file bruker du følgende navneformat: `navn_på_panel_ versjonNummer.referansegenom.bed`.
 - **Skybasert eller hybridmodus** – Velg **Upload Custom File (BaseSpace)** (Last opp egendefinert fil (BaseSpace)). Den egendefinerte BED-filen er kun tilgjengelig i arbeidsgruppen den ble lastet opp til.
 - **Lokal modus** – Velg **Select Custom File (Local)** (Velg egendefinert fil (lokal)) for å laste opp en enkel kjøring eller **Upload Custom File (BaseSpace)** (Last opp egendefinert fil (BaseSpace)) for gjentatt bruk.
3. Velg enten kimbane- eller den somatiske variantbetegneren.
4. Velg tilordne/innrett utdataformatet.
5. **[Lokal]** Velg om du vil lagre en kopi av FASTQ-filene. FASTQ-filer genereres kun hvis du velger å beholde FASTQ-filer.
6. Velg om du vil lagre en kopi av FASTQ-filene. FASTQ-filer genereres kun hvis du velger å beholde FASTQ-filer.
7. Velg ett av følgende alternativer for FASTQ-utdataformat:
 - **gzip** – Lagre FASTQ-filene i gzip-format.
 - **DRAGEN** – Lagre FASTQ-filer i ora-format.
8. Fullfør kjøringsskriptet.
 - Hvis du vil sende kjøringsskriptet til BaseSpace Sequence Hub-kontoen din, velger du **Submit Run** (Send kjøring). Kjøringer som sendes til BaseSpace Sequence Hub vises i listen over planlagte kjøring, og er tilgjengelige for systemer som bruker skybasert modus eller hybridmodus.
 - **[Lokal]** Hvis du vil lagre kjøringsskriptet som et prøveark i v2-filformat, velger du **Export Sample Sheet** (Eksporter prøveark) i rullegardinlisten **Submit Run** (Send kjøring). Filene som støtter prøvearket og sekundæranalysen lastes ned i en *.zip-mappe, og er nødvendige for å starte kjøring på systemer som bruker lokalmodus. Dette alternativet er kun tilgjengelig hvis Local (Lokal) ble valgt som analyseplassering.

TINE KASSETTEN I POSE OG STRØMNINGSCELLEN

Dette trinnet tiner kassetten *i den uåpnede posen* og klargjør strømningscellen. Tin kassetten i pose ved hjelp av én av tre metoder: styrt vannbad, kjøleskap eller romtemperaturluft. Bruk kassetten umiddelbart etter tining, uten å fryse den på nytt. Hvis det er umulig å bruke kassetten umiddelbart

etter tining, se [Sette forbruksmaterieill tilbake til oppbevaring på side 79](#).

Figur 4 Kassetten i pose




Tine kassetten i et styrt vannbad

1. Ta på et nytt par med pulverfrie hansker, og ta kassetten ut av oppbevaring.
2. Ta kassetten ut av esken, men **ikke åpne aluminiumsfolieposen**.
- !** Hvis du tiner en revet eller gjennomhullet pose i et vannbad, kan det føre til sekvenseringsfeil. Tin ved romtemperatur eller i et kjøleskap i stedet.
3. Tin kassetten i pose i et styrt vannbad på 25 °C i 6 timer:
 - Oppretthold en vanddybde på minst 9,5–10 cm uansett hvor mange kassetter du tiner.
 - Sørg for at det temperaturstyrte vannbadet holder 25 °C.
 - Vend poseetiketten opp, og sett posen i vannbad uten å senke den helt ned.**!** Ikke legg noe tungt på kassetten for å senke den helt ned. Hvis poseetiketten ikke vender opp eller kassetten snur under tining, vil sekvenseringsdata påvirkes negativt.
 - Ikke overskrid 8 timer i vannbadet.
 - Ikke tin flere kassetter om gangen enn det er plass til i vannbadet. Informasjon om kompatible vannbad finnes under [Tilhørende utstyr på side 27](#).
 - Du må ikke stable kassetter.
4. Ta kassetten ut av vannbadet, og tørk den med tørkepapir.

Tine kassett i et kjøleskap

1. Ta på et nytt par pudderfrie hansker.
2. Ta kassetten ut av oppbevaring ved $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ én dag før forventet kjøring.
3. Ta kassetten ut av esken, men **ikke åpne aluminiumsfolieposen**.
4. Plasser kassetten ved romtemperatur slik at etiketten vender opp og luft kan sirkulere på sidene og over den.

 Hvis poseetiketten ikke vender opp, vil sekvenseringsdata påvirkes negativt.

5. Tin ved romtemperatur i 6 timer.
6. Plasser kassetten i et kjøleskap som holder $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ slik at etiketten vender opp og luft kan sirkulere på sidene.

 Hvis poseetiketten ikke vender opp, vil sekvenseringsdata påvirkes negativt.

7. Tin i kjøleskapet i 12 timer. Ikke overskrid 72 timer.

Tine kassetten ved romtemperatur

1. Ta på et nytt par pudderfrie hansker.
2. Ta kassetten ut av oppbevaring ved $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. Ta kassetten ut av esken, men **ikke åpne aluminiumsfolieposen**.
4. Plasser kassetten slik at etiketten vender opp og luft kan sirkulere på sidene og over den.

 Hvis poseetiketten ikke vender opp, vil sekvenseringsdata påvirkes negativt.

5. Tin ved romtemperatur i 9 timer. Ikke overskrid 16 timer.

Klargjøre strømningscellen og kassetten

1. Klargjør strømningscellen på følgende måte.
 - a. Fjern en ny strømningscelle fra oppbevaring ved $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - b. Sett den uåpnede emballasjen til side ved romtemperatur i 10–15 minutter for å forhindre kondensering når strømningscellen tas ut av emballasjen. Hvis du klargjør strømningscellen nå, vil den oppnå romtemperatur i tide.
2. Hvis du bruker tinemetoden med kjøleskap:
 - a. Ta den tinte kassetten ut av oppbevaring ved $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ til $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 - b. Sett den uåpnede kassetten til side ved romtemperatur i minst 15 minutter før sekvensering. Ikke overskrid 1 time.

Fortynne biblioteker

Hvis du bruker denaturering og fortynning i instrumentet, fortynner dette trinnet biblioteker til de aktuelle lastekonsentrasjonene. Et 2 % PhiX¹-anrikingsalternativ gir ekstra metrikk, basemangfold eller en positiv kontroll. Prosentandelen for PhiX-anriking skal økes for biblioteker med lavere basemangfold.

Ved manuell denaturering og fortynning av biblioteker brukes *Veiledning for denaturering og fortynning av biblioteker for NextSeq 1000 og 2000 (dokumentnr. 1000000139235)*. Dette trinnet gjelder kun denaturering og fortynning i instrumentet.

Fortynne bibliotek til 2 nM

- [Valgfritt] Ta 10 nM PhiX-råstoff ut av oppbevaring ved –25 °C til –15 °C. PhiX er kun nødvendig for en valgfri anriking eller en kjøring kun med PhiX.
- [Valgfritt] Tin PhiX ved romtemperatur i 5 minutter, og deretter kvantifiserer du ved hjelp av en fluorescensbasert metode, for eksempel Qubit, for å bekrefte PhiX-konsentrasjonen. Hvis kvantifisering ikke er mulig, fortsett med en konsentrasjon på 10 nM.
- Roter bibliotek eller PhiX et kort øyeblikk, og deretter sentrifugerer du ved 280 × g i 1 minutt.
- Bruk RSB med Tween 20 som fortynner, og klargjør minst 24 µl 2 nM bibliotek i et mikrorør med lav binding. Instruksjoner om PhiX-anriking finnes under [Tilsette en PhiX-kontroll \(valgfritt\) på side 42](#).
- Roter et kort øyeblikk, og deretter sentrifugerer du ved 280 × g i 1 minutt.

Fortynne 2 nM bibliotek til lastekonsentrasjon

- Kombiner følgende volumer i et mikrorør med lav binding for å klargjøre 24 µl bibliotek fortynnet med den riktige lastekonsentrasjonen:

Bibliotektype*	Lastekonsentrasjon (pM)	2 nM bibliotekvolum (µl)	Volum for RSB med Tween 20 (µl)
Ampliseq for Illumina Library PLUS	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15
Illumina DNA Prep med Enrichment	1000	12	12

¹PhiX er et lite, bruksklart Illumina-bibliotek med balansert nukleotidrepresentasjon.

Bibliotektype*	Lastekonsentrasjon (pM)	2 nM bibliotekvolum (µl)	Volum for RSB med Tween 20 (µl)
Illumina Stranded Total RNA med Ribo-Zero Plus	750	9	15
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA PCR-Free	1000	12	12
TruSeq DNA Nano 350	1200	14,4	9,6
TruSeq DNA Nano 550	1500	18	6
TruSeq Stranded mRNA	1000	12	12
100 % PhiX	650	7,8	16,2

* Når det gjelder bibliotektyper som ikke er oppgitt, begynner du med en lastekonsentrasjon på 650 pM og optimaliserer i løpet av påfølgende kjøring.

Denne tabellen gir eksempler på lastekonsentrasjoner. NextSeq 1000/2000-systemet er kompatibelt med alle bibliotekklargjøringssett fra Illumina, men den optimale lastekonsentrasjonen kan variere.

- Roter et kort øyeblikk, og deretter sentrifugerer du ved $280 \times g$ i 1 minutt.
- Sett fortynnet bibliotek til side på is til det er klart til sekvensering.
Sekvenser biblioteker som er fortynnet til lastekonsentrasjonen samme dag som de fortynnes.
- Gå frem på følgende måte.
 - Hvis du skal tilsette PhiX, se [Tilsette en PhiX-kontroll \(valgfritt\) på side 42](#).
 - Hvis du ikke skal tilsette PhiX, eller hvis du skal utføre en kjøring kun med PhiX, se [Laste forbruksmaterieell inn i kassetten på side 43](#).

Tilsette en PhiX-kontroll (valgfritt)

- Kombiner følgende volumer i et mikrorør med lav binding for å klargjøre 20 µl 1 nM PhiX:
 - 10 nM PhiX (2 µl)
 - RSB med Tween 20 (18 µl)
- Roter et kort øyeblikk, og deretter sentrifugerer du ved $280 \times g$ i 1 minutt.
- Tilsett 1 µl 1 nM PhiX i 24 µl bibliotek som er fortynnet til endelig lastekonsentrasjon.
Disse volumene gir en ~2 % PhiX-anriking. Faktisk prosentandel varierer avhengig av bibliotekets kvalitet og kvantitet.

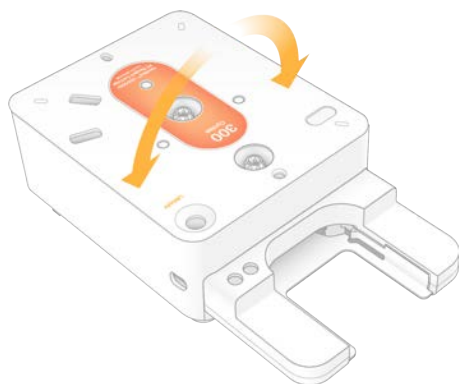
4. Sett biblioteket til side på is til det er klart til sekvensering.
Sekvenser biblioteker med PhiX-anriking samme dag som de fortynnes.

Laste forbruksmaterieell inn i kassetten

Dette trinnet klargjør kassetten til sekvensering ved å blande de forhåndsfylte reagensene og laste inn fortynnede biblioteker og strømningcellen.

Klargjøre kassetten

1. Åpne kassettposen ved å rive eller klippe med saks fra hakket øverst på en av sidene.
2. Ta kassetten ut av posen. Kast posen og tørkemiddelet.
3. Vend kassetten 10 ganger for å blande reagenser.
Innvendige komponenter kan rasle når du snur kassetten, noe som er helt normalt.



Laste inn strømningcellen

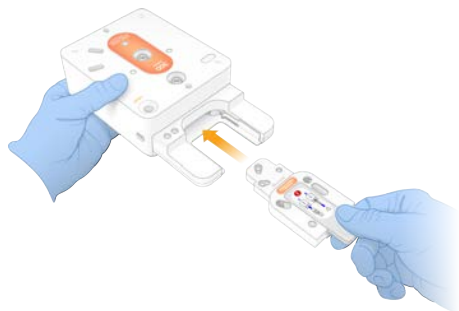
1. Åpne aluminiumsfoliepakningen ved å rive eller klippe med saks fra slissen øverst på en av sidene.
Hvis det er umulig å bruke strømningcellen umiddelbart, se [Sette forbruksmaterieell tilbake til oppbevaring på side 79](#).
2. Dra strømningcellen ut av emballasjen.
Sett foliepakningen og tørkemiddelet til side i tilfelle du må sette strømningcellen tilbake til oppbevaring. Tørkemiddelet ligger i en pose i bunnen av foliepakningen. Kast det når sekvenseringen begynner.



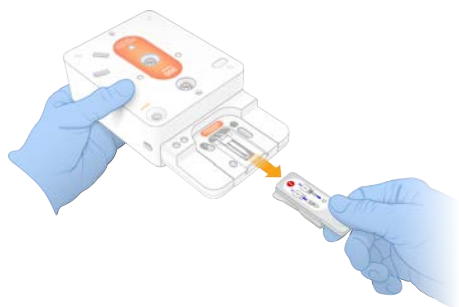
3. Hold strømningcellen i den grå tappen med etiketten på tappen vendt opp.

4. Skyv for å sette strømningcellen inn i sporet på forsiden av kassetten.

Det høres et klikk som angir at strømningcellen er på plass. Når den er lastet riktig inn, stikker den grå tappen frem fra kassetten.



5. Trekk tilbake og fjern den grå tappen for å avdekke strømningcellen. Resirkuler tappen.



Laste inn biblioteker

1. Perforer bibliotekbeholderen med en ny P1000-dråpetellerspiss, og skyv folien ut til kantene slik at hullet forstørres.
2. Kast dråpetellerspissen slik at kontaminasjon unngås.

3. Tilsett 20 µl fortynnet bibliotek i **bunnen** av beholderen ved å senke dråpetellerspissen sakte mot bunnen av beholderen før du dispenserer. Unngå å ta på folien.



Starte en sekvenseringskjøring


Dette trinnet starter en sekvenseringskjøring i én av fire modi:

- **Skybasert modus** – Kjøringen velges i en liste over planlagte kjøring i NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren. Under sekvensering lastes cBCL-data opp til BaseSpace Sequence Hub. Etter sekvensering starter DRAGEN i BaseSpace Sequence Hub automatisk.
- **Hybridmodus** – Kjøringen velges i en liste over planlagte kjøring i NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren. Etter sekvensering starter analyse på instrumentet automatisk. cBCL-data og utdatafiler for DRAGEN-sekundæranalyse lagres i den valgte utdatamappen.
- **Lokal modus** – Et prøveark i v2-filformat importeres manuelt i NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren. Etter sekvensering starter analyse på instrumentet automatisk. cBCL-data og utdatafiler for DRAGEN-sekundæranalyse lagres i den valgte utdatamappen. Hvis Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring) er valgt, kan analyse også startes via BaseSpace Sequence Hub-apper etter at sekvensering er fullført.
- **Frittstående modus** – Konfigurer en kjøring ved å følge instruksjonene i NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare for å generere cBCL-data.

⚠ | Hvis du åpner dekselet under før kjøring-kontrollen eller kjøringen, kan kjøringen mislykkes.

⚠ | Hold hendene unna instrumentet mens dekselet åpnes eller lukkes, slik at du ikke skader deg.

Starte en skybasert kjøring eller hybridkjøring

1. Konfigurerer kjørimodusen som beskrevet i [Konfigurere kjørimodus på side 18](#).
2. Velg **Start**.
3. Angi innloggingsinformasjonen din for BaseSpace Sequence Hub, og deretter velger du **Sign In** (Logg inn).
4. Hvis du valgte Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring), velger du arbeidsgruppen som inneholder kjøringen som du opprettet i Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) i BaseSpace Sequence Hub.
 Du må velge en arbeidsgruppe for å unngå feil. Kontroller at du har valgt en arbeidsgruppe før du fortsetter.
5. Velg **Next** (Neste).
6. Velg kjøringen din.
7. Bekreft at Analysis (Analyse), Run Length (Kjøringslengde) og versjonen av Secondary Analysis (Sekundæranalyse) samsvarer med riktig kjøring.
Analysis (Analyse) viser Cloud_ for å angi at analysen foregår i BaseSpace Sequence Hub.
8. Velg **Review** (Gå gjennom).
9. **[Valgfritt]** Angi plasseringer for tilpasset avlesningsprimer og tilpasset indeksprimer.
Informasjon om å klargjøre og legge til tilpassede primere finnes i *Veiledning om tilpassede primere for NextSeq 1000 og 2000 (dokumentnr. 1000000139569)*. Husk å gå inn på siden over kompatible produkter for bibliotekklargjøringssettet for å kontrollere om det er nødvendig med tilpassede Illumina-primere.
10. **[Valgfritt]** Velg en tilpasset oppskrift. Mer informasjon finnes under [Mørk syklus-sekvensering på side 97](#)
Hvis du bruker NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare v1.3 og Illumina Stranded Total RNA Prep med Ribo-Zero Plus-sett eller Illumina Stranded mRNA Prep-sett, velges den tilpassede oppskriften automatisk.
11. **[Valgfritt]** Hvis du vil denaturere og fortynde biblioteker manuelt, velger du bort avmerkingsboksen **Denature and Dilute On Board** (Denaturere og fortynde i instrumentet). Se *Veiledning for denaturering og fortyndning av biblioteker for NextSeq 1000 og 2000 (dokumentnr. 1000000139235)*. Standardvalget er konfigurert i innstillingene for NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren.
12. **[Valgfritt]** Hvis du vil endre utdatamappe, velger du feltet Output Folder (Utdatamappe) og velger en annen plassering.
Feltet Output Folder (Utdatamappe) fylles ut automatisk fra standardinnstillingene dine, og er obligatorisk med mindre **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring) er valgt.


Hvis du valgte Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring), vises Save to BaseSpace Sequence Hub (Lagre til BaseSpace Sequence Hub) som Enabled (Aktivert).

Hvis du valgte Proactive and Run Monitoring and Storage (Proaktiv og kjøringsovervåking), vises Save to BaseSpace Sequence Hub (Lagre til BaseSpace Sequence Hub) som Disabled (Deaktivert).


13. Gå gjennom kjøringinformasjonen, og velg deretter **Prep** (Klargjør).

Starte en lokal kjøring

1. Konfigurer kjørimodusen som beskrevet i [Konfigurere kjørimodus på side 18](#).
2. Velg **Start**.
3. Hvis du valgte Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring) eller Proactive and Run Monitoring (Proaktiv og kjøringsovervåking), angir du innloggingsinformasjonen din for BaseSpace Sequence Hub, og deretter velger du **Sign In** (Logg inn).
4. Hvis du valgte Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring), velger du arbeidsgruppen i BaseSpace Sequence Hub som du skal lagre kjøringen i, og deretter velger du **Next** (Neste).

 Du må velge en arbeidsgruppe for å unngå feil. Kontroller at du har valgt en arbeidsgruppe før du fortsetter.

5. Velg **Choose...** (Velg ...) under Start With Sample Sheet (Start med arbeidsark), og naviger til prøvearket i v2-formatering på NextSeq 1000/2000-instrumentet, den bærbare stasjonen eller den monterte nettverksstasjonen. Prøvearkenes filnavn kan ikke inneholde spesialtegn. NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare v1.3 påviser automatisk DRAGEN-versjonen i prøvearket, og ber deg om å bytte versjoner ved behov. DRAGEN-versjonen må være installert på systemet. Installasjonsinformasjon finnes under [Programvareoppdateringer på side 72](#).
 - **Instrument Run Setup Used** (Oppsett for instrumentkjøring brukt) – Velg .zip-mappen som inneholder prøveark v2 og støttefiler hvis det er aktuelt. Ellers velger du prøveark v2.
 - **Instrument Run Setup Not Used** (Oppsett for instrumentkjøring ikke brukt) – Kontroller at støttefilen for sekundæranalyse befinner seg i samme katalog som prøveark v2.

 Det valgte prøvearket må være v2-formatert. Hvis du vil opprette et prøveark v2, laster du ned det genererte prøvearket fra Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) i BaseSpace Sequence Hub eller redigerer en mal for prøveark v2, som finnes på støttesiden for NextSeq 1000/2000. Mer informasjon om formatering og krav for prøveark v2 finnes under [Innstillinger for prøveark v2 på side 84](#). Kontroller at alle filene det vises til i prøvearket, ligger i samme mappe som prøvearket.

6. Velg **Review** (Gå gjennom).
7. **[Valgfritt]** Angi plasseringer for tilpasset avlesningsprimer og tilpasset indeksprimer.

Informasjon om å klargjøre og legge til tilpassede primere finnes i *Veiledning om tilpassede primere for NextSeq 1000 og 2000 (dokumentnr. 1000000139569)*. Husk å gå inn på siden over kompatible produkter for bibliotekklargjøringssettet for å kontrollere om det er nødvendig med tilpassede Illumina-primere.

8. **[Valgfritt]** Velg en tilpasset oppskrift. Mer informasjon finnes under [Mørk syklus-sekvensering på side 97](#)
Hvis du bruker NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare v1.3 og Illumina Stranded Total RNA Prep med Ribo-Zero Plus-sett eller Illumina Stranded mRNA Prep-sett, velges den tilpassede oppskriften automatisk.
9. **[Valgfritt]** Hvis du vil denaturere og fortynne biblioteker manuelt, velger du bort avmerkingsboksen **Denature and Dilute On Board** (Denaturere og fortynne i instrumentet). Se *Veiledning for denaturering og fortykning av biblioteker for NextSeq 1000 og 2000 (dokumentnr. 1000000139235)*. Standardvalget er konfigurert i innstillingene for NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren.
10. **[Valgfritt]** Hvis du vil endre utdatamappe, velger du feltet Output Folder (Utdatamappe) og velger en annen plassering.
Feltet Output Folder (Utdatamappe) fylles ut automatisk fra standardinnstillingene dine, og er obligatorisk med mindre Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring) er valgt.
Hvis du valgte Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring), vil Save to BaseSpace Sequence Hub (Lagre til BaseSpace Sequence Hub) vise Enabled (Aktivert). Hvis du valgte Proactive and Run Monitoring and Storage (Proaktiv og kjøringsovervåking), vises Save to BaseSpace Sequence Hub (Lagre til BaseSpace Sequence Hub) som Disabled (Deaktivert).
11. Gå gjennom kjøringinformasjonen, og velg deretter **Prep** (Klargjør).

Starte en frittstående kjøring

1. Konfigurer kjørimodusen som beskrevet i [Konfigurere kjørimodus på side 18](#).
2. Velg **Start**.
3. Hvis du valgte Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring) eller Proactive and Run Monitoring (Proaktiv og kjøringsovervåking), angir du innloggingsinformasjonen din for BaseSpace Sequence Hub, og deretter velger du **Sign In** (Logg inn).
4. Hvis du valgte Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring), velger du arbeidsgruppen i BaseSpace Sequence Hub som du skal lagre kjøringen i, og deretter velger du **Next** (Neste).
5. Velg **Set Up New Run** (Konfigurer en ny kjøring).
6. I feltet Run Name (Kjøringsnavn) angir du et unikt navn etter ønske, som identifiserer den aktuelle kjøringen.
Kjøringsnavnet kan inneholde alfanumeriske tegn, tankestreker, bindestreker og understrekingstegn.

7. Under Read Type (Avlesningstype) velger du hvor mange sekvenseringskjøringer som skal utføres:
- **Single Read** (Enkel avlesning) – Utfør én avlesning, som er det enkleste, raskeste alternativet.
 - **Paired End** (Paired-end) – Utfør to avlesninger, der konsensus genererer data av høyere kvalitet og gir mer nøyaktig innretting.

8. Angi antall sykluser som utføres i hver avlesning:

Det er ikke et maksimalt antall indekssykluser, men summen av avlesningssyklusene og indekssyklusene må være mindre enn antall sykluser som er angitt på kassetetiketten pluss 27.

Read 1 (Avlesning 1) – Angi **1–151** sykluser.

Index 1 (Indeks 1) – Angi antall sykluser for primeren for Index 1 (Indeks 1) (i7). For en kjøring kun med PhiX angir du **0** i begge indekspeltene.

Index 2 (Indeks 2) – Angi antall sykluser for primeren for Index 2 (Indeks 2) (i5).

Read 2 (Avlesning 2) – Angi opptil **151** sykluser. Denne verdien er vanligvis den samme som verdien for Read 1 (Avlesning 1).

9. Hvis du valgte Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring), importerer du et prøveark ved å velge **Choose...** (Velg ...).
NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare v1.3 påviser automatisk DRAGEN-versjonen i prøvearket, og ber deg om å bytte versjoner ved behov. DRAGEN-versjonen må være installert på systemet. Installasjonsinformasjon finnes under [Programvareoppdateringer på side 72](#).

i | Det valgte prøvearket må være v2-formatert. Hvis du vil opprette et prøveark v2, laster du ned det genererte prøvearket fra Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) i BaseSpace Sequence Hub eller redigerer en mal for prøveark v2, som finnes på støttesiden for NextSeq 1000/2000. Mer informasjon om formatering og krav for prøveark v2 finnes under [Innstillinger for prøveark v2 på side 84](#). Kontroller at alle filene det vises til i prøvearket, ligger i samme mappe som prøvearket.

10. **[Valgfritt]** Angi plasseringer for tilpasset avlesningsprimer og tilpasset indekssprimer.
Informasjon om å klargjøre og legge til tilpassede primere finnes i *Veiledning om tilpassede primere for NextSeq 1000 og 2000 (dokumentnr. 1000000139569)*. Husk å gå inn på siden over compatible produkter for bibliotekklargjøringssettet for å kontrollere om det er nødvendig med tilpassede Illumina-primere.
11. **[Valgfritt]** Velg en tilpasset oppskrift. Mer informasjon finnes under [Mørk syklus-sekvensering på side 97](#)
12. **[Valgfritt]** Hvis du vil denaturere og fortynne biblioteker manuelt, velger du bort avmerkingsboksen **Denature and Dilute On Board** (Denaturere og fortynne i instrumentet). Se *Veiledning for denaturering og fortynning av biblioteker for NextSeq 1000 og 2000 (dokumentnr. 1000000139235)*. Standardvalget er konfigurert i innstillingene for NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren.
13. **[Valgfritt]** Hvis du vil endre utdatamappe, velger du feltet Output Folder (Utdatamappe) og velger en annen plassering.

Feltet Output Folder (Utdatamappe) fylles ut automatisk fra standardinnstillingene dine, og er obligatorisk med mindre Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring) er valgt.

14. Velg **Prep** (Klargjør).

Laste forbruksmateriellet på instrumentet

1. Kontroller at kassetten tidligere har blitt tint og vendt 10 ganger for å blande før du laster strømningcellen (med den grå tappen fjernet) og det fortynnede biblioteket.
2. Velg **Load** (Last).
NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren åpner dekselet og støter ut brettet.
3. Plasser kassetten på brettet med etiketten vendt oppover og strømningcellen i instrumentet. Skyv kassetten inn til den låses på plass.



4. Velg **Close** (Lukk) slik at kassetten trekkes inn og dekselet lukkes.
NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren viser informasjon fra det skannede forbruksmateriellet etter ~3 minutter.
5. [Valgfritt] Fjern kassetten ved å velge **Eject Cartridge** (Støt ut kasset).
Dekselet åpner seg etter 1 minutt og støter ut kassetten.
6. Velg **Sequence** (Sekvenser).

Før kjøring-kontroller

Før kjøring-kontroller omfatter en instrumentkontroll etterfulgt av en væskekontroll. Væskekontrollen gjennomfører kassettforseglingene, noe som vil føre til at det kommer 3–4 smell fra instrumentet. Dette er å forvente. Reagenset føres nå gjennom strømningcellen.

! Forbruksmaterieil kan ikke brukes på nytt når væskekontrollen har startet.

1. Vent i ca. 15 minutter mens kontrollene før kjøring fullføres.
Kjøringen starter automatisk etter fullføring.

2. Hvis det oppstår en feil under instrumentkontrollen, velger du **Retry** (Prøv på nytt) slik at kontrollen utføres på nytt.
Når en kontroll pågår, blir sirkelen for den kontrollen animert.
3. Informasjon om feilsøking av tilbakevendende feil finnes under [Løse feilmeldinger på side 78](#).

Overvåke kjøringens fremdrift

1. Overvåk kjøringens fremdrift og metrikk etter hvert som de vises i skjermbildet Sequencing (Sekvensering).
 - **Estimated run completion** (Anslått fullført kjøring) – Omtrentlig dato og klokkeslett da kjøringen vil være fullført. Metrikken for anslått fullført kjøring krever 10 tidligere kjøring for å beregne nøyaktig tid for fullført kjøring.
 - **Average %Q30** (Gjennomsnittlig %Q30) – Gjennomsnittlig prosentandel basebetegnelser med en Q-score ≥ 30 .
 - **Projected Yield** (Planlagt produksjon) – Forventet antall basebetegnelser for kjøringen.
 - **Total Reads PF** (PF-avlesninger totalt) – Antall paired-end (hvis aktuelt) klynger som passerer filtrering (i millioner).
 - **Real Time Demux** (Demultipleksing i sanntid) – Status for demultipleksing når det ble startet i begynnelsen av Read 2 (Avlesning 2) etter fullførte sykluser for Read 1 (Avlesning 1), Index 1 (Indeks 1) og Index 2 (Indeks 2). Status vil vise Complete (Fullført) selv om indekssykluser ikke utføres. Ikke tilgjengelig for kjøring i skybasert modus.
 - **Real Time Alignment** (Innretting i sanntid) – Status for innretting av Read 1 (Avlesning 1) når det ble startet i begynnelsen av Read 2 (Avlesning 2) etter fullførte sykluser for Read 1 (Avlesning 1), Index 1 (Indeks 1) og Index 2 (Indeks 2). Ikke tilgjengelig for kjøring i skybasert modus.

Metrikk for Q30 og produksjon vises etter syklus 26 (~6 timer etter at kjøringen ble startet).

2. Hvis du vil overvåke kjøringprosesser, velger du kontrollprogramvaremenyen, og deretter velger du **Process Management** (Prosessbehandling).
3. Avbryt en kjøring ved å velge **End Run** (Avslutt kjøring). Mer informasjon om å avbryte kjøring finnes under [Avbryt en kjøring på side 79](#) (Avbryt en kjøring).
4. Last forbruksmaterieell ut av instrumentet. Fjern kassetten fra instrumentet innen 3 dager.

Laste ut forbruksmaterieell

1. Når sekvensering er fullført, velger du **Eject Cartridge** (Støt ut kasset).
Programvaren støter den brukte kassetten ut av instrumentet.
2. Fjern kassetten fra brettet.
3. Fjern strømningscellen fra kassetten.

4. Avhend strømningscellen, som har elektroniske komponenter, i henhold til gjeldende lokale standarder.
5. [Valgfritt] Fjern avløpspluggen under Illumina-logoen på siden av kassetten over et passende område (dvs. vask eller avfallsbeholder for farlig avfall) med pluggen vendt horisontalt eller nedover og bort fra ansiktet ditt. Tapp ut reagenser i henhold til standardene som gjelder i regionen. Tappetiden avhenger av kassetstørrelsen hvis ikke automatisk reagensskylling er aktivert.

! Dette reagenssettet inneholder potensielt farlige kjemikalier. Personskade kan forekomme ved innånding, svelging, hudkontakt og øyekontakt. Bruk verneutstyr, inkludert vernebriller, hansker og laboratoriefrakk som er egnet ved risiko for eksponering. Brukte reagenser skal behandles som kjemisk avfall og kastes i samsvar med gjeldende regionale, nasjonale og lokale lover og forskrifter. Du finner mer informasjon knyttet til helse, miljø og sikkerhet i sikkerhetsdatabladet på support.illumina.com/sds.html.

6. Kast reagenskassetten.
En kjøring etter vasking er ikke nødvendig fordi væsken avhendes sammen med kassetten.
7. Last inn brettet på nytt og gå tilbake til startskjermbildet ved å velge **Close Door** (Lukk dør).
Programvaren laster automatisk inn brettet på nytt, og sensorer bekrefter at kassetten er fjernet.

Rengjøre kassettbrett

Det er kun nødvendig å rengjøre kassettbrettet hvis reagenset har lekket ut på kassettbrettet.

1. Fjern kassetten fra instrumentet.
2. Ta på et nytt par med pulverfrie hansker og eventuelt annet verneutstyr.
3. Spray 10 % kloropløsning på en klut.
4. Tørk av kassettbrettet med kluten, og fjern deretter kloropløsningen med et kraftig tørkepapir.
Kloret lager flekker på kassettbrettet hvis det ikke fjernes umiddelbart.
5. Spray 70 % etanolopløsning på kassettbrettet, og fjern den umiddelbart med et kraftig tørkepapir.
6. Sett kassettbrettet tilbake i lastestilling.

Utdata for sekvensering

Denne delen beskriver sanntidsanalyseprogramvaren, som utfører basebetegnelse, tilordner kvalitetsscorer og mater ut data. Finn ut om de forskjellige utdatafiltypene og hvor du finner dem etter en kjøring.

Oversikt over sanntidsanalyse

NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemene kjører RTA3, en implementering av sanntidsanalyseprogramvare, på instrumentets beregningsmotor (Compute Engine – CE). RTA3 trekker ut intensiteter fra bilder som mottas fra kameraet, utfører basebetegnelse, tilordner en kvalitetscore til basebetegnelser, innretter seg etter PhiX og rapporterer data i InterOp-filer for visning i instrumentets kontrollprogramvare.

RTA3 lagrer informasjon i minnet for å optimalisere behandlingstid. Hvis RTA3 avsluttes, gjenopptas ikke behandlingen, og alle kjørte data som behandles i minnet, går tapt.

RTA3-inndata

RTA3 krever fliser som finnes i lokalt systemminne for behandling. RTA3 mottar kjøringinformasjon og kommandoer fra kontrollprogramvaren.

RTA3-utdata

Bilder for hver fargekanal sendes i minne til RTA3 som fliser. Fra disse bildene mater RTA3 ut et sett med kvalitetscorebaserte basebetegnelsesfiler og filterfiler. Alle andre utdata er støttende utdatafiler.

Filtype	Beskrivelse
Basebetegnelsesfiler	Hver flis som blir analysert, inkluderes i en sammenkoblet basebetegnelsesfil (*.cbcl). Fliser fra samme bane og overflate aggregeres til 1 *.cbcl-fil for hver bane og overflate.
Filterfiler	Hver flis gir en filterfil (*.filter) som angir om en klynge passerer filtre.
Klyngeplasseringsfiler	Klyngeplasseringsfiler (*.locs) inneholder X-,Y-koordinater for hver klynge i en flis. En klyngeplasseringsfil genereres for hver kjøring.

Utdatafiler brukes til nedstrømsanalyse i DRAGEN og BaseSpace Sequence Hub.

Feilhåndtering

RTA3 oppretter loggfiler og skriver dem til mappen Logs (Logger). Feil registreres i en tekstfil i *.log-filformat.

Følgende loggfiler overføres til det endelige utdatamålet etter endt behandling:

info_00000.log oppsummerer viktige kjøringshendelser.

error_00000.log oppgir feil som oppsto under en kjøring.

warning_00000.log oppgir advarsler som oppsto under en kjøring.

Strømningscellefliser

Fliser er små avbildningsområder på strømningscellen. Kameraet tar ett bilde per flis.

NextSeq 1000/2000 P2-strømningscellen har totalt 132 fliser. NextSeq 1000/2000 P3-strømningscellen har totalt 264 fliser.

Tabell 5 Strømningscellefliser

Strømningscellekomponent	NextSeq 1000/2000 P2- strømningscelle	NextSeq 1000/2000 P3- strømningscelle	Beskrivelse
Baner	1	2	Baner er optisk distinkte, men ikke væskemessig atskilte kanaler.
Overflater	2	2	P2- og P3-strømningscellene avbildes på to overflater: oversiden og undersiden. Oversiden av en flis avbildes først.
Runder per bane	6	6	En runde er en søyle i en strømningscellebane.
Fliser per runde	11	11	En flis er en del av en runde, og viser et avbildet område på strømningscellen.
Genererte fliser totalt	132	264	Baner × overflater × runder × fliser per runde er lik totalt antall fliser.

Navngi fliser

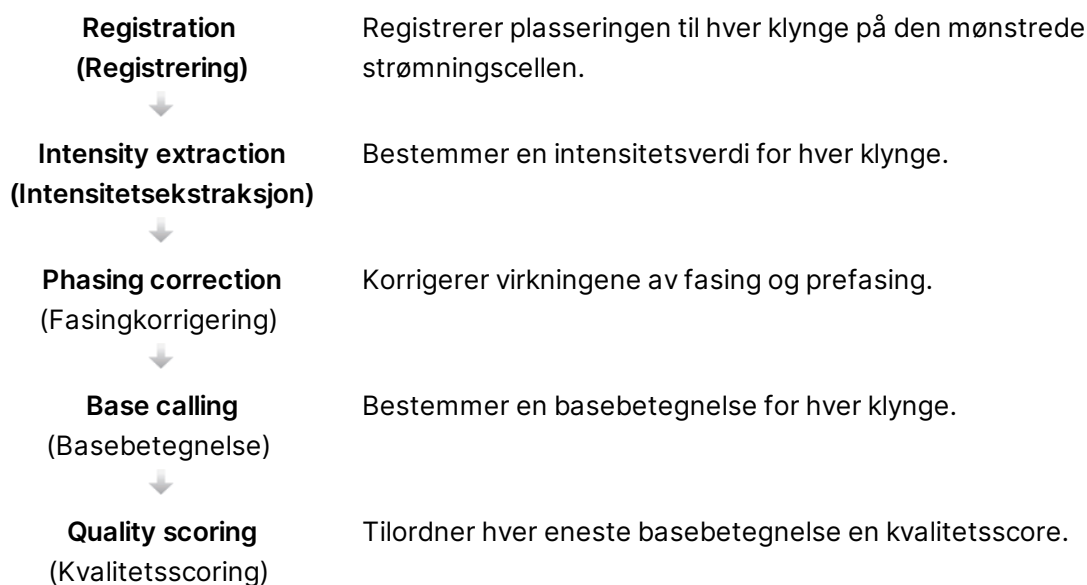
Flisnavnet er et firesifret tall som viser til flisens posisjon på strømningscellen. For eksempel angir flisnavn 1205 oversiden, runde 2, flis 05.

Det første sifferet viser til overflaten: 1 for oversiden eller 2 for undersiden.

Det andre sifferet viser til rundenummeret: 1, 2, 3, 4, 5 eller 6.

De to siste sifrene viser til flisnummeret. For rundenumre 1–4 begynner nummereringen med 01 ved strømningscellens utløpsende til og med 11 ved innløpsenden. For rundenumre 5–6 begynner nummereringen med 01 ved innløpsenden og 11 ved utløpsenden.

Arbeidsprosess for sanntidsanalyse



Registrering

Registrering innretter et bilde til det roterte kvadratarrayet for nanobrønner på den mønstrede strømningscellen. På grunn av nanobrønners ordnede fordeling er X- og Y-koordinatene for hver klynge i en fil, forutbestemte. Klyngeposisjoner skrives til en klyngeplasseringsfil (s.locs) for hver kjøring.

Hvis registrering mislykkes for bilder i en syklus, genereres ingen basebetegnelser for denne flisen i denne syklusen. Bruk Sequencing Analysis Viewer til å identifisere hvilke bilder som ikke ble registrert.

Intensitetsekstraksjon

Etter registrering beregner intensitetsekstraksjon en intensitetsverdi for hver nanobrønn i et gitt bilde. Hvis registrering mislyktes, kan ikke intensiteten for denne filen ekstraheres.

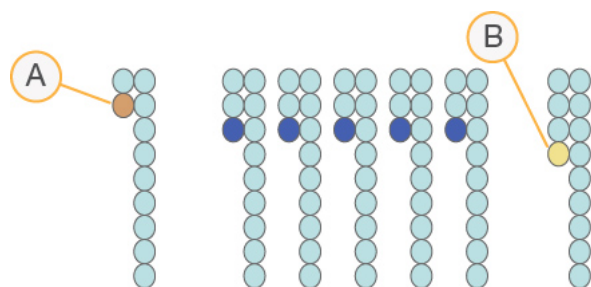
Fasingkorrigering

Under sekvenseringsreaksjonen utvides hver DNA-tråd i en klynge med én base per syklus. Fasing og prefasing forekommer når en streng havner utenfor fase med den aktuelle inkorporasjonssyklusen.

Fasing forekommer når en base havner på etterskudd.

Prefasing forekommer når en base hopper fremover.

Figur 5 Fasing og prefasing



- A. Avles med en base som er fasing
- B. Avles med en base som er prefasing.

RTA3 korrigerer virkningene av fasing og prefasing, noe som maksimerer datakvaliteten i hver syklus gjennom hele kjøringen.

Basebetegnelse

Basebetegnelse bestemmer en base (A, C, G eller T) for hver klynge for en gitt flis ved en spesifikk syklus. NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemene bruker tokenalssekvensering som kun krever to bilder for å kode dataene for fire DNA-baser: ett fra den grønne kanalen og ett fra den blå kanalen.

En ingen betegnelse identifiseres som N. Ingen betegnelser oppstår når en klynge ikke passerer filter, registrering mislykkes eller en klynge flyttes av bildet.

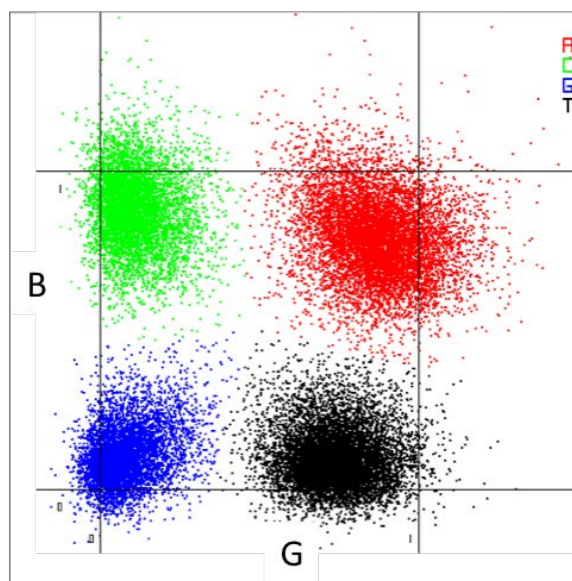
Intensiteter for hver klynge hentes fra de grønne og blå bildene og sammenlignes mot hverandre, noe som gir fire distinkte populasjoner. Hver populasjon svarer til en base. Basebetegnelsesprosessen bestemmer i hvilken populasjon hver klynge tilhører.

Tabell 6 Basebetegnelser i 2-kanalssekvensering

Base	Grønn kanal	Blå kanal	Resultat
A	1 (finnes)	1 (finnes)	Klynger som viser intensitet i både de grønne og blå kanalene.

Base	Grønn kanal	Blå kanal	Resultat
C	0 (finnes ikke)	1 (finnes)	Klynger som viser intensitet i kun den blå kanalen.
G	0 (finnes ikke)	0 (finnes ikke)	Klynger som ikke viser noen intensitet på en kjent klyngeplassering.
T	1 (finnes)	0 (finnes ikke)	Klynger som viser intensitet i kun den grønne kanalen.

Figur 6 Visualisering av klyngeintensiteter



i | Fargen til hver klynge korrelerer med %Base-plottene i Sequence Analysis Viewer (SAV) og Run Data by Cycle (Kjøringsdata etter syklus) i BaseSpace Sequence Hub, og er ikke ment å korrelere med den grønne og blå kanalen.

Klyngepasserende filter

Under kjøringen filtrerer RTA3 rådata for å fjerne avlesninger som ikke oppfyller datakvalitetsterskelen. Overlappende klynger og klynger av lav kvalitet, fjernes.

Når det gjelder tokanalsanalyse, bruker RTA3 et utfyllingsbasert system for å bestemme renheten (intensitetsrenhetsmåling) for en basebetegnelse. Klynger passerer filter (PF) når ikke mer enn én

basebetegnelse i de første 25 syklusene har en renhet under en fast terskel. Når det er inkludert, utføres PhiX-innretting ved syklus 26 på et delsett med fliser for klynger som passerte filter. Klynger som ikke passerer filter basebetegnes ikke, og justeres ikke.

Kvalitetsscorer

En kvalitetsscore (Q-score) er en prediksjon av sannsynligheten for en feil basebetegnelse. En høyere Q-score innebærer at en basebetegnelse har høyere kvalitet og er mer sannsynlig å være korrekt. Etter at Q-scoren er fastslått, registreres resultater i basebetegningsfiler (*.cbcl).

Q-scoren kommuniserer kortfattet sannsynligheter for små feil. Kvalitetsscorer representeres som Q (X), der X er scoren. Følgende tabell viser forholdet mellom en kvalitetsscore og sannsynlighet for feil.

Q-score Q(X)	Sannsynlighet for feil
Q40	0,0001 (1 av 10 000)
Q30	0,001 (1 av 1000)
Q20	0,01 (1 av 100)
Q10	0,1 (1 av 10)

Kvalitetsscoring og rapportering

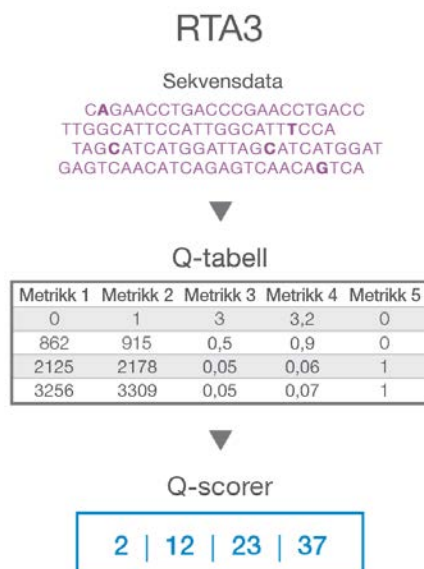
Kvalitetsscoring beregner et sett med prediktorer for hver basebetegnelse, og bruker deretter prediktorverdiene for å slå opp Q-scoren i en kvalitetstabell. Kvalitetstabeller opprettes for å gi optimalt nøyaktige kvalitetsprediksjoner for kjøringene som er generert av en spesifikk konfigurasjon av sekvenseringsplattform og kjemiversjon.



Kvalitetsscoring er basert på en endret versjon av Phred-algoritmen.

Da Q-tabellen for NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemene skulle genereres, ble det fastslått tre grupper med basebetegnelser basert på klyngedannelse for disse spesifikke prediktive funksjonene. Etter gruppering av basebetegnelsene ble gjennomsnittlig feilrate beregnet empirisk for hver av de tre gruppene, og de tilsvarende Q-scorene ble registrert i Q-tabellen sammen med de prediktive funksjonene som korrelerte med denne gruppen. Som sådan er kun tre Q-scoringer mulig med RTA3, og disse Q-scorene representerer den gjennomsnittlige feilraten i gruppen (*Forenklet Q-scoring med RTA3 på side 59*). Samlet sett gir dette en forenklet, men høyst nøyaktig kvalitetsscoring. De tre gruppene i kvalitetstabellen tilsvarer marginale (<Q15), middels (~ Q20) og høykvalitets (> Q30) basebetegnelser, og tilordnes de spesifikke scorene på henholdsvis 12, 23 og 37. Dessuten tilordnes en nullscore på 2 til eventuelle ingen betegnelser. Denne Q-scoringrapporteringsmodellen reduserer krav til lagringsplass og båndbredde uten at det påvirker nøyaktighet eller ytelse.

Figur 7 Forenklet Q-scoring med RTA3



Sekvenseringsutdatafiler

Filtype	Filtype, -plassering og -navn
Sammenkoblede basebetegnelsesfiler	Hver klynge som er analysert innbefattes i en sammenkoblet basebetegnelsesfil, som aggregeres i én fil per syklus, bane og overflate. Den aggregerte filen inneholder den sammenkoblede basebetegnelsen og kodet kvalitetsscore for hver klynge. De sammenkoblede basebetegnelsesfilene kan brukes av BaseSpace Sequence Hub eller bcl2fastq2. Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, for eksempel L001_1.cbcl
Klyngeplasseringsfiler	For hver strømningscelle inneholder en binær klyngeplasseringsfil XY-koordinatene for klynger i en flis. Et sekskantet oppsett som samsvarer med nanobrønnoppsettet til strømningscellen, forhåndsdefinerer koordinatene. Data/Intensities s_[lane].locs
Filterfiler	Filterfilen angir om en klynge passerte filtre. Filterfiler genereres i syklus 26 med 25 sykluser med data. Det genereres én filterfil for hver flis. Data/Intensities/BaseCalls/L001 s_[lane]_[tile].filter

Filtype	Filtype, -plassering og -navn
InterOp-filer	Binære rapporteringsfiler kan vises på instrumentet med instrumentets kontrollprogramvare eller utenfor instrumentet i SAV eller BaseSpace Sequence Hub. InterOp-filer oppdateres gjennom hele kjøringen. InterOp-mappe
Kjøringsinformasjonsfil	Oppgir kjøringens navn, antall sykluser i hver avlesning, om avlesningen er en Index Read (Indeksavlesning) og antall runder og fliser på strømningscellen. Kjøringsinformasjonsfilen opprettes i begynnelsen av kjøringen. [Root folder], RunInfo.xml

Utdatafiler for DRAGEN-sekundæranalyse

DRAGEN Bio-IT-plattformen analyserer sekvenseringsutdata på instrumentet ytterligere ved å benytte ett av følgende analyserør.

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

Denne delen gir informasjon om hvert av DRAGEN-rørene, inkludert informasjon om utdatafiler. I tillegg til å generere filer som er spesifikke for hvert rør, gir DRAGEN metrikk fra analysen i en `<sample_name>.metrics.json`-fil og rapportene som beskrives i [DRAGEN BCL Convert-rør på side 65](#). Mer informasjon om DRAGEN finnes på [støttesiden på nettstedet for DRAGEN Bio-IT-plattformen](#).

Alle DRAGEN-rør støtter dekomprimering av BCL-inndata og komprimering av BAM/CRAM-utdatafiler.

Utdatafilhensyn:

- For Germline-, RNA-, Enrichment- og DNA Amplicon-rør som kjører analyse på instrumentet vil ikke BAM-filer blir lastet opp til BaseSpace Sequence Hub hvis Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktiv, kjøringsovervåking og lagring) er valgt.

DRAGEN Enrichment-rør

DRAGEN Enrichment-røret støtter følgende funksjoner. Hvis du bruker DRAGEN 3.7 eller nyere, støttes både kimbane- og somatisk (kun tumor) modus.

- Prøvedemultipleksing
- Tilordning og innretting, inkludert sortering og merking i duplikat

- Liten variantbetegnelse
- Strukturell variantbetegnelse

Hvis du vil utføre en variantbetegnelse, må en *.bed-fil inkluderes i prøvearket eller angis i Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) på BaseSpace Sequence Hub. Strukturell variantbetegnelse genereres kun for paired-end-avlesninger og kimbanemodus.

Hvis du bruker DRAGEN Enrichment versjon 3.8 eller nyere, kan du legge inn en støybaselinefil for å forbedre ytelsen i somatisk modus. Se [Importere støybaselinefiler på side 17](#).

Røret genererer følgende utdatafiler.

Komponent	Type	Utdatafilnavn
Tilordning/innretting	BAM eller CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam eller • <sample_name>.cram
Liten variantbetegnelse	VCF og gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz
Strukturell variantbetegnelse	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.sv.vcf.gz

* gVCF-utdatafiler er kun tilgjengelige for kimbanemodus.

DRAGEN Germline-rør

DRAGEN Germline-røret støtter følgende funksjoner:

- Prøvedemultipleksing
- Tilordning og innretting, inkludert sortering og merking i duplikat
- Liten variantbetegnelse
- Strukturell variantbetegnelse for paired-end-avlesninger
- Kopinummervariantbetegnelse for humane genomer
- Gjentatte ekspansjoner for humane genomer
- Regioner med homozygositet for humane genomer
- **[DRAGEN v3.8 eller nyere]** CYP2D6-påvisning

Strukturell variantbetegnelse genereres kun for paired-end-avlesninger.

Røret genererer følgende utdatafiler.

Komponent	Type	Utdatafilnavn
Tilordning/innretting	BAM eller CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam eller • <sample_name>.cram
Liten variantbetegnelse	VCF og gVCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz
Strukturell variantbetegner	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.sv.vcf.gz
Kopinumervarianter	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.cnv.vcf.gz
Gjentatt ekspansjon	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.repeats.vcf.gz
Regioner med homozygositet	CSV og BED	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.roh_metrics.csv • <sample_name>.roh.bed
CYP2D6-påvisning	TSV	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.cyp2d6.tsv

DRAGEN DNA Amplicon-rør

DRAGEN-røret støtter følgende funksjoner:

- Prøvedemultipleksing
- Tilordning og innretting, inkludert sortering og merking i duplikat
- Liten variantbetegnelse i kimbane- eller somatisk modus.

Hvis du vil utføre en variantbetegnelse, må en *.bed-fil inkluderes i prøvearket eller angis i Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) på BaseSpace Sequence Hub.

Røret genererer følgende utdatafiler.

Komponent	Type	Utdatafilnavn
Tilordning/innretting	BAM eller CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.bam eller • <sample_name>.cram
Liten variantbetegnelse	VCF og gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <sample_name>.hard-filtered.gvcf.gz • <sample_name>.hard-filtered.vcf.gz

*gVCF-utdatafiler er kun tilgjengelige i kimbanemodus.

DRAGEN RNA-rør

DRAGEN RNA-røret støtter følgende funksjoner

- Prøvedemultipleksing
- Tilordning og innretting, inkludert sortering og merking i duplikat
- Påvisning av genfusjon
- Transkripsjonskvantifisering

- [DRAGEN v3.8 eller nyere] Differensiell genekspressjon

Hvis du vil generere utdatafiler, angir du en GTF-fil i prøvearket eller sørger for at standard `genes.gtf.gz` finnes med referansegenomet.

Røret genererer følgende utdatafiler.

Komponent	Type	Utdatafilnavn	Beskrivelse
Tilordning/innretting	BAM eller CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <code><sample_name>.bam</code> eller • <code><sample_name>.cram</code> 	Innrettingsutdata som oppfyller SAM-spesifikasjoner.
Påvisning av genfusjon	Ren tekst	<ul style="list-style-type: none"> • <code><sample_name>.fusion_candidates.preliminary</code> • <code><sample_name>.fusion_candidates.final</code> 	<ul style="list-style-type: none"> • Fusjonskandidater før bruk av filtre. • Fusjonskandidater etter bruk av filtre.
Transkripsjonskvantifisering	Ren tekst	<ul style="list-style-type: none"> • <code>sample_name.quant.genes.sf</code> • <code>sample_name.quant.sf</code> 	<ul style="list-style-type: none"> • Resultater for transkripsjonskvantifisering på gennivå. • Alle resultater for transkripsjonskvantifisering.
Differensiell ekspresjon	PNG	Se følgende tabell over utdatafiler for differensiell ekspresjon.	Hvis du vil generere utdatafiler, må du konfigurere en sammenligning i prøvearket.

Du får følgende filer når differensiell ekspresjon er aktivert.

Filnavn	Beskrivelse
<code>Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv</code>	Inneholder analysemetrikk for differensiell ekspresjon.
<code>Control_vs_Comparison.genes.counts.csv</code>	Beskriver antall avlesninger som er tilordnet hvert gen for hver prøve i kontroll- og sammenligningsgruppene.

Filnavn	Beskrivelse
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Et varmekart over ekspresjonen av genene fra differensiell ekspresjon for prøver i kontroll- og sammenligningsgruppene. Varmekartet viser kun gener fra differensiell ekspresjon med en justert P-verdi $< 0,05$. Hvis det er flere enn 30 gener fra differensiell ekspresjon, brukes kun de øverste 30 genene fra differensiell ekspresjon. Hvis DESeq1 ikke konvergerer, eller hvis det ikke er noen gener fra differensiell ekspresjon, blir ikke filen generert.
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Inneholder variasjonen av genekspresjonsforhold som en funksjon av gjennomsnittlig signalintensitet. For å vise forskjellene mellom målinger tatt i to prøver, transformerer plottet dataene til M- (loggforhold) og A-skalaer (gjennomsnittlig gjennomsnitt), og plottet deretter verdiene. MA-plottet viser log ₂ -foldendringene som kan tilskrives en gitt variabel over gjennomsnittet av normaliserte tellinger for alle prøvene. Hvis den justerte P-verdien er mindre enn 0,1, er punktene røde. Punkter som faller ut av vinduet plottes som åpne trekanten. Trekanten som peker oppover representerer en positiv loggfoldendring. Trekanten som peker nedover representerer en negativ loggfoldendring.
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	Plott viser de to første hovedkomponentene som forklarer mest varians.
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Inneholder DESeq2-resultater, som beskriver gjennomsnittlig ekspresjon, log ₂ (foldendring), standardfeil for log ₂ , P-verdi, justert P-verdi og ekspresjonsstatus for hvert gen.
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Inneholder regulariserte loggtransformerte tellinger beregnet av DESeq2.

DRAGEN Single Cell RNA-rør

DRAGEN støtter følgende funksjoner:

- Prøvedemultipleksing
- Tilordning og innretting, inkludert sortering og merking i duplikat
- Celle- og genklassifisering

Hvis du vil generere utdatafiler, angir du en GTF-fil i prøvearket eller sørger for at standard `genes.gtf.gz` finnes med referansegenomet.

Røret genererer følgende utdatafiler.

Komponent	Type	Utdatafilnavn
Tilordning/innretting	BAM eller CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <code><sample_name>.bam</code> eller • <code><sample_name>.cram</code>
Celle-/genklassifisering	TSV, CSV og 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>
Analyserapporter	HTML	<code><sample_name>.dragen.scrna-report.*.html</code>

DRAGEN BCL Convert-rør

DRAGEN BCL Convert-røret bruker BCL-data generert fra sekvenseringskjøringen og prøvearkinformasjonen til å opprette en FASTQ-fil for hver prøve. Navnet på FASTQ-filen er `<sample_name>.fastq.gz`.

Røret genererer følgende rapporter.

Komponent	Type	Utdatafilnavn
Demultipleksing	CSV	• <code>Demultiplex_Stats.csv</code>
Adaptermetrikk	CSV	• <code>Adapter_Metrics.csv</code>
Indekshopping	CSV	• <code>Index_Hopping_Counts.csv</code>
Topp ukjente strekkoder	CSV	• <code>Top_Unknown_Barcodes.csv</code>

Statistikkrapport for demultipleksing

Statistikkrapporten for demultipleksing inneholder informasjon om antall avlesninger for passerende filter som er tilordnet hver prøve i prøvearket. Alle avlesninger som ikke er tilknyttet en prøve, klassifiseres som uvisse. Rapporten inneholder også informasjon om kvalitetsscorene basert på avlesningene for passerende filter (PF) som er tilordnet hver prøve.

Følgende informasjon er inkludert.

Metrikk	Beskrivelse
Lane (Bane)	Banen på strømningscellen prøven ble sekvensert.
SampleID	Prøve-ID-en fra prøvearket. Hvis en avlesning ikke svarer til en prøve, viser feltet <code>undetermined</code> (uvis).

Metrikk	Beskrivelse
Index (Indeks)	Opplistingen for Index Read 1 (Indeksavlesning 1) og Index Read 2 (Indeksavlesning 2) fra prøvearket atskilt med en bindestrek. Hvis en avlesning ikke svarer til en prøve, viser feltet <code>undetermined</code> (uviss).
# Reads (Ant. avlesninger)	Antall avlesninger for PF demultiplekset for prøven i den angitte banen.
# Perfect Index Reads (Nøyaktige indeksavlesninger)	Antall avlesninger som samsvarer nøyaktig med de kombinerte indekssekvensene som er angitt i prøvearket.
# One Mismatch Index Reads (Indeksavlesninger med ett misforhold)	Antall avlesninger med én feil i de kombinerte indekssekvensene som er angitt i prøvearket.
# of \geq Q30 Bases (PF) (Ant. \geq Q30-baser (PF))	Antall baser, inkludert adaptore, som svarer til avlesninger som består en Q30-kvalitetsterskel.
Mean Quality Score (PF) (Gjennomsnittlig kvalitetsscore (PF))	Gjennomsnittlig kvalitetsscore for avlesninger som svarer til prøven i den angitte banen. Verdien inkluderer adapterbaser.

Rapporter for adaptermetrikk

Adaptermetrikkfilen inneholder antall adapter- og prøvebaser som er tilknyttet hver avlesning. Følgende informasjon er inkludert.

Metrikk	Beskrivelse
Lane (Bane)	Banen på strømningscellen prøven ble sekvensert.
Sample_ID	Prøve-ID-en fra prøvearket. Hvis en avlesning ikke svarer til en prøve, viser feltet <code>undetermined</code> (uviss).
index	Sekvensen index1 fra prøvearket. Feltet er tomt hvis index ikke ble angitt i prøvearket, eller prøve-ID-verdien er <code>undetermined</code> (uviss).
index2	Sekvensen index2 fra prøvearket. Feltet er tomt hvis index2 ikke ble angitt i prøvearket, eller prøve-ID-verdien er <code>undetermined</code> (uviss).
R1_AdapterBases	Antall baser som svarer til AdapterRead1 i prøvearket.

Metrikk	Beskrivelse
R1_ SampleBases	Antall tilpassede eller maskerte baser fra Read 1 (Avlesning 1) for tilsvarende bane og prøve.
R2_ AdapterBases	Antall baser som svarer til AdapterRead2 i prøvearket.
R2_ SampleBases	Antall tilpassede eller maskerte baser fra Read 2 (Avlesning 2) for tilsvarende bane og prøve.
# Reads (Ant. avlesninger)	Antall avlesninger for prøven i den angitte banen.

Rapport for antall indekshoppinger

Rapporten for antall indekshoppinger inneholder antall avlesninger for hver forventet og hoppet indeks for dobbel indeks-kjøringer. Rapporten inneholder kun unike doble indekser per bane der ingen strekkodekollisjon er påvist i hver av indeksene. For å generere metrikk for indekshopping for en bane, må hvert oppføringspar i hver indeks ha en hamningsavstand på minst $2N + 1$, der N representerer toleransen for strekkodemisforholdet som er angitt for indeksen.

Følgende informasjon er inkludert.

For kjøring som ikke skal indekseres, enkel indeks-kjøringer eller baner som ikke inneholder unike doble indekser, inneholder filen kun overskriftene.

Metrikk	Beskrivelse
Lane (Bane)	Banen på strømningscellen prøven ble sekvensert.
# Reads (Ant. avlesninger)	Antall avlesninger for prøven i den angitte banen.
SampleID	Prøve-ID-en fra prøvearket. Hvis en avlesning ikke svarer til en prøve, viser feltet <code>undetermined</code> (uviss).
index	Sekvensen <code>index1</code> fra prøvearket. Feltet er tomt hvis en avlesning er enkeltendret, eller prøve-ID-verdien er <code>undetermined</code> (uviss).
index2	Sekvensen <code>index2</code> fra prøvearket. Feltet er tomt hvis en avlesning er enkeltendret, eller prøve-ID-verdien er <code>undetermined</code> (uviss).

Rapport for topp ukjente strekkoder

Rapporten for topp ukjente strekkoder inneholder topp 100 indeks eller indekspar per bane som ikke ble identifisert i prøvearket i henhold til antall tillatte misforhold. Hvis flere indeksverdier er plassert som den 100. høyeste indeksantalloppføringen, utmates alle indeksverdier med samme verdi som den 100.

oppføringen.

Følgende informasjon er inkludert:

Metrikk	Beskrivelse
Lane (Bane)	Banen på strømningscellen prøven ble sekvensert.
index	Sekvensen for hver ukjente indeks i indekser for Read 1 (Avlesning 1). Feltet er tomt hvis det ikke finnes ukjente indekser.
index2	Sekvensen for hver ukjente indeks i indekser for Read 2 (Avlesning 2). Feltet er tomt hvis kjøringen var enkeltavlesning eller det ikke fantes ukjente indekser.
# Reads (Ant. avlesninger)	Antall avlesninger for prøven i den angitte banen.

Rapporter for Illumina DRAGEN-kvalitetskontroller

For alle rør genererer DRAGEN FastQC kvalitetskontrollplotter som standard. Aggregerte kvalitetskontrollresultater lagres i mappen `AggregatedFastqcMetrics`, og resultater for hver prøve lagres i mappen `<sample_name>`.

Kvalitetskontrollrapporter genereres ikke hvis antall prøver er flere enn 512.

Følgende kvalitetskontrollplotter følger med.

Kvalitetskontrollplott	Beskrivelse
adapter_content	Prosentandel sekvenser for hvert basepar.
positional_mean_quality	Gjennomsnittlig basekvalitetsscore på Phred-skalaen for hver avlesningsposisjon.
gc_content	Prosentandel GC-innhold for hver sekvensavlesning.
positional_quality.read_1	Gjennomsnittlig kvalitetsverdi for baser med et spesifikt nukleotid og en gitt plassering i Read 1 (Avlesning 1) på Phred-skalaen.
gc_quality	
positional_quality.read_2	Gjennomsnittlig kvalitetsverdi for baser med et spesifikt nukleotid og en gitt plassering i Read 2 (Avlesning 2) på Phred-skalaen.
n_content	
read_length	Sekvenslengden for hver avlesning.

Kvalitetskontrollplott	Beskrivelse
positional_base_content.read_1	Antall baser for hvert spesifikt nukleotid på gitte plasseringer i Read 1 (Avlesning 1).
read_quality	Gjennomsnittlig kvalitetsscore på Phred-skalaen for hver sekvenseringsavlesning.
positional_base_content.read_2	Antall baser for hvert spesifikt nukleotid på gitte plasseringer i Read 2 (Avlesning 2).

Utdatamappestruktur for DRAGEN-sekundæranalyse

DRAGEN genererer som standard utdatafiler i utdatamappen som er valgt i fanen Settings (Innstillinger). For hver arbeidsprosess lager DRAGEN en sammendragsrapport i filen `report.html`.

📁 Data

📄 `report.html`

📄 `report_files`

📁 AggregateFastQCPlots

📄 `*.png`

📄 `*stderr.txt`

📄 `*stdout.txt`

📄 `dragen_prev_48_hrs.log`

📄 `dln_prev_48_hrs.log`

📄 `SampleSheet.csv`

📄 Inndatafiler for kjøring (f.eks. BED-, GTF-filer)

📁 sample_name

📁 enrich_caller , germline_seq, dna_amplicon_seq, rna_seq eller scrna_seq

📁 sample_name

📄 `*.png`

📄 `dragen_*.log`

📄 `sample_name.*.metrics.csv`

📄 **[DNA]** `sample_name.*.vcf.gz`

📄 **[DNA]** `sample_name.*.gvcf.gz` – Ikke tilgjengelig for Amplicon-rør (somatisk) for DRAGEN Bio-IT-plattformen.

📄 `sample_name.*.bam` eller `sample_name.*.cram`

- 📄 Logger
- 📄 [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_drage-scRNA-report.*.html
- 📄 [scRNA] sample_name.scRNA.barcodeSummary.tsv
- 📄 [Kimbane] sample_name.roh_metrics.csv
- 📄 [Kimbane] sample_name.roh.bed
- 📄 [Kimbane] 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** – Kun tilgjengelig hvis KeepFastq er konfigurert som true (sant).

- 📄 *.fastq.gz

📁 **ora_fastq** – Kun tilgjengelig hvis FastqCompressionFormat er konfigurert som drage.

- 📄 *.fastq.ora

RunInstrumentAnalyticsMetrics

0001

dataset.json
fastqc_metrics.csv

0002

dataset.json
fastqc_metrics.csv
Adapter_Metrics.csv
Demultiplex_Stats.csv
Index_Hopping_Counts.csv

Reports

Demultiplex_Stats.csv
RunInfo.xml
Trim_Metrics.csv
fastq_list.csv
SampleSheet.csv
Index_Hopping_Counts.csv
Top_Unknown_Barcodes.csv

Read1InstrumentAnalyticsMetrics – Kun for paired-end-avlesninger.

0001

dataset.json

0002

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

Read1Metrics – Kun for paired-end-avlesninger.


Adapter_Metrics.csv
Index_Hopping_Counts.csv

Vedlikehold

Denne delen beskriver prosedyrene som er nødvendige for å opprettholde et sunt system. Finn ut hvordan du installerer programvareoppdateringer, bytter luftfilter og utfører andre periodiske vedlikeholdsprosedyrer. Å holde kontrollprogramvaren oppdatert, sikrer at systemet har de nyeste feilrettingene og funksjonene installert for optimal ytelse.

Frigjøre plass på harddisken

En sekvenseringskjøring krever ca. 200 GB ledig plass på den lokale harddisken. Det vises en advarsel når det er lite plass igjen. Bruk følgende trinn for å frigjøre plass ved å slette fullførte kjøring og installerte referansegenomer fra en midlertidig kjøringssmappe.

 Slett kun kjøring ved hjelp av NextSeq 1000/2000-kontrollvaren i stedet for manuelt gjennom operativsystemet. Å slette kjøring manuelt kan påvirke kontrollprogramvaren negativt.

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Disk Management** (Diskbehandling).
Skjermbildet Disk Management (Diskbehandling) vises med en liste over kjøring og referansegenomer som er lagret til den lokale harddisken.
2. Velg **Delete Run** (Slett kjøring) for kjøringen du vil slette.
Når du sletter en kjøring, slettes den lokale kjøringssmappen. Utdatamappen, som er en kopi av kjøringssmappen, beholdes.
3. I dialogboksen bekrefter du sletting av kjøringen ved å velge **Yes, Delete Run** (Ja, slett kjøring).
4. Gjenta trinn 2 og 3 for hver kjøring du vil slette.
5. Velg **Delete Genome** (Slett genom) for genomet du vil slette.
6. I dialogboksen velger du **Yes, Delete Genome** (Ja, slett genom).
7. Gjenta trinn 5 og 6 for hvert genom du vil slette.
8. Når du er ferdig, lukker du Disk Management (Diskbehandling) for å gå tilbake til startskjermbildet.

Programvareoppdateringer

Hvis du oppdaterer programvaren, sikrer du at systemet har de nyeste funksjonene og feilrettingene. Programvareoppdateringer er samlet i en systemserie som inneholder følgende programvare:

- NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare
- NextSeq 1000/2000-oppskrifter
- Universal Copy Service
- Sanntidsanalyse

i | DRAGEN-moduler er ikke inkludert i systemserien. Installer dem hver for seg etter behov. Oppnå tilgang til DRAGEN-modulprogramvaren fra støttesidene.

Systemet er konfigurert for å laste ned programvareoppdateringer automatisk eller manuelt:

- **Automatic updates** (Automatiske oppdateringer) – Oppdateringer lastes automatisk ned fra BaseSpace Sequence Hub slik at du kan installere dem. Dette alternativet krever Internett-tilkobling, men ikke en BaseSpace Sequence Hub-konto.
- **Manual updates** (Manuelle oppdateringer) – Oppdateringer lastet ned fra nettet, lagres lokalt eller på en bærbar stasjon, og installeres fra den lagrede plasseringen. Dette alternativet krever ikke at instrumentet har en Internett-tilkobling.

Installere en automatisk programvareoppdatering


1. Kontroller at det ikke pågår sekvenseringskjøringer eller sekundæranalyse på instrumentet.
2. Logg inn på ilmnadmin.
3. Velg **Software Update** (Programvareoppdatering) i kontrollprogramvaremenyen. Systemer som er konfigurert for automatiske oppdateringer viser et varsel når en programvareoppdatering er tilgjengelig.
4. Se etter en oppdatering ved å velge **Check Online for Software Update** (Se etter programvareoppdatering på nettet).
5. Last ned den nye programvareversjonen ved å velge **Update Now** (Oppdater nå). Når nedlastingen er fullført, lukkes kontrollprogramvaren, og installasjonsveiviseren vises. Kontrollprogramvaren starter automatisk på nytt. En eventuell fastvareoppdatering skjer automatisk etter omstarten.

i | Det er ikke mulig å avbryte en oppdatering etter at installasjonen begynner. Du kan kun avbryte en oppdatering under nedlasting.

Installere en manuell programvareoppdatering

1. Logg inn på ilmnadmin.
2. Kontroller at det ikke pågår sekvenseringskjøringer eller sekundæranalyse på instrumentet.
3. Når en programvareoppdatering er tilgjengelig, laster du ned installasjonsprogrammet for serien (*.tar.gz) fra [støttesiden for NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemer](#). Lagre installasjonsprogrammet til en lokal eller bærbar stasjon.
4. Hvis du lagret installasjonsprogrammet til en bærbar stasjon, plugges du stasjonen i en USB 3.0-port, som du finner både på siden og på baksiden av instrumentet.
5. I kontrollprogramvaren velger du **Software Update** (Programvareoppdatering) i kontrollprogramvaremenyen.
6. Naviger til installasjonsprogrammet ved å velge **Choose...** (Velg ...).

7. Start initialiseringen ved å velge **Update Now** (Oppdater nå).
Kontrollprogramvaren viser en opptattindikator under installasjonen.
Kontrollprogramvaren starter automatisk på nytt. En eventuell fastvareoppdatering skjer automatisk etter omstarten.

 | Det er ikke mulig å avbryte en oppdatering etter at installasjonen begynner. Du kan kun avbryte en oppdatering under nedlasting.

Oppdateringer for DRAGEN-arbeidsprosesser og -lisensen

Kun systemadministratorer kan installere DRAGEN-arbeidsprosesser og fornye DRAGEN-lisensen.

Fornye DRAGEN-lisens på nettet

Hvis NextSeq 1000/2000 er koblet til Internett, oppdater DRAGEN Bio-IT-plattformen lisensen din på følgende måte.

1. En ny lisensnøkkel får du ved å kontakte Illuminas tekniske støtte.
2. Vent i 24 timer på at lisensen oppdateres automatisk, eller oppdater lisensen umiddelbart på følgende måte.
 - a. Velg kontrollprogramvaremenyen, og velg deretter **DRAGEN**.
 - b. Velg **Check Online** (Kontroller på nettet) for å kontrollere om en ny DRAGEN-lisensnøkkel er tilgjengelig.
 - c. Er den det, velger du **Update** (Oppdater).

Fornye DRAGEN-lisens i frakoblet modus

Hvis NextSeq 1000/2000 ikke er koblet til Internett, oppdater DRAGEN Bio-IT-plattformen lisensen din på følgende måte.

1. En ny lisensnøkkel får du ved å kontakte Illuminas tekniske støtte. Lagre filen `license.zip` til en lokal eller bærbar stasjon.
2. Hvis du lagret *.zip-filen til en bærbar stasjon, plugg du stasjonen i en USB 3.0-port, som du finner både på siden og på baksiden av instrumentet. Flytt instrumentet forsiktig etter behov for å få tilgang til baksiden.
3. Velg kontrollprogramvaremenyen, og velg deretter **DRAGEN**.
4. Velg **Choose** (Velg) for å navigere til *.zip-filen, og deretter velger du **Open** (Åpne).

Installere DRAGEN-arbeidsprosesser på nettet

Hvis NextSeq 1000/2000 er koblet til Internett, kan du installere DRAGEN-arbeidsprosesser direkte i NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren. Du kan kun installere DRAGEN-arbeidsprosesser på nettet i NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare v1.3.

1. Velg kontrollprogramvaremenyen, og velg deretter **Process Management** (Prosessbehandling).
2. Kontroller at det ikke pågår sekvenseringskjøringer eller sekundæranalyse på instrumentet.
3. Velg kontrollprogramvaremenyen, og velg deretter **DRAGEN**.
Under Version (Versjon) oppgir delen Available Workflows (Tilgjengelig arbeidsprosesser) arbeidsprosessene som er installert på systemet.
4. Hvis du vil installere DRAGEN-arbeidsprosesser i NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren, velger du **Check Online** (Kontroller på nettet).
Ikke alle DRAGEN-versjoner og -arbeidsprosesser er kompatible med installasjon på nettet. Bruk installasjon i frakoblet modus til andre arbeidsprosesser.
5. Velg avmerkingsboksen for arbeidsprosessene du vil installere. Hvis ikke den er installert, må du installere den nyeste versjonen av BCL Convert først.
Du kan se informasjon om den nyeste versjonen av en arbeidsprosess i versjonsmerknadene.
6. Start installasjonen ved å velge **Install** (Installer).
7. Angi ilmnadmin som systempassord, og velg deretter **Authenticate** (Godkjenn).

Installere DRAGEN-arbeidsprosesser i frakoblet modus

1. Når en oppdatering for DRAGEN-arbeidsprosesser er tilgjengelig, laster du ned installasjonsprogrammet (*.tar.gz) fra [støttesiden for DRAGEN](#). Lagre installasjonsprogrammet til en lokal eller bærbar stasjon.
2. Hvis du lagret installasjonsprogrammet til en bærbar stasjon, plugges du stasjonen i en USB 3.0-port, som du finner både på siden og på baksiden av instrumentet. Flytt instrumentet forsiktig etter behov for å få tilgang til baksiden.
3. Velg kontrollprogramvaremenyen, og velg deretter **Process Management** (Prosessbehandling).
4. Kontroller at det ikke pågår sekvenseringskjøringer eller sekundæranalyse på instrumentet.
5. Velg kontrollprogramvaremenyen, og velg deretter **DRAGEN**.
6. Under Version (Versjon) velger du **Browse for New Version** (Søk etter ny versjon) for å navigere til installasjonsprogrammet.
7. Start installasjonen ved å velge **Install** (Installer).
8. Angi ilmnadmin som systempassord, og velg deretter **Authenticate** (Godkjenn).

Skifte ut luftfilteret

Skift ut et utløpt luftfilter ved hjelp av følgende instruksjoner hver 6. måned.

Luftfilteret er en rektangulær kassett til engangsbruk, som dekker viften på høyre side av instrumentet. Det sørger for grundig avkjøling og forhindrer at smuss kommer inn i systemet. Instrumentet leveres med ett installert luftfilter og ett i reserve. Ekstra reservedeler omfattes av en gyldig servicekontrakt for instrumentet, eller de kan kjøres separat fra Illumina.

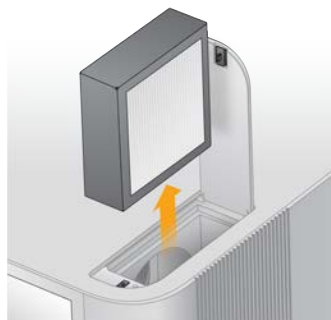
1. Oppå instrumentet trykker du på høyre side av dekkplaten slik at den frigjøres som vist i illustrasjonen nedenfor.



2. Åpne platen.



3. Trykk for å frigjøre luftfilterkassetten, fjern den fra midten av platen, og kast den.



4. Sett inn et nytt luftfilter i beholderen, og trykk for å feste.

5. Lukk dekkplaten, og trykk den på plass.



6. Sett instrumentet tilbake på plass.

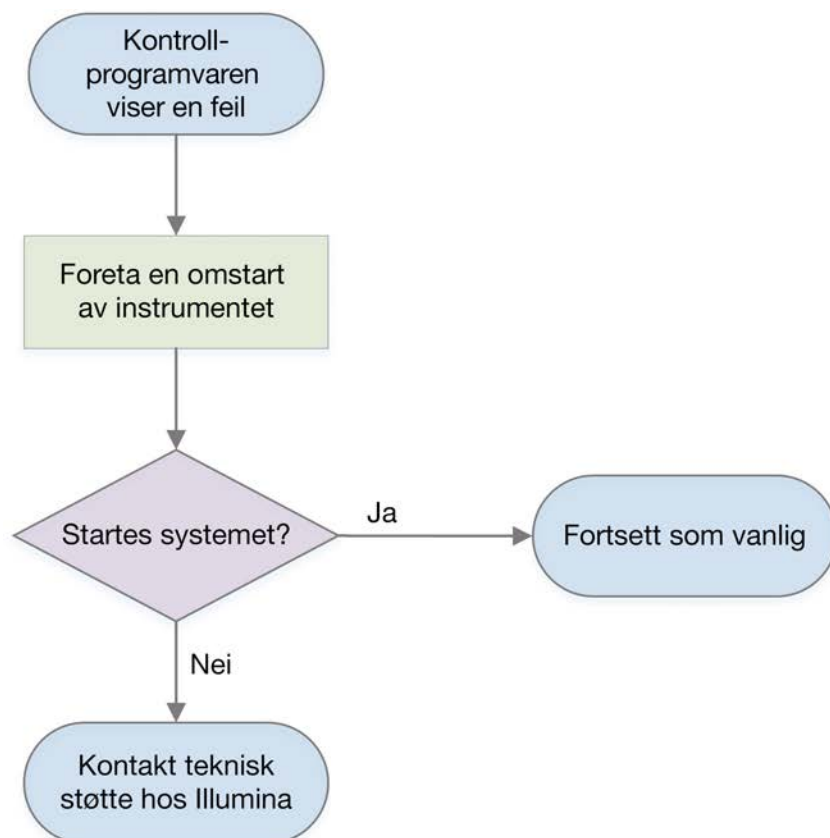
Feilsøking

Denne delen inneholder trinnvise instruksjoner for å avbryte en kjøring, foreta en strømtilstandsending for instrumentet og andre prosedyrer for feilsøking.

Løse feilmeldinger


Dette vedlegget gir detaljert informasjon om diverse trinn for feilsøking. Følgende flytskjema gir en oversikt over feilsøking feilmeldinger som vises under initialisering, kjøring oppsett eller sekvensering og ikke løses av et nytt forsøk.

Mange feil kan løses med en omstart: å slå av instrumentet og deretter starte det på nytt igjen. Mer informasjon om omstart av instrumentet finnes under [Foreta en omstart av instrumentet på side 80](#).



Sette forbruksmaterieell tilbake til oppbevaring

Bruk følgende instruksjoner for å oppbevare en tint kassett og strømningscelle i tilfelle det oppstår en instrumentfeil under instrumentets før kjørings-kontroll før væskekontrollen.

1. Skill strømningscellen fra kassetten.
2. Fjern og kast fortynnet bibliotek fra beholderen (opptil ~18 µl).
-  Klargjør en ny fortynning av samme bibliotek til neste kjøring for å unngå krysskontaminasjon av prøver med restbibliotek i beholderen.
3. Plasser kassetten i oppbevaring som holder 2 °C til 8 °C slik at etiketten vender opp og luft kan sirkulere på alle sider.
Ikke overskrid 72 timer. Hvis kassetten ble tint i kjøleskapet i 12 timer over natten, må du ikke overskride 60 timer.
4. Legg strømningscellen tilbake i den opprinnelige aluminiumsfoliepakningen med tørkemiddelet.
5. Teip foliepakningen igjen, og plasser den i oppbevaring som holder 2 °C til 8 °C.
Ikke overskrid 72 timer.

Avbryte en kjøring

1. Velg **End Run** (Avslutt kjøring).
2. Hvis du vil skylle reagenskassetten automatisk, velger du avmerkingsboksen **Purge Reagent Cartridge** (Skyll reagenskassett).
Standardvalget er konfigurert i innstillingene for NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvaren.
3. Velg **Yes, end the sequencing run** (Ja, avslutt sekvenseringskjøringen).
Å avbryte en kjøring er endelig. Programvaren kan ikke gjenoppta kjøringen, og forbruksmaterieell kan ikke brukes på nytt etter instrumentkontrolldelen av kontroller før kjøring.
4. Åpne dekselet og støt ut brettet ved å velge **Eject Cartridge** (Støt ut kassett).
5. Fjern kassetten fra brettet.
6. Ta vare på eller kast kassetten, avhengig av når avbrytelsen skjedde:

Forhold	Forekomst
Du avbrøt før eller under før kjøring-kontrollen av instrumentet og vil bruke forbruksmateriellet på nytt.	Se Sette forbruksmaterieell tilbake til oppbevaring på side 79 .
Alle andre forhold.	Se Laste ut forbruksmaterieell på side 51

7. Last inn brettet på nytt og gå tilbake til startskjermbildet ved å velge **Close Door** (Lukk dør).
Sensorer bekrefter at kassetten er tatt ut.

Sette en kjøring i kø på nytt

Hvis det vises en feil for Status of Secondary Analysis (Status for sekundæranalyse) i Process Management (Prosessbehandling), kan du sette kjøringen i kø på nytt for å utføre DRAGEN-analysen på instrumentet på nytt på de genererte cBCL-filene. Den opprinnelige kjøringsskjermbildet må fortsatt finnes på instrumentet for at det skal være mulig å sette i kø på nytt. Når du bruker denne funksjonaliteten for å sette i kø på nytt, settes ikke kjøring i kø på nytt i BaseSpace Sequence Hub. Hvis du vil sette i kø på nytt i BaseSpace Sequence Hub, finner du informasjon under Reparer prøveark i hjelpesenteret til BaseSpace Sequence Hub.

1. Oppdater prøveark v2, og deretter lagrer du prøvearket på en bærbar eller montert nettverksstasjon.
2. Hvis du lagret prøvearket på en bærbar stasjon, plugges du stasjonen i en USB 3.0-port, som du finner både på siden og på baksiden av instrumentet. Flytt instrumentet forsiktig etter behov for å få tilgang til baksiden.
3. Velg kontrollprogramvaremenyen, og velg deretter **Process Management** (Prosessbehandling).
4. Kontroller at det ikke pågår sekvenseringskjøringer eller sekundæranalyser på instrumentet.
5. Velg **Requeue** (Sett i kø på nytt) ved siden av den fullførte kjøringen for å sette den i kø på nytt.
6. Velg **Choose** (Velg) for å navigere til det oppdaterte prøvearket, og deretter velger du **Open** (Åpne).
7. Velg **Start Requeue** (Start å sette i kø på nytt).

Foreta en omstart av instrumentet

Hvis du foretar en strømtilstandsending for instrumentet, kan systemet trygt avsluttes og startes på nytt for å gjenopprette en tapt tilkobling, justere en spesifisering eller løse en initialiseringsfeil. Programvaremeldinger angir når du skal foreta en omstart for å løse en feil eller advarsel.

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **Shut Down Instrument** (Slå av instrument).
2. Hvis ikke systemet avsluttes, trykker du på og holder inne på/av-knappen på høyre side av instrumentet til lyset tones ned.
3. Når på/av-knappen pulserer, trykker du på av-siden (**O**) av vekslebryteren på baksiden. Det kan hende at på/av-knappen fortsetter å pulsere etter at strømmen er slått av.

Figur 8 Veksleknappens plassering



4. Vent i 30 sekunder.
5. Trykk på på-siden (I) av vekslebryteren.
6. Når på/av-knappen pulserer, venter du i 30 sekunder, og deretter trykker du på den.

Figur 9 På/av-knappens plassering



7. Vent i omtrent 5 minutter mens operativsystemet lastes. Når operativsystemet er lastet, logger du deg på systemet.
Kontrollprogramvaren startes og initialiserer systemet. Vent i omtrent 5 minutter mens systemet initialiserer. Startskjermbildet vises når initialiseringen er fullført.

Utføre en systemkontroll

Det er ikke nødvendig med en systemkontroll ved normal drift eller instrumentvedlikehold. Det kan imidlertid hende at en representant for Illuminas tekniske støtte ber deg utføre en systemkontroll i forbindelse med feilsøking.

Fire undersystemkontroller tar omtrent 58 minutter å feilsøke før kjøring-kontrollfeil og andre problemer. Testene bekrefter om komponenter er riktig innrettet og fungerer som de skal.

Testene mates ut i mappen `system-check`, som er plassert under `/usr/local/illumina/system-check`.

Sørg for å laste ut kassetten før du kjører systemkontroller.

Kjøre en systemkontroll

1. I kontrollprogramvaremenyen velger du **System Checks** (Systemkontroller).
2. Velg avmerkingsboksen for de av de følgende systemkontrollene som du vil utføre.
 - **Network Connectivity** (Nettverkstilkobling) – Kontrollerer status og ytelse for nettverkstilkoblingen.
 - **Enclosure** (Kabinett) – Kontrollerer ytelsen til det termiske systemet og dekselløftmekanismen.
 - **Motion** (Bevegelse) – Kontrollerer bevegelsesgrensene og ytelsen til Z-stadiet og XY-stadiet.
 - **Optics** (Optikk) – Kontrollerer ytelsen til avbildningsmodulen.
3. Velg **Start**.

Gjenopprette til fabrikkinnstillinger

Gjenopprett systemet til fabrikkinnstillinger når du vil nedgradere programvaren eller gjenopprette fra en uønsket konfigurasjon. Denne funksjonen skal kun brukes av en Illumina-representant.

Ta bilde av installasjon

Ta et systembilde for å sikkerhetskopiere en vellykket, fungerende programvareinstallasjon. Dette systembildet kan gjenopprettes på et senere tidspunkt. Det anbefales at du tar systembildet umiddelbart etter at du har fullført den første installasjonen og endret passordet med en Illumina-representant.

1. Start Linux på nytt.
2. Når du blir bedt om å velge et operativsystemet, velger du **Capture Installed Image** (Ta bilde av installasjon).

Operativsystemalternativene vises et kort øyeblikk før det automatisk fortsettes med NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare.



Fordi kun ett bilde beholdes i minnet, vil dette overskrive det forrige bildet som ble tatt.


3. Vent ca 30 minutter til systemet tar det gjeldende bildet av installasjonen.
Å ta bildet kan innbefatte flere omstarter. Når det er ferdig, starter systemet på nytt med det gjeldende bildet av installasjonen lagret i minnet.

Gjenopprette tatt bilde

Gjenopprett systemet til bildet som ble tatt tidligere for å gjenopprette fra en uønsket konfigurasjon.

1. Start Linux på nytt.
2. Når du blir bedt om å velge et operativsystem, velger du **Restore Installed Image** (Gjenopprett bilde av installasjon).

Operativsystemalternativene vises et kort øyeblikk før det automatisk fortsettes med NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare.

-  | Passord er knyttet til systembildet. Etter gjenoppretting bruker du passordet til det gjenopprettede bildet for å logge inn på systemet.

3. Vent i ca. 30 minutter til gjenopprettingen er fullført.
Gjenopprettingen kan innbefatte flere omstarter. Når den er fullført, starter systemet på nytt med det gjenopprettede bildet.

Ressurser og referanser

Innstillinger for prøveark v2

Hvis du følger lokal modus, kan du bruke prøveark v2-filformatet til å konfigurere kjøringssinnstillingene. Opprett prøvearket i Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring) eller ved å redigere *prøveark 2v-malen for NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemer*. Når du redigerer prøvearket, må du sørge for at følgende deler og felt er inkludert i den oppgitte rekkefølgen og oppfyller kravene. Etter redigering bruker du en bærbar eller montert nettverksstasjon til å overføre prøvearket til NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemene. Når du navigerer til prøvearket i kontrollprogramvaren, kopieres det til en før kjøring-mappe på instrumentet slik at den bærbare stasjonen kan fjernes.

Sørg for at innstillingene for prøveark v2 oppfyller følgende krav:

- Indekssekvensene som er angitt i prøvearkdelen BCLConvert_Data skal samsvare med indekssettet som er valgt i NextSeq 1000/2000.
- Hvis du bruker NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare v1.2, må DRAGEN-versjonen som er angitt i prøvearket være installert og aktiv på systemet. Installasjonsinformasjon finnes under [Programvareoppdateringer på side 72](#).
- Hvis du bruker NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare v1.3, må DRAGEN-versjonen som er angitt i prøvearket være installert på systemet. Kontrollprogramvaren påviser automatisk DRAGEN-versjonen i prøvearket, og ber deg om å bytte aktive versjoner ved behov. Installasjonsinformasjon finnes under [Programvareoppdateringer på side 72](#).

Hvis du bruker DRAGEN, må du konfigurere tilleggsinnstillinger. Mer informasjon finnes under [Innstillinger for DRAGEN-prøveark på side 88](#)

Last ned prøveark v2-malen fra Product Files (Produktfiler) på støttesiden for NextSeq 1000- og NextSeq 2000-sekvenseringssystemer. Hvis du opprettet et prøveark ved hjelp av Instrument Run Setup (Oppsett for instrumentkjøring), kan analysen mislykkes hvis du endrer prøvearket etter første nedlasting.

Filnavn kan ikke inneholde spesialtegn.

Krav til [Header]

Delen [Header] inneholder generell informasjon om kjøringen. Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [Header].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
FileFormatVersion	Ja	Prøvearkversjonen. Angi 2 som verdi.
RunName	Nei	Unikt kjøringsnavn etter ønske. RunName kan inneholde alfanumeriske tegn, understrekingstegn, tankestreker og punktum. Analyse mislykkes hvis RunName inneholder mellomrom eller spesialtegn.
RunDescription	Nei	Beskrivelse av kjøringen.
InstrumentPlatform	Nei	NextSeq 1000/2000
InstrumentType	Nei	NextSeq 1000/2000

Krav til [Reads]

Delen [Reads] beskriver antall sekvenseringssykluser som brukes til genomisk og indeksavlesning 1 og 2. Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [Reads].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
Read1Cycles	Ja	Antall sykluser i første avlesning. Verdien må være et heltall større enn null.
Read2Cycles	Nei	Antall sykluser i andre avlesning.
Index1Cycles	Nei	Antall sykluser i første indeksavlesning. Nødvendig ved sekvensering av mer enn én prøve. Maksimalt 10 sykluser.
Index2Cycles	Nei	Antall sykluser i andre indeksavlesning. Maksimalt 10 sykluser.

Krav til [Sequencing_Settings]

Bruk delen [Sequencing_Settings] til å angi hvilket bibliotekklargjøringssett du bruker.

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
LibraryPrepKits	Nei	<p>Bibliotekklargjøringssettet ditt. Det er kun tillatt med ett bibliotekklargjøringssett.</p> <p>I NextSeq 1000/2000-kontrollprogramvare v1.3 velges den nødvendige tilpassede oppskriften automatisk hvis Illumina Stranded Total RNA Prep med Ribo-Zero Plus-sett eller Illumina Stranded mRNA Prep-sett er angitt som bibliotekklargjøringssettet.</p> <p>Angi én av følgende verdier.</p> <ul style="list-style-type: none"> Illumina Stranded Total RNA Prep med Ribo-Zero Plus-sett – <code>ILMNStrandedTotalRNA</code> Illumina Stranded mRNA Prep-sett – <code>ILMNStrandedmRNA</code>

Krav til BCL Convert

Delene i BCL Convert gir informasjon om å konvertere dataene dine fra BCL til FASTQ. Alternativene for BCL Convert omfatter to atskilte deler: [BCLConvert_Settings] og [BCLConvert_Data]. Delene i BCL Convert krever informasjon om indeksadaptersekvenser. Informasjon om hvordan den kompatible adaptersekvensen for hver avlesning og indeks identifiseres, finnes i *Illumina-adaptersekvenser (dokumentnr. 1000000002694)*.

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [BCLConvert_Settings].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Versjonen av DRAGEN-programvaren som er installert på systemet. Bruk alle de tre heltallene som er inkludert i versjonsnavnet. For eksempel 3.5.7.
BarcodeMismatchesIndex1	Nei	Antall tillatte misforhold mellom den første indeksavlesningen og indekssekvensen. Verdier kan være enten 0, 1 eller 2. Standardverdien er 1.

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
BarcodeMismatchesIndex2	Nei	Antall tillatte misforhold mellom den andre indeksavlesningen og indeksssekvensen. Verdier kan være enten 0, 1 eller 2. Standardverdien er 1.
FastqCompressionFormat	Nei	Hvis du vil mate ut FASTQ-filer som en *.gz-fil, angir du <code>gzip</code> . Hvis du vil lagre FASTQ-filer som en *.ora-fil og bruke dem med DRAGEN Decompression, angir du <code>dragen</code> .
AdapterRead1	Nei	Sekvensen som skal tilpasses eller maskeres fra slutten av avlesning 1. Adaptersekvens for avlesning 1 som inneholder A, C, G eller T. AdapterRead1 tilpasser sykluser som standard.
AdapterRead2	Nei	Sekvensen som skal tilpasses eller maskeres fra slutten av avlesning 2. Adaptersekvens for avlesning 2 som inneholder A, C, G eller T. AdapterRead2 tilpasser sykluser som standard.
OverrideCycles	Nei	Streng som brukes til å spesifisere UMI-sykluser og dekke over sykluser i en avlesning. Følgende verdier er tillatt: <ul style="list-style-type: none"> • N – Angir sykluser som skal ignoreres. • Y – Angir sekvenseringssykluser. • I – Angir indekssykluser. • U – Angir UMI-sykluser som skal tilpasses. Hvert element er atskilt med semikolon. Følgende er eksempler på OverrideCycles-inndata. U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [BCLConvert_Data].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens ID. Prøve-ID-en kan inneholde opptil 20 alfanumeriske tegn, bindestreker og understrekningstegn. ID-en skiller mellom små og store bokstaver. Skill hver identifikator med en tankestrek eller et understrekningstegn. For eksempel Sample1-DQB1-022515.
Index	Nei	Indekssekvensen som er knyttet til prøven. Kun A, C, T, G er tillatt. Nødvendig ved sekvensering av mer enn én prøve.
Index2	Nei	Den andre indekssekvensen som er knyttet til prøven. Kun A, C, T og G er tillatt. Sørg for at adaptersekvensene for den andre indeksen (i5) er rettet fremover. DRAGEN bakoverkompletterer automatisk i5-indekser under sekundæranalyse.
Lane (Bane)	Nei	Strømningscellens bane. Baner er representert ved én heltallverdi.

Innstillinger for DRAGEN-prøveark

Denne delen beskriver prøvearkkravene for hvert DRAGEN-rør. Legg til innstillinger for DRAGEN-røret som den siste delen på prøvearket. Du kan kun bruke ett DRAGEN-rør.

Hvert DRAGEN-rør har egne deler for innstillinger og data.

Krav til DRAGEN Germline-rør

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [DragenGermline_Settings].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Versjonen av DRAGEN-programvaren som er installert på systemet. Bruk alle de tre heltallene som er inkludert i versjonsnavnet. For eksempel 3.5.7. Programvareversjonen må samsvare med versjonen som er angitt i delen BCLConvert_Settings.

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
ReferenceGenomeDir	Ja	Referansegenomnavnet. For eksempel hg19_alt_aware. Bruk navnet på referansegenomet som er plassert i <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Informasjon om hvordan du bruker et tilpasset referansegenom finnes under <i>Elektronisk apphjelp for referanseverktøy for Illumina-instrumenter v1.0.0</i> .
MapAlignOutFormat	Nei	Utdatafeltets formatering. Tillatte verdier er bam eller cram. Hvis ingen verdi angis, er standard none (ingen).
KeepFastq	Nei	Lagre FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>true</code> (sant). Fjern FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>false</code> (usant).

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [DragenGermline_Data].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens ID. Prøve-ID-en kan inneholde opptil 20 alfanumeriske tegn. ID-en skiller mellom små og store bokstaver. Skill hver identifikator med en bindestrek. For eksempel Sample1-DQB1-022515. Prøve-ID-er må samsvare med ID-ene som er angitt i delen BCLConvert_Data.

Krav til DRAGEN RNA-rør

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [DragenRNA_Settings].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Versjonen av DRAGEN-programvaren som er installert på systemet. Bruk alle de tre heltallene som er inkludert i versjonsnavnet. For eksempel 3.5.7. Programvareversjonen må samsvare med versjonen som er angitt i delen BCLConvert_Settings.

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
ReferenceGenomeDir	Ja	Referansegenomnavnet. For eksempel hg38_noalt_with_decoy. Bruk navnet på referansegenomet som er plassert i <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Informasjon om hvordan du bruker et tilpasset referansegenom finnes under <i>Elektronisk apphjelp for referanseverktøy for Illumina-instrumenter v1.0.0</i> .
RnaGeneAnnotationFile	Nei	Filen som inneholder RNA-genkommentarer. Det er kun tillatt med alfanumeriske tegn. Hvis det ikke finnes, brukes standard kommentarfil som er inkludert i det angitte referansegenomet.
MapAlignOutFormat	Nei	Utdatafeltets formatering. Tillatte verdier er bam eller cram. Hvis ingen verdi angis, er standard none (ingen).
KeepFastq	Nei	Lagre FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>true</code> (sant). Fjern FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>false</code> (usant).
DifferentialExpressionEnable	Nei	Aktiver differensiell genekspresjon ved å angi <code>true</code> (sant). Utelat differensiell genekspresjon fra analyse ved å angi <code>false</code> (usant).

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [DragenRna_Data].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens ID. Prøve-ID-en kan inneholde opptil 20 alfanumeriske tegn. ID-en skiller mellom små og store bokstaver. Skill hver identifikator med en bindestrek. For eksempel Sample1-DQB1-022515. Prøve-ID-er må samsvare med ID-ene som er angitt i delen BCLConvert_Data.
Comparison<N>	Nei	Verdien for kontroll eller sammenligning for hver prøve. Hvis det ikke er noen kontroll- eller sammenligningsverdi for prøven, tilordnes prøven <code>na</code> (ia). Alle prøver merket med kontroll sammenlignes med alle prøver merket med sammenligning. <code>N</code> -verdien gjenspeiler sammenligningsgruppen for prøvene.

Krav til DRAGEN Enrichment-rør

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [DragenEnrichment_Settings].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Versjonen av DRAGEN-programvaren som er installert på systemet. Bruk alle de tre heltallene som er inkludert i versjonsnavnet. For eksempel 3.5.7. Programvareversjonen må samsvare med versjonen som er angitt i delen BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Ja	Referansegenomnavnet. For eksempel hg38_alt_aware. Referansegenomer er plassert i /usr/local/illumina/genomes. Informasjon om hvordan du bruker et tilpasset referansegenom finnes under <i>Elektronisk apphjelp for referanseverktøy for Illumina-instrumenter v1.0.0</i> .
BedFile	Ja	bed-filen som inneholder regionene som skal målrettes.
GermlineOrSomatic	Ja	En kimbaneanalyse med anriking utføres ved å angi <code>germline</code> (kimbane). En somatisk analyse med anriking utføres ved å angi <code>somatic</code> (somatisk).
KeepFastq	Nei	Lagre FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>true</code> (sant). Fjern FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>false</code> (usant).
MapAlignOutFormat	Nei	Utdatafeltets formatering. Tillatte verdier er bam eller cram. Hvis ingen verdi angis, er standard none (ingen).
AuxNoiseBaselineFile	Nei	Navnet på støybaselinefilen. Du kan bruke filformatet *.txt eller *.gz. Støybaselinefiler er kun tilgjengelige når du bruker somatisk modus. Mer informasjon finnes under Importere støybaselinefiler på side 17 .

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [DragenEnrichment_Data].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens ID. Prøve-ID-en kan inneholde opptil 20 alfanumeriske tegn. ID-en skiller mellom små og store bokstaver. Skill hver identifikator med en bindestrek. For eksempel Sample1-DQB1-022515. Prøve-ID-er må samsvare med ID-ene som er angitt i delen BCLConvert_Data.

Krav til DRAGEN DNA Amplicon-rør

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [DragenAmplicon_Settings].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Versjonen av DRAGEN-programvaren som er installert på systemet. Bruk alle de tre heltallene som er inkludert i versjonsnavnet. For eksempel 3.5.7. Programvareversjonen må samsvare med versjonen som er angitt i delen BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Ja	Referansegenomnavnet. For eksempel hg38_alt_aware. Referansegenomer er plassert i /usr/local/illumina/genomes. Informasjon om hvordan du bruker et tilpasset referansegenom finnes under <i>Elektronisk apphjelp for referanseverktøy for Illumina-instrumenter v1.0.0</i> .
DnaBedFile	Ja	bed-filen som inneholder regionene som skal målrettes. bed-filen kan legges inn i filformatet *.txt eller *.gz.
DnaGermlineOrSomatic	Ja	En kimbaneanalyse med DNA-amplikon utføres ved å angi <code>germline</code> (kimbane). En somatisk analyse med DNA-amplikon utføres ved å angi <code>somatic</code> (somatisk).

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
KeepFastq	Nei	Lagre FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>true</code> (sant). Fjern FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>false</code> (usant).
MapAlignOutFormat	Nei	Utdatafeltets formatering. Tillatte verdier er bam eller cram. Hvis ingen verdi angis, er standard none (ingen).

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [DragenAmplicon_Data].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens ID. Prøve-ID-en kan inneholde opptil 20 alfanumeriske tegn. ID-en skiller mellom små og store bokstaver. Skill hver identifikator med en bindestrek. For eksempel Sample1-DQB1-022515. Prøve-ID-er må samsvare med ID-ene som er angitt i delen BCLConvert_Data.
DnaOrRna	Ja	Type ampliconanalyse som skal utføres. Kun DNA-analyse støttes for DRAGEN v3.8. Angi <code>dna</code> .

Krav til DRAGEN Single Cell RNA-rør

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [DragenSingleCellRNA_Settings]. Informasjon om kompatibilitet med sett fra tredjeparter finnes på støttesiden for produktkompatibilitet med DRAGEN Bio-IT-plattformen.

Single Cell Library Kit 1—5

Følgende prøvearkinnstillinger gjelder for bibliotekklargjøringssett med samme genetiske struktur som DRAGEN Single Cell Library Kits 1—5. Bruk støttesiden for produktkompatibilitet med DRAGEN Bio-IT-plattformen til å bekrefte den genetiske strukturen til settet ditt.

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Versjonen av DRAGEN-programvaren som er installert på systemet. Bruk alle de tre heltallene som er inkludert i versjonsnavnet. For eksempel 3.5.7. Programvareversjonen må samsvare med versjonen som er angitt i delen BCLConvert_Settings.

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
ReferenceGenomeDir	Ja	Referansegenomnavnet. For eksempel hg38_alt_aware. Referansegenomer er plassert i <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Informasjon om hvordan du bruker et tilpasset referansegenom finnes under <i>Elektronisk apphjelp for referanseverktøy for Illumina-instrumenter v1.0.0</i> .
RnaLibraryType	Nei	Angi én av følgende verdier: <ul style="list-style-type: none"> • SF – Strenget fremover. SF er standardverdien. • SR – Strenget bakover. • U – Uten streng.
RnaGeneAnnotationFile	Nei	Filen som inneholder RNA-genkommentarer. Det er kun tillatt med alfanumeriske tegn. Hvis det ikke finnes, brukes standard kommentarfil som er inkludert i det angitte referansegenomet.
BarcodeRead	Nei	Plasseringen til den avleste strekkoden i sekvenseringskjøringen, som inneholder både strekkoden og UMI. Verdier kan inneholde <code>Read1</code> eller <code>Read2</code> . Standardverdien er <code>Read1</code> .
BarcodePosition	Ja	Plasseringen til basene som tilsvarer strekkoden i verdien som er angitt for BarcodeRead. Basestillinger indekseres fra nullposisjonen. Angi BarcodePosition-verdien i følgende format: <code>0_<barcode end position></code> Hvis en strekkode for eksempel inneholder 16 baser, er verdien <code>0_15</code> .
UmiPosition	Ja	Plasseringen til basene som tilsvarer UMI i verdien som er angitt for BarcodeRead. Angi UMIPosition-verdien i følgende format: <code><UMI start position>_<UMI end position></code> Hvis for eksempel UMI inneholder 10 baser og strekkoden inneholder 16, er verdien <code>16_25</code> .

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
BarcodeSequenceWhitelist	Nei	Navnet på filen som inneholder strekkodesekvensene som skal inkluderes. Filnavnet kan kun inneholde alfanumeriske tegn, tankestreker, understrekingstegn og punktum.
KeepFastq	Nei	Lagre FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>true</code> (sant). Fjern FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>false</code> (usant).
MapAlignOutFormat	Nei	Utdatafeltets formatering. Tillatte verdier er <code>bam</code> eller <code>cram</code> . Hvis ingen verdi angis, er standard <code>none</code> (ingen).

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [DragenSingleCellRNA_Data].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens ID. Prøve-ID-en kan inneholde opptil 20 alfanumeriske tegn. ID-en skiller mellom små og store bokstaver. Skill hver identifikator med en bindestrek. For eksempel Sample1-DQB1-022515. Prøve-ID-er må samsvare med ID-ene som er angitt i delen BCLConvert_Data.

Single Cell Library Kit 6

Følgende prøvearkinnstillinger gjelder for bibliotekklargjøringssett med samme genetiske struktur som DRAGEN Single Cell Library Kits 6. Bruk støttesiden for produktkompatibilitet med DRAGEN Bio-IT-plattformen til å bekrefte den genetiske strukturen til settet ditt.

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
SoftwareVersion	Ja	Versjonen av DRAGEN-programvaren som er installert på systemet. Bruk alle de tre heltallene som er inkludert i versjonsnavnet. For eksempel 3.5.7. Programvareversjonen må samsvare med versjonen som er angitt i delen BCLConvert_Settings.

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
ReferenceGenomeDir	Ja	Referansegenomnavnet. For eksempel hg38_alt_aware. Referansegenomer er plassert i /usr/local/illumina/genomes. Informasjon om hvordan du bruker et tilpasset referansegenom finnes under <i>Elektronisk apphjelp for referanseverktøy for Illumina-instrumenter v1.0.0</i> .
RnaLibraryType	Nei	Angi én av følgende verdier: <ul style="list-style-type: none"> • SF – Strenget fremover. • SR – Strenget bakover. • U – Uten streng.
RnaGeneAnnotationFile	Nei	Filen som inneholder RNA-genkommentarer. Det er kun tillatt med alfanumeriske tegn. Hvis det ikke finnes, brukes standard kommentarfil som er inkludert i det angitte referansegenomet.
BarcodeRead	Nei	Plasseringen til den avleste strekkoden i sekvenseringskjøringen, som inneholder både strekkoden og UMI. Verdier kan inneholde Read1 eller Read2. Standardverdien er Read1.
BarcodePosition	Ja	Plasseringen til basene som tilsvare strekkodene i verdien som er angitt for BarcodeRead. Basestillinger indekseres fra nullposisjonen. Angi BarcodePosition-verdien i følgende format: 0_<first barcode end position>+<second barcode start position>_<second barcode end position>+<third barcode start position>_<third barcode end position> For eksempel vil følgende struktur gi verdien 0_8+21_29+43_51: <ul style="list-style-type: none"> • 9 baser i det første strekkoden (0_8). • 12 baser mellom første og andre strekkode. • 9 baser i den andre strekkoden (21_29). • 13 baser mellom andre og tredje strekkode. • 9 baser i den tredje strekkoden (43_51).

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
UmiPosition	Ja	Plasseringen til basene som tilsvarer UMI i angitt BarCodeRead. Angi strengen i følgende format: <UMI start position>_<UMI end position> Hvis for eksempel UMI inneholder 8 baser og antall baser før UMI er totalt 51, er verdien 52_59.
BarcodeSequenceWhitelist	Nei	Navnet på filen som inneholder strekkodesekvensen som skal hvitelistes. Filnavnet kan kun inneholde alfanumeriske tegn, tankestreker, understrekingstegn og punktum.
KeepFastq	Nei	Lagre FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>true</code> (sant). Fjern FASTQ-utdatafiler ved å angi <code>false</code> (usant).
MapAlignOutFormat	Nei	Utdatafeltets formatering. Tillatte verdier er <code>bam</code> eller <code>cram</code> . Hvis ingen verdi angis, er standard <code>none</code> (ingen).

Følgende er de tilgjengelige feltene og beskrivelsene for [DragenSingleCellRNA_Data].

Felt	Påkrevd	Beskrivelse
Sample_ID	Ja	Prøvens ID. Prøve-ID-en kan inneholde opptil 20 alfanumeriske tegn. ID-en skiller mellom små og store bokstaver. Skill hver identifikator med en bindestrek. For eksempel Sample1-DQB1-022515. Prøve-ID-er må samsvare med ID-ene som er angitt i delen BCLConvert_Data.

Mørk syklus-sekvensering

Denne delen beskriver hvordan mørk syklus-sekvensering brukes i oppskriften.

Mørk syklus-sekvensering brukes til å fullføre kun kjemitrinnene i en sekvenseringssyklus. Kontroller siden Kompatible produkter for bibliotekklargjøringssettet ditt på [Illuminas nettsted for kundestøtte](#) for å se om mørk syklus-sekvensering er nødvendig.

Bruk følgende trinn til mørk syklus-sekvensering.

Redigere oppskriftsfilen

1. Last ned XML-oppskriftsfilen fra [Illuminas nettsted for kundestøtte](#).
2. Rediger XML-oppskriftsfilen.
 - a. Identifiser den aktuelle protokoll delen basert på konfigurasjonen for avlesning og indekssekvensering. Det er seks forskjellige mulige protokoller per tilpasset oppskrift som kan redigeres.
For eksempel vil protokollen for en enkel Read 1 (Avlesning 1) uten konfigurasjon for indekssekvensering være `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
 - b. Før `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` og `<ReadRef ReadName="Read 2"/>` angir du følgende mørk syklus-trinn på en ny linje.
`<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />`.
 - c. Angi mørk syklus-trinnet på en ny linje for hver nødvendige mørk syklus.
3. Lagre XML-oppskriftsfilen.

Her følger en prøveoppskrift med mørk syklus:

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

Knytte oppskriften til kjøringen

- 1 I Run Setup (Kjøringsoppsett) i kontrollprogramvaren velger du **Choose** (Velg) under Custom Recipe (Tilpass oppskrift).
- 2 Naviger til den oppdaterte XML-oppskriftsfilen.
- 3 Velg **Open** (Åpne).
4. Gå tilbake til [Starte en sekvenseringskjøring på side 45](#).

Indeks

%

%PF 57

A

advarsler 6, 80

alkoholservietter 27

analyse

 fremgangsmåter 5, 8

automatiske oppdateringer 72

avbildning 53-54

avlesningslengder 30

avlesningssykluser 30

avslutte 80

B

baner 54

basebetegnelse 5

basebetegnelsesfiler 8, 53, 59

BaseSpace Sequence Hub 1

 dokumentasjon 12

 innstillinger 12

BCL-filer 6

bcl2fastq2 53

beregningsmotor 53

biblioteker.denaturere 8

bildeanalyse 5

bilder 53

blekemiddelservietter 27

C

CBCL-filer 58

CE 53

D

datakvalitet 57

datamaskinnavn 5

denaturere 8

diskplass 6, 72

dokumentasjon 104

domener 12

dryppbrett

 puter 27

dører

 lukke 50

E

ekstra sykluser 30

enkel avlesning 48

Enterprise-abonnement 12

Ethernet-kabel 4

Ethernet-port 4

F

fabrikkinstillinger 82-83

fasing og prefasing 56

FASTQ-konvertering 53

feil 6, 80

 meldinger 78

 sannsynlighet 58

feillogger 54

filterfiler 53, 59

filtreringsklynger 57

fliser 53

flytte 4

forbruksmateriell

 skanning 50

 spore 1

forbruksmateriellkammer 2

forsterkning 8

fortynne biblioteker 8

frysespesifikasjoner 27

førstegangs oppsett 76, 82-83

G

garanti 27

grønn kanal 56

H

harddisk 6, 72
hjelp 104
hvitebøker 58

I

ikoner 6
Illumina proaktiv støtte 13
indeks
 sykluser 30
ingen betegnelser 55-56
initialisering 81
 feil 80
innlastingsretning 50
installasjonsprogram for System Suite 72
installere programvare 72
instrumentytelsesdata 12
intensitetsverdier 55
internett-tilkobling 12
InterOp-filer 53, 59
IP-adresse 5

K

kallenavn 19
kameraer 54
kassett 50
katalognumre 26
kjøleskapsspesifikasjoner 27
kjøringer
 metrikk 53
kjøringsantall 5
kjøringsmappe 72
kjøringsoppsett
 eksempler 30
kjøringsparametere
 redigere 48
kjøringsstatus 6
kjøringsstørrelse 72
klyngeintensiteter 55
klyngeplasseringer 53, 59

kundestøtte 104
kvalitetstabeller 58

L

Local Run Manager 5
loggfiler 54
lokal analyse 1
luftfiltre
 ekstra 27
 plassering 76
lydinnstillinger 19
lyslinje 2

M

malgenerering 55
manuelle programvareoppdateringer 72
miniatyrbiler 59
mislykkede registreringer 55
monitor 2
mus 4

N

nanobrønner 55
navngi
 datamaskinnavn 5
navngiving
 instrumentnavn 19
navngivning
 instrumentnavn 19
nedgradere programvare 82-83
NextSeq 1000/2000-reagenser 26
nukleotider 56
nummerere fliser 55
nummerere overflater 55

O

operativsystem 81
oppskrifter 72
oppskriftsfragmenter 5

P

- paired-end 48
- passerende filter (PF) 57
- PhiX 27
 - innretting 53
- PhiX-kontroll v3 26
- Phred-algoritme 58
- privat domene 12
- programvare
 - installere 72
 - nedgradere 82-83
 - oppdateringsvarsler 20
- programvareserie 1, 5
- prosessbehandling 72
- puter 27
- på/av-knapp 2, 80

Q

- Q-scorer 58

R

- redigere kjøringsparametere 48
- renhetsfilter 57
- reservedeler 76
- resuspensjonsbuffer 26
- RSB-erstatning 26
- runder 54-55
- RunInfo.xml 59
- rød kanal 56

S

- Sequencing Analysis Viewer 53, 55
- serienummer 5
- serverplassering 12
- sett 26
 - katalognumre 27
- skybasert analyse 1
- slette kjøring 6, 72
- spesifikasjonsinnretting 80

- spore forbruksmateriell 1
- standard utdatamappe 48
- starte på nytt 82-83
- stasjon D 72
- statuslinje 2
- strømledning 4
- strømtilstandsending 78
- støttesider 72
- syklusantall 30
- systemkontroller 78

T

- tapte tilkoblinger 80
- tastaturer 4
- teknisk 104
- teknisk hjelp 104
- testsett 27
- tilordnede stasjoner 48
- tokanalssekvensering 56

U

- UNC-baner 48
- Universal Copy Service 5, 72
- USB-porter 4
- utdatamappe 48, 72
- utløpsdatoer 76

V

- varsler 72
- vekselstrøm
 - inntak 4
- vekslebryter 4, 80
- verts plassering 12
- vifter 76

W

- Windows
 - pålogging 81

Y

ytelsesdata 12

Teknisk hjelp

Kontakt teknisk støtte hos Illumina for teknisk hjelp.

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

Telefonnumre til Illuminas teknisk støtte

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

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

Sikkerhetsdatablad – Tilgjengelige på Illuminas nettsted på support.illumina.com/sds.html.

Produktdokumentasjon – Tilgjengelig for nedlasting fra support.illumina.com.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California, 92122 USA

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (utenfor Nord-Amerika)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Kun til forskningsbruk. Ikke for bruk ved diagnostiske prosedyrer.

© 2021 Illumina, Inc. Med enerett.

illumina®