

# NextSeq 1000 in 2000

Navodila za uporabo sistema za sekvenciranje

Ta dokument in vsebina v njem sta last družbe Illumina, Inc. in njenih podružnic («Illumina») ter sta namenjena le pogodbeno določeni uporabi njenih strank v povezavi z uporabo izdelkov, ki so opisani v tem dokumentu, in za noben drug namen. Tega dokumenta in vsebine v njem ne smete uporabljati ali distribuirati za kateri koli drug namen in/ali ju kakor koli drugače posredovati, razkriti ali razmnoževati brez predhodnega pisnega soglasja družbe Illumina. Illumina vam s tem dokumentom ne podeljuje nobene licence v okviru svojega patenta, blagovne znamke, avtorskih pravic ali pravic iz običajnega prava in nobenih podobnih pravic tretjih oseb.

Ustrezno kvalificirano in usposobljeno osebje mora natančno in dosledno upoštevati navodila v tem dokumentu, da zagotovi pravilno in varno uporabo izdelkov, opisanih v njem. Pred uporabo teh izdelkov morate v celoti prebrati vsebino tega dokumenta in se seznaniti z njo.

**ČE NE PREBERETE VSEH NAVODIL V TEM DOKUMENTU IN JIH NE UPOŠTEVATE DOSLEDNO, LAHKO POVZROČITE OKVARO IZDELKOV, TELESNE POŠKODBE OSEB, VKLJUČNO Z UPORABNIKI IN DRUGIMI OSEBAMI, TER POŠKODBE DRUGE LASTNINE IN RAZVELJAVITE KAKRŠNO KOLI JAMSTVO, KI VELJA ZA IZDELKE.**

ILLUMINA NE PREVZEMA NOBENE ODGOVORNOSTI ZA NEPRAVILNO UPORABO IZDELKOV, OPISANIH V TEM DOKUMENTU (VKLJUČNO Z NJIHOVIMI DELI IN PROGRAMSKO OPREMO).

© 2021 Illumina, Inc. Vse pravice pridržane.

Vse blagovne znamke so last družbe Illumina, Inc. ali njihovih ustreznih lastnikov. Informacije o določenih blagovnih znamkah najdete na spletnem mestu [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

# Zgodovina revizij

Dokument št.	Datum	Opis spremembe
1000000109376 v04	April 2021	Dodana navodila za uvažanje datotek Baseline. Dodan potek dela DRAGEN DNA Amplicon. Dodane funkcije za programsko opremo NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3. Dodane informacije za izbrani strežnik proxy. Posodobljena temperatura za shranjevanje in pošiljanje za RSB s snovjo Tween 20. Posodobljen potek dela DRAGEN RNA, tako da vključuje diferencialno izražanje genov. Posodobljena struktura mape z odčitki sekvenciranja. Posodobljena priporočila glede oblike zapisa vzorčnega lista v2.
1000000109376 v03	November 2020	Popravljene kataloške številke. Dodane informacije o dodajanju novih uporabnikov.

Dokument št.	Datum	Opis spremembe
1000000109376 v02	Oktober 2020	<p>Dodan komplet reagentov NextSeq 1000/2000 P3.</p> <p>Dodan potek dela DRAGEN Single Cell RNA.</p> <p>Dodan potek dela DRAGEN Enrichment.</p> <p>Dodane možnosti za stiskanje datoteke FASTQ.</p> <p>Dodana navodila za namestitev cevovoda DRAGEN in posodobitev licence.</p> <p>Dodana navodila za uvoz vzorčnih genomov po meri.</p> <p>Posodobljena volumen in koncentracija ob vstavljanju za vrste knjižnice.</p> <p>Posodobljena navodila za redčenje knjižnice.</p> <p>Dodana navodila za samodejno čiščenje kartuše z reagentom.</p> <p>Posodobljene informacije o številu podprtih ciklov.</p> <p>Posodobljene možnosti prilagoditve instrumenta.</p> <p>Posodobljena navodila za funkcijo Instrument Run Setup.</p> <p>Posodobljena struktura mape z odčitki sekvenciranja v aplikaciji DRAGEN.</p> <p>Dodane informacije o poročilih DRAGEN QC.</p> <p>Dodane informacije o odstranjevanju vzorčnih genomov po meri s trdega diska.</p> <p>Dodane informacije o izvajanju preverjanj sistema.</p> <p>Posodobljene nastavitve za vzorčni list v2.</p>

Dokument št.	Datum	Opis spremembe
1000000109376 v01	Junij 2020	<p>Posodobljeni opisi za programsko opremo za nadzor NextSeq 1000/2000.</p> <p>Pojasnjena razlika med načinom v oblaku ter hibridnim, lokalnim in samostojnim načinom v celotnem dokumentu.</p> <p>Posodobljena navodila za shranjevanje in odmrzovanje kartuše.</p> <p>Posodobljene informacije o podprtem številu ciklov.</p> <p>Posodobljena navodila za nastavitve sekundarne analize.</p> <p>Posodobljene kataloške številke kompleta reagentov.</p> <p>Posodobljen diagram protokola sekvenciranja.</p> <p>Posodobljena navodila za določitev omrežnega pogona kot privzete mape z odčitki.</p> <p>Posodobljena tabela podprtih vrst knjižnic.</p> <p>Dodana navodila za uvoz vzorčnega genoma po meri.</p> <p>Dodana navodila za nastavitve izvedbe sekvenciranja z uporabo prilagojenega kompleta za indeksiranje in prilagojenega kompleta za pripravo knjižnic.</p> <p>Posodobljene zahteve za uporabniški račun in geslo.</p> <p>Dodane podrobnosti o strukturi mape z odčitki v aplikaciji DRAGEN.</p> <p>Pojasnjena navodila za odstranjevanje uporabljenih reagentov iz kartuše.</p> <p>Dodajanje podatkov v ozadju v tabelo kakovosti.</p> <p>Posodobljena navodila za namestitev posodobitev programske opreme za nadzor.</p> <p>Dodana navodila za premik izvedbe sekvenciranja v čakalno vrsto.</p> <p>Dodana navodila za posodobitev cevovodov in licenc za aplikacijo DRAGEN.</p> <p>Dodana navodila za prilagoditev instrumenta.</p> <p>Posodobljena navodila glede novih oznak.</p> <p>Vrata so bila preimenovana v vizir v celotnem priročniku.</p> <p>Dodan opis za dvoje ethernetnih vrat.</p>

<b>Dokument št.</b>	<b>Datum</b>	<b>Opis spremembe</b>
1000000109376 v00	Marec 2020	Prva izdaja.

# Kazalo

Pregled sistema .....	1
Dodatni viri .....	2
Strojna oprema instrumenta .....	3
Integrirana programska oprema .....	5
Upravljanje postopka .....	6
Diagram protokola sekvenciranja .....	8
Delovanje sekvenciranja .....	8
Konfiguracija sistema .....	11
Zahteve za uporabniški račun .....	11
Konfiguracija središča BaseSpace Sequence Hub in storitve Proactive Support .....	13
Določanje mesta privzete mape z odčitki .....	15
Uvoz vzorčnih genomov po meri .....	18
Uvoz datotek Noise Baseline .....	18
Konfiguracija načina izvedbe .....	20
Prilagoditev instrumenta .....	21
Potrošni material in oprema .....	23
Potrošni material za sekvenciranje .....	23
Pomožen potrošni material .....	27
Pomožna oprema .....	28
Protokol .....	30
Dejavniki sekvenciranja .....	30
Načrtovanje izvedbe sekvenciranja v središču BaseSpace Sequence Hub .....	31
Odmrzovanje kartuše v vrečki in pretočne celice .....	39
Redčenje knjižnic .....	42
Vstavljanje potrošnega materiala v kartušo .....	44
Začetek izvedbe sekvenciranja .....	46
Odčitek sekvenciranja .....	54
Pregled analize v realnem času .....	54
Potek analize v realnem času .....	56
Sekvenciranje datotek z odčitki .....	60
Datoteke z odčitki sekundarne analize v aplikaciji DRAGEN .....	61
Struktura mape z odčitki sekundarne analize v aplikaciji DRAGEN .....	70
Vzdrževanje .....	74
Čiščenje prostora na trdem disku .....	74
Posodobitve programske opreme .....	74
Potek dela v aplikaciji DRAGEN in posodobitve licence .....	76

Zamenjava zračnega filtra .....	78
Odpravljanje težav .....	80
Odpravljanje sporočil o napakah .....	80
Ponovno shranjevanje potrošnega materiala .....	81
Preklic izvedbe sekvenciranja .....	81
Ponovni premik izvedbe sekvenciranja v čakalno vrsto .....	82
Ponovni zagon instrumenta .....	82
Preverjanje sistema .....	83
Povrnitev na tovarniške nastavitve .....	84
Zajem nameščene slike .....	84
Obnovitev zajete slike .....	85
Viri in reference .....	86
Nastavitve za vzorčni list v2 .....	86
Sekvenciranje temnega cikla .....	99
Kazalo .....	102
<b>Tehnična pomoč .....</b>	<b>106</b>



# Pregled sistema

Sistema za sekvenciranje Illumina® NextSeq™ 1000 in Illumina® NextSeq™ 2000 ponujata usmerjen pristop k sekvenciranju naslednje generacije (NGS)<sup>1</sup>. Ta sistem, ki temelji na aplikacijah, ponuja tehnologijo sekvenciranja družbe Illumina v obliki namiznega instrumenta, ki je stroškovno učinkovit in zagotavlja te funkcije:

- **Dostopnost in zanesljivost** – sistem NextSeq 1000/2000 vključuje možnost analize v aplikaciji DRAGEN ter denaturiranja in redčenja v instrumentu. Slikovni modul je vgrajen v sistem in sestavni deli s tekočinskimi elementi so del potrošnega materiala, zato je vzdrževanje instrumenta enostavnejše.
- **Vstavljanje potrošnega materiala v enem koraku** – vsi reagenti, ki jih potrebujete za izvedbo sekvenciranja, so vnaprej vstavljeni v kartušo za enkratno uporabo. Knjižnica in pretočna celica sta vstavljeni neposredno v kartušo, ki jo nato vstavite v instrument. Integrirana identifikacija omogoča natančno spremljanje.
- **Programska oprema sistema NextSeq 1000/2000** – zbirka integrirane programske opreme omogoča nadzor postopkov v instrumentu, obdelavo slik in ustvarjanje dodeljevanja baz.
  - **Način v oblaku** – omogoča načrtovanje izvedbe sekvenciranja s funkcijo Instrument Run Setup v središču BaseSpace Sequence Hub. Izbrani potek dela analize je samodejno zagnan v oblaku. Podatki o izvedbi in rezultati analize so na voljo v oblaku.
  - **Hibridni način** – omogoča načrtovanje izvedbe sekvenciranja s funkcijo Instrument Run Setup v središču BaseSpace Sequence Hub. Izbrani potek dela analize je zagnan v aplikaciji DRAGEN v instrumentu.
  - **Lokalni način** – omogoča načrtovanje lokalne izvedbe sekvenciranja z vzorčnim listom oblike zapisa datoteke v2. Izbrani potek dela analize je samodejno zagnan v aplikaciji DRAGEN v instrumentu.
  - **Samostojni način** – omogoča načrtovanje izvedbe sekvenciranja brez vzorčnega lista.

V tem poglavju je na voljo pregled sistema, vključno z informacijami o strojni in opremi ter analizi podatkov. Predstavljeni so tudi glavni sestavni deli in terminologija, uporabljena v tem dokumentu. Podrobne specifikacije, podatkovne liste, aplikacije in povezane izdelke najdete na [strani s sistemoma za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000](#) na spletnem mestu družbe Illumina.

---

<sup>1</sup>sekvenciranje naslednje generacije

## Dodatni viri

Na spletnem mestu družbe Illumina so na [straneh s podporo za sistema za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000](#) na voljo dodatni viri sistema. Viri vključujejo programsko opremo, usposabljanje, združljive izdelke in to dokumentacijo. Na straneh s podporo lahko vedno najdete najnovejše različice.

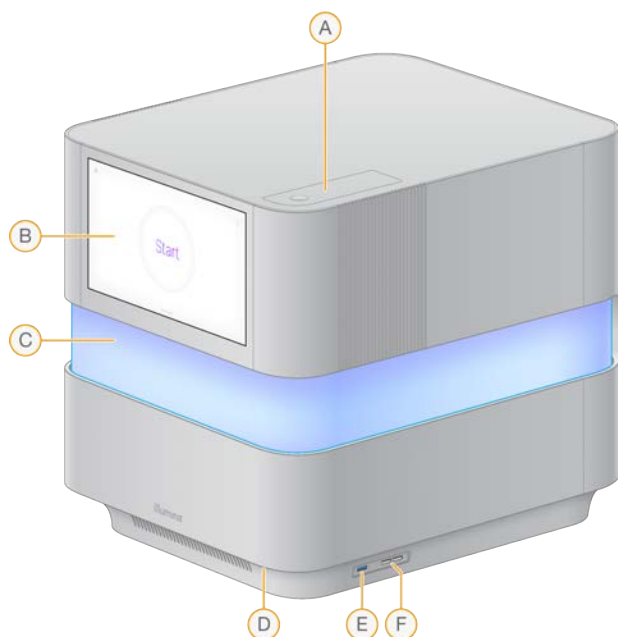
Vir	Opis
<a href="#">Izbirnik protokola po meri</a>	Orodje za ustvarjanje povezanih navodil, prilagojenih vaši metodi priprave knjižnice, parametrom izvajanja in metodi analize z možnostmi izboljšanja ravni podrobnosti.
<i>Navodila za zagotavljanje varnosti in skladnosti s predpisi za sistema za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000 (dokument št. 1000000111928)</i>	Vključuje informacije o zahtevah za varno uporabo, izjave o skladnosti s predpisi in označevanju instrumenta.
<i>Navodila za zagotavljanje skladnosti s predpisi za modul bralnika RFID (dokument št. 1000000002699)</i>	Vključuje informacije o bralniku RFID v instrumentu, potrdila o zagotavljanju skladnosti s predpisi in varnostne zahteve.
<i>Navodila za denaturiranje in redčenje knjižnic za sistema NextSeq 1000 in 2000 (dokument št. 1000000139235)</i>	Vključuje navodila za ročno denaturiranje in redčenje pripravljenih knjižnic za izvedbo sekvenciranja ter pripravo izbirnega kontrolnika PhiX.
<i>Navodila za uporabo prilagojenih začetnikov za sistema za sekvenciranje NextSeq 1000 in 2000 (dokument št. 1000000139569)</i>	Vključuje informacije o zamenjavi začetnikov za sekvenciranje družbe Illumina s prilagojenimi začetniki za sekvenciranje.
<i>Navodila za pripravo mesta za uporabo sistema za sekvenciranje NextSeq 2000 (dokument št. 1000000109378)</i>	Vključuje specifikacije za laboratorijski prostor, zahteve, povezane z elektriko, in dejavnike varstva okolja ter omrežja.
<i>Pomoč za BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Vključuje informacije o uporabi središča BaseSpace™ Sequence Hub in razpoložljivih možnostih analize.
<i>Navodila za združevanje – vmesniki indeksiranja (dokument št. 1000000041074)</i>	Vključuje navodila za združevanje in strategije dvojnega indeksiranja.

Vir	Opis
<i>Sekvence vmesnika družbe Illumina (dokument št. 1000000002694)</i>	Vključuje seznam sekvenc vmesnika za komplete za pripravo knjižnic družbe Illumina.

## Strojna oprema instrumenta

Sistema za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000 sestavljajo gumb za vklop/izklop, monitor, vrstica stanja, predal za potrošni material in vrata USB.

Slika 1 Zunanji sestavni deli sistema



- A. **Prostor za zračni filter** – zagotavlja dostop do zamenljivega zračnega filtra.
- B. **Monitor na dotik** – omogoča konfiguracijo v instrumentu in nastavitve z uporabo vmesnika programske opreme za nadzor.
- C. **Vrstica stanja** – prikaz napredovanja sistema skozi potek dela z barvno svetlobo. Modra in vijolična označujeta interaktivnost (npr. preverjanja pred izvedbo sekvenciranja), večbarvna osvetlitev pa označuje pomembna dejanja in podatke (npr. dokončanje sekvenciranja). Kritične napake so označene z rdečo osvetlitvijo.
- D. **Gumb za vklop/izklop** – nadzira napajanje instrumenta in označuje, ali je sistem vklopljen (sveti), izklopljen (zatemnjen) ali izklopljen, vendar priključen na električno vtičnico (utripa).
- E. **Vrata USB 3.0** – priključitev zunanjega prenosnega pogona za prenos podatkov.
- F. **Vrata USB 2.0** – priključitev miške in tipkovnice.

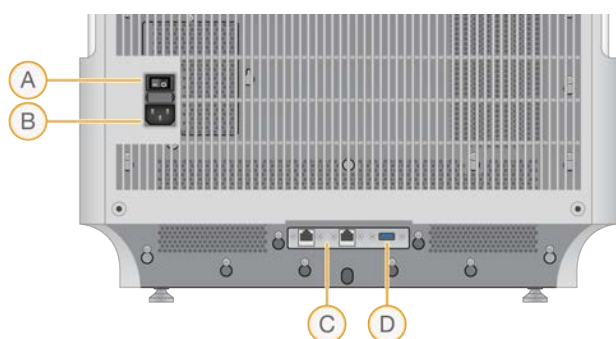
## Stikalo za vklop in ostali priključki

Če želite dostopati do stikala za napajanje, vrat USB in drugih priključkov na zadnji strani instrumenta, lahko previdno premaknete instrument.

Na zadnji strani instrumenta sta stikalo in vtičnica, s katerima vklopite ali izklopite instrument, ter dvoje ethernetnih vrat za izbirno ethernetno povezavo. Vrata USB 3.0 zagotavljajo možnost priključitve zunanega prenosnega pogona za prenos podatkov (exFAT ni podprt v tej platformi s sistemom Linux).

Sistema za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000 sta opremljena z dvojimi ethernetnimi vrati za večjo združljivost in prilagodljivost sistema. Ena ethernetna vrata lahko na primer uporabite za komunikacijo z notranjim omrežnim pogonom, druga pa za zunanjo komunikacijo s središčem BaseSpace Sequence Hub ali storitvijo Proactive Support.

Slika 2 Zadnja stran instrumenta

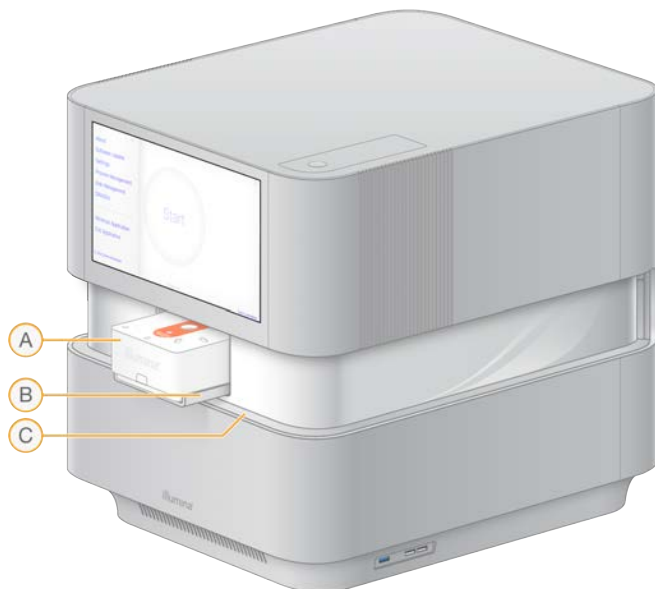


- A. **Preklopno stikalo** – z njim vklopite ali izklopite instrument.
- B. **Električna vtičnica** – povezava prek napajalnega kabla.
- C. **Ethernetna vrata (2)** – izbirna povezava prek ethernetnega kabla.
- D. **Vrata USB 3.0** – priključitev zunanega trdega diska za prenos podatkov.

## Predal za potrošni material

Predal za potrošni material vsebuje kartušo, vključno s pretočno celico in razredčeno knjižnico, za izvedbo sekvenciranja.

Slika 3 Predal z vstavljenim potrošnim materialom



- A. **Kartuša** – vsebuje pretočno celico, knjižnico in reagente. Med izvedbo zbira uporabljene reagente.
- B. **Pladenj** – med sekvenciranjem je vanj vstavljena kartuša.
- C. **Vizir** – omogoča odpiranje za dostop do predala za potrošni material.

## Integrirana programska oprema

V zbirki programske opreme sistema so integrirane aplikacije, ki izvajajo sekvenciranja in analizo.

- **NextSeq 1000/2000 Control Software** – Nadzoruje delovanje instrumenta in ponuja vmesnik za konfiguracijo sistema, nastavljanje izvedbe sekvenciranja in nadzorovanje statistike med sekvenciranjem.
- **Real-Time Analysis (RTA3)** – Izvaja analizo slike in dodelitev baze med izvedbo sekvenciranja. Za več informacij glejte razdelek [Odčitek sekvenciranja na strani 54](#).
- **Universal Copy Service** – Kopira datoteke z odčitki sekvenciranja iz mape izvedbe v središče BaseSpace Sequence Hub (po potrebi) in mapo z odčitki, kjer si jih lahko ogledate.

Programska oprema za nadzor je interaktivna in izvaja avtomatizirane postopke v ozadju. Real-Time Analysis in Universal Copy Service izvajata le postopke v ozadju.

## Informacije o sistemu

Izberite meni programske opreme za nadzor v zgornjem levem kotu , da odprete razdelek »About« (Vizitka). V razdelku »About« (Vizitka) so navedeni podatki za stik z družbo Illumina in te informacije o sistemu:

- serijska številka instrumenta
- ime računalnika
- različica zbirke sistema
- različica operacijskega sistema za zajem slik
- skupno število izvedb

## Obvestila in opozorila

Ikona obvestila se nahaja v zgornjem desnem kotu. Ko se sproži opozorilo ali je zaznana napaka, se prikaže desno podokno z obvestili. Ikono lahko kadar koli izberete, da si ogledate trenutna in pretekla obvestila za opozorila in napake.

- Opozorila morate prebrati, vendar se zaradi njih ne ustavi sekvenciranje in vam ni treba ukrepati.
- Če pride do napake, morate izvesti določena dejanja, preden lahko začnete ali nadaljujete sekvenciranje.

## Minimiranje programske opreme za nadzor

Minimirajte programsko opremo za nadzor, da lahko dostopate do drugih aplikacij. Če želite na primer poiskati mapo z odčitki v Raziskovalcu ali najti vzorčni list.

1. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Minimize Application** (Minimiraj aplikacijo). Programska oprema za nadzor se minimizira.
2. Če želite maksimirati programsko opremo za nadzor, izberite **NextSeq 1000/2000 Control Software** (Programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000) v orodni vrstici.

## Upravljanje postopka

Na zaslonu za upravljanje postopka so prikazane začasne izvedbe sekvenciranja, ki so shranjene na poti `/usr/local/illumina/runs`. Vsaka izvedba ima določen datum, ime in ID izvedbe. Za posamezno poizvedbo so prikazane tudi informacije, kot so stanje izvedbe, sekundarna analiza, mapa z odčitki in način v oblaku. Izberite izvedbo, da si ogledate dodatne informacije, vključno s potekom dela, povprečnim odstotkom Q30, uspešno filtriranimi skupnimi odčitavanji in skupnim donosom. Če želite izbrisati izvedbe sekvenciranja in počistiti prostor, preberite razdelek [Čiščenje prostora na trdem disku na strani 74](#). Če želite analizo v instrumentu znova premakniti v čakalno vrsto, glejte razdelek [Ponovni premik izvedbe sekvenciranja v čakalno vrsto na strani 82](#).

## Stanje izvedbe sekvenciranja

V tem razdelku so opisana stanja izvedbe sekvenciranja:

- **In Progress** (V teku) – izvedba sekvenciranja je v teku.
- **Complete** (Dokončano) – izvedba sekvenciranja je dokončana.
- **Stopped** (Ustavljeno) – izvedba sekvenciranja je bila ustavljena.
- **Errored** (Napaka) – pri izvedbi sekvenciranja je prišlo do napake.

## Stanje sekundarne analize

V tem razdelku so opisana stanja sekundarne analize v aplikaciji DRAGEN v instrumentu. Če se analiza izvaja v središču BaseSpace Sequence Hub, je tukaj prikazano stanje »N/A« (Ni na voljo).

- **Not Started** (Se ni začelo) – analiza v aplikaciji DRAGEN se še ni začela.
- **In Progress** (V teku) – analiza v aplikaciji DRAGEN je v teku.
- **Stopped** (Ustavljeno) – analiza v aplikaciji DRAGEN je bila ustavljena.
- **Errored** (Napaka) – pri analizi v aplikaciji DRAGEN je prišlo do napake.
- **Complete** (Dokončano) – analiza v aplikaciji DRAGEN je dokončana.

## Stanje mape z odčitki

V tem razdelku so opisana stanja datotek, ki so kopirane v mapo z odčitki:

- **In Progress** (V teku) – datoteke so kopirane v mapo z odčitki.
- **Complete** (Dokončano) – datoteke so bile uspešno kopirane v mapo z odčitki.

## Stanje načina v oblaku (BaseSpace Sequence Hub)

V tem razdelku so opisana stanja datotek, ki so naložena v BaseSpace Sequence Hub prek načina v oblaku:

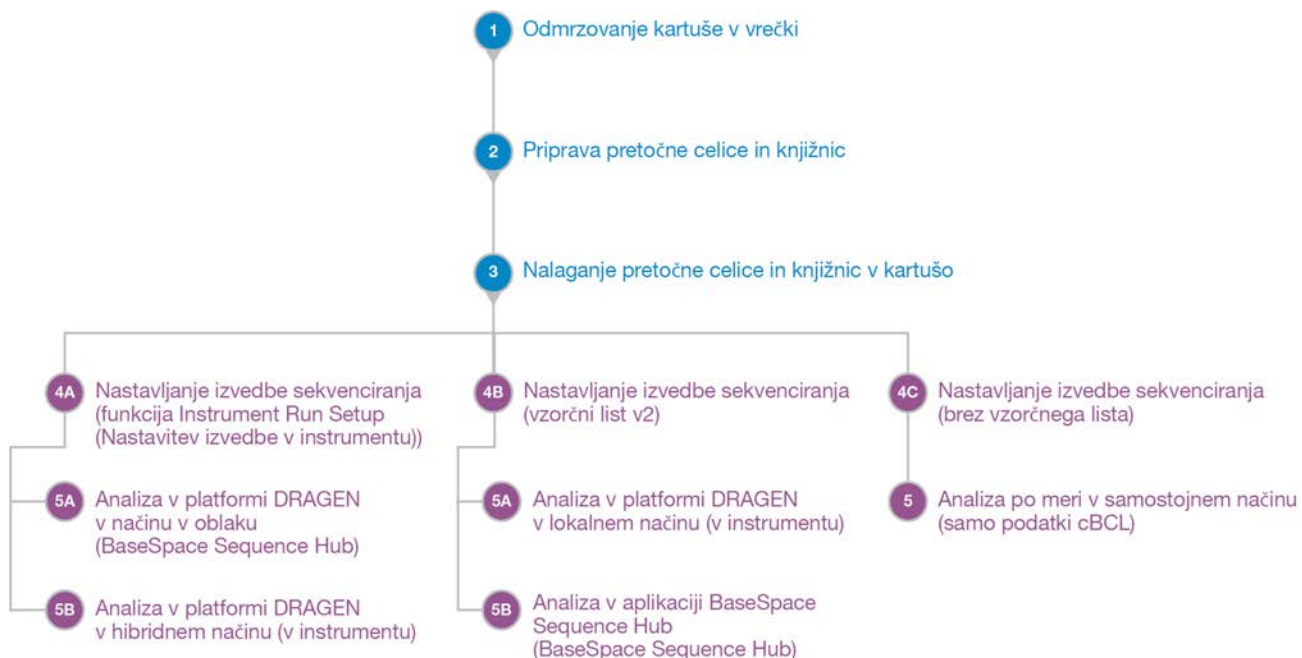
- **In Progress** (V teku) – programska oprema za nadzor prenaša datoteke v BaseSpace Sequence Hub.
- **Complete** (Dokončano) – vse datoteke so uspešno prenesene v BaseSpace Sequence Hub.

## Odpravljanje težav s stanjem

- Če trenutno poteka sekvenciranje, zaprite okno »Process Management« (Upravljanje postopka), počakajte približno pet minut in ga znova odprite.
- Če ne poteka sekvenciranje, znova zaženite instrument in nato znova odprite okno »Process Management« (Upravljanje postopka). Glejte razdelek [Ponovni zagon instrumenta na strani 82](#).

## Diagram protokola sekvenciranja

V spodnjem diagramu je prikazan protokol sekvenciranja s sistemom NextSeq 1000/2000.



## Delovanje sekvenciranja

Sekvenciranje v sistemih za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000 vključuje generiranje gruče, sekvenciranje in analizo. Vsak korak se samodejno izvede med postopkom sekvenciranja. Ko je postopek sekvenciranja dokončan, se lahko izvede dodatna analiza izven instrumenta, odvisno od konfiguracije sistema.

### Generiranje gruče

Knjižnica<sup>1</sup> se samodejno denaturira v posamezne verige, redčenje pa se nadaljuje v instrumentu. Med generiranjem gruče se posamezne molekule DNK vežejo na površino pretočne celice in s pomnožitvijo ustvarijo gruče<sup>2</sup>. Generiranje gruč traja pribl. 4 ure.

<sup>1</sup>Vzorec DNA ali RNA, ki ima priložene vmesnike za sekvenciranje. Načini priprave se razlikujejo.

<sup>2</sup>Klonska skupina verig DNK na pretočni celici, ki ustvari eno odčitavanje v okviru sekvenciranja. Vsaka veriga DNK na pretočni celici ustvari predlogo, ki je pomnožena, dokler gruča ne vsebuje več sto ali več tisoč kopij. Pretočna celica z 10.000 gručami na primer ustvari 10.000 primerkov enega odčitavanja ali 20.000 odčitavanj v parih.



## Sekvenciranje

Slika gruč je zajeta s kemično mešanico v dveh kanalih (zeleni kanal in modri kanal) za kodiranje podatkov za štiri nukleotide. Ko je ustvarjena slika ene ploščice na pretočni celici, je zajeta slika druge ploščice. Postopek se ponovi za vsak cikel sekvenciranja (pribl. 5 minut na cikel). Po analizi slike programska oprema Real-Time Analysis (analiza v realnem času) izvede dodelitev baze<sup>1</sup>, filtriranje in oceno kakovosti.<sup>2</sup>

## Primarna analiza

Med napredovanjem izvajanja programska oprema za nadzor samodejno prenese datoteke za dodelitev baze<sup>3</sup> (\*.cbcl) v določeno mapo z odčitki za analizo podatkov. Med postopkom sekvenciranja programska oprema za analizo v realnem času (RTA3) izvede analizo slik, dodelitev baze in demultipleksiranje<sup>4</sup>. Ko je sekvenciranje dokončano, se začne sekundarna analiza. Metoda sekundarne analize podatkov je odvisna od konfiguracije aplikacije in sistema.

## Sekundarna analiza

Središče BaseSpace Sequence Hub je računalniško okolje v oblaku družbe Illumina za spremljanje izvedb sekvenciranja, analizo podatkov, shranjevanje in sodelovanje. V njem gostujeta aplikaciji DRAGEN in BaseSpace Sequence Hub, ki podpirata običajne metode analize za sekvenciranje.

Po dokončanju začetne analize sekvenciranja aplikacija DRAGEN izvede sekundarno analizo z enim od razpoložljivih cevovodov analize.

Če uporabljate način v oblaku ali hibridni način, DRAGEN pridobi vzorčni list, vzorčni genom in vhodne datoteke izvedbe funkcije Instrument Run Setup (Nastavitev izvedbe v instrumentu) v središču BaseSpace Sequence Hub. V načinu v oblaku so podatki cBCL samodejno naloženi v BaseSpace Sequence Hub in BaseSpace Sequence Hub zažene sekundarno analizo v aplikaciji DRAGEN. V hibridnem načinu je sekundarna analiza v aplikaciji DRAGEN izvedena v instrumentu in datoteke z odčitki lahko shranite v izbrano mapo ali oblak.

Če uporabljate lokalni način, aplikacija DRAGEN pridobi ustrezni vzorčni list, vzorčni genom ter vhodne datoteke izvedbe sistemov za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000. Sekundarna analiza v aplikaciji DRAGEN je izvedena v instrumentu in datoteke z odčitki so shranjene v izbrani mapi z odčitki. Če izberete možnost »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe), lahko analizo zaženete tudi v aplikaciji BaseSpace Sequence Hub po dokončanju sekvenciranja.

---

<sup>1</sup>Določanje baze (A, C, G ali T) za vsako gručo na ploščici pri določenem ciklu.

<sup>2</sup>Izračunan je nabor napovedi kakovosti za vsako dodelitev baze, vrednost napovedi pa je nato uporabljena za iskanje ocene kakovosti (Q-score).

<sup>3</sup>Vsebuje dodelitev baze in povezano oceno kakovosti za posamezne gruče posameznih ciklov sekvenciranja.

<sup>4</sup>Postopek analize, ki razlikuje odčitavanja za posamezne knjižnice v združevanju.

Če uporabite samostojni način, nastavite izvedbo brez vzorčnega lista. Ta potek dela je priporočen za poteke dela analize po meri, ki se začnejo s podatki cBCL.

- Za več informacij o središču BaseSpace Sequence Hub glejte [spletno pomoč za BaseSpace Sequence Hub](#).
- Za več informacij o aplikaciji DRAGEN glejte [stran s podporo za platformo DRAGEN Bio-IT](#).
- Za pregled vseh aplikacij glejte [aplikacije BaseSpace](#).

# Konfiguracija sistema

V tem poglavju so na voljo navodila za nastavitve sistema, vključno z opisi nastavitve programske opreme.

V teh navodilih je opisana predvsem programska oprema za nadzor, na voljo pa so tudi nekatere informacije o konfiguraciji omrežja in operacijskega sistema.

**i** Če v instrumentu uporabljate brskalnik Google Chrome, ste pozvani k odklepanju obročka za ključke za prijavo. Poziv lahko varno prezrete in ga prekličete.

## Zahteve za uporabniški račun

Za operacijski sistem Linux so na voljo trije računi:

- root (nadskrbnik)
- ilmnadmin (skrbnik)
- ilmnuser (uporabnik)

Skrbniški račun je namenjen samo za uporabo sistemskih posodobitev, kot je posodobitev programske opreme za nadzor NextSeq 1000/2000, ali za uporabo s strani strokovnjakov za IT za izvajanje trajnega vpetja omrežnega pogona.

Vse ostale funkcije, vključno s sekvenciranjem, izvajajte v uporabniškem računu.

### Zahteve za gesla

Terenski inženir zažene postopek spreminjanja gesla za vse tri račune po dokončanju namestitve instrumenta. Vsako geslo posodobite vsakih 180 dni, ko vas sistem pozove.

Tabela 1 Privzeti pravilniki za gesla

Pravilnik	Nastavitev
»Enforce password history« (Uporabi zgodovino gesel)	Zapomni si pet gesel
»Lockout threshold« (Omejitev za zaklep)	Deset nepravilnih poskusov prijave
»Minimum password length« (Najmanjša dolžina gesla)	Deset znakov
»Minimum character variety« (Najmanjša raznolikost znakov)	Trije znaki teh posameznih elementov: številka, velika črka, mala črka in simbol

Pravilnik	Nastavitev
»Maximum repeating characters« (Največ ponavljajočih se znakov)	Trije znaki
»Password must meet complexity requirements« (Gesla morajo biti skladna z zahtevami za zapletenost)	Onemogočeno
»Store passwords using reversible encryption« (Shranjevanje gesel z obratnim šifriranjem)	Onemogočeno

## Dodajanje novega uporabnika

- Prijavite se v ilmnadmin.
- Izberite gumb za vklop/izklop in odprite spustni seznam za ilmnadmin.
- Izberite **Account Settings** (Nastavitve računa).
- Izberite **Unlock** (Odkleni) in vnesite geslo za ilmnadmin.
- Izberite **Add User** (Dodaj uporabnika).
- Izberite standardno vrsto računa in vnesite novo uporabniško ime.
- Izberite **Set password now** (Nastavi novo geslo zdaj) in vnesite geslo.
- Izberite **Add** (Dodaj).  
Nov uporabnik je dodan na seznam uporabnikov.
- Uporabniku omogočite dostop do programske opreme za nadzor NextSeq 1000/2000 tako, da izvedete spodnje korake.
  - Odprite terminal.
  - Vnesite to:  

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <new user name>
```
  - Če ste pozvani, vnesite geslo za ilmnadmin.
- Če želite potrditi uspešno nastavitev uporabniških dovoljenj, izvedite spodnje korake.
  - Prijavite se v nov uporabniški račun.
  - Pomaknite se do programske opreme za nadzor NextSeq 1000/2000.
  - V meniju programske opreme za nadzor izberite **Settings** (Nastavitve).
  - V privzeti mapi z odčitki se prepričajte, da lahko izberete in shranite pot mape z odčitki.  
Če lahko izberete in shranite pot mape z odčitki brez kakršnih koli napak, so dovoljenja uspešno nastavljena.

## Ponastavitev gesla

V tem razdelku je opisano, kako lahko ponastavite geslo za račune `ilmnuser`, `ilmnadmin` ali `root`. Obnovitev gesla ni na voljo. S ponastavitvijo gesla ne onemogočite zaklenitve računa po prevelikem številu poskusov vnosa napačnega gesla. Počakati morate 10 minut, preden lahko ponastavite geslo oziroma se poskusite prijaviti.

### Ponastavitev gesla računa `ilmnuser`

Geslo za `ilmnuser` lahko ponastavite, če poznate geslo za račun `ilmnadmin` ali `root`.

1. Prijavite se v `ilmnadmin`.
2. Odprite terminal.
3. Vnesite `sudo passwd ilmuser`.
4. Ob pozivu vnesite geslo za `ilmnadmin`.
5. Ob pozivu vnesite novo geslo za `ilmnuser`.
6. Ob pozivu znova vnesite novo geslo za `ilmnuser` ter ga potrdite.

### Ponastavitev gesla računa `ilmnadmin`

Geslo za `ilmnadmin` lahko ponastavite, če poznate geslo za račun `root`.

1. Prijavite se v račun `root`.
2. Odprite terminal.
3. Vnesite `passwd ilmadmin`, da spremenite geslo za `ilmadmin`, ali pa vnesite `passwd ilmuser`, da spremenite geslo za `ilmnuser`.
4. Ob pozivu vnesite geslo.
5. Ob pozivu znova vnesite novo geslo, da ga potrdite.

### Ponastavitev gesla računa `root`

Če želite ponastaviti geslo računa `root`, uporabite eno od spodnjih možnosti:

- Če poznate geslo ob zajemu zadnje slike OS, obnovite shranjeno sliko.
- Če se ne spomnite gesla, se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina.

## Konfiguracija središča BaseSpace Sequence Hub in storitve Proactive Support

BaseSpace Sequence Hub in Proactive Support konfigurirajte v sistemu tako, da upoštevate spodnja navodila. Če želite nastaviti račun za BaseSpace Sequence Hub, glejte [spletno pomoč za BaseSpace Sequence Hub](#).

1. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Settings** (Nastavitve).

2. Če želite nastaviti BaseSpace Sequence Hub in Proactive Support, izberite eno od teh možnosti:

Možnost	Opis in zahteve
»Proactive Support Only*« (Le Proactive Support*)	Družbi Illumina so poslani podatki o učinkovitosti delovanja instrumenta za namene hitrejšega odpravljanja napak. Potrebujete internetno povezavo.
»Proactive and Run Monitoring« (Proaktivno in nadzor izvedbe)	V središče BaseSpace Sequence Hub so poslane datoteke InterOp in dnevniške datoteke za nadzor izvedbe na daljavo. To je privzeta možnost. Potrebujete račun za BaseSpace Sequence Hub in internetno povezavo.
»Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe)	V središče BaseSpace Sequence Hub so poslane datoteke InterOp, dnevniške datoteke in podatki o izvedbi sekvenciranja za nadzor na daljavo in analizo. Potrebujete račun za BaseSpace Sequence Hub, internetno povezavo in vzorčni list.
None (Brez)	Prekinite povezavo izvedb sekvenciranja z računi za BaseSpace Sequence Hub in ne pošljite podatkov o učinkovitosti delovanja instrumenta storitvi Illumina Proactive Support.

\* Odvisno od različice programske opreme za nadzor se ime te nastavitve v vmesniku programske opreme lahko razlikuje od imena, ki je navedeno v tem priročniku.

Če je izbrana katera koli možnost, razen možnosti »None« (Brez), je storitev Proactive Support omogočena. To je brezplačna storitev, kjer si lahko ogledate podatke o učinkovitosti delovanja na nadzorni plošči za stranke MyIllumina, storitvene skupine družbe Illumina pa lahko hitreje odpravijo morebitne težave.

- i** | Možnost »Proactive and Run Monitoring« (Proaktivno in nadzor izvedbe) je privzeto vklopljena. Če ne želite sodelovati v tej storitvi, izberite **None** (Brez).
- Če ste v 2 koraku izbrali »None« (Brez), izberite **Save** (Shrani), da dokončate. V nasprotnem primeru nadaljujte do 6 koraka.
  - Na seznamu lokacij gostovanja izberite lokacijo strežnika središča BaseSpace Sequence Hub, kamor so preneseni podatki. Zagotovite, da je lokacija gostovanja v vaši regiji oziroma v njeni bližini.
  - Če imate naročnino za podjetja, vnesite ime domene (URL), ki jo uporabljate za račun za BaseSpace Sequence Hub. Na primer: <https://yourlab.basespace.illumina.com>.
  - Izberite **Save** (Shrani).

## Določanje mesta privzete mape z odčitki

Upoštevajte navodila v tem poglavju, da izberete privzeto mesto mape z odčitki. Med nastavitvijo izvedbe sekvenciranja lahko spremenite mapo z odčitki za posamezno izvedbo. Programska oprema shrani datoteke cBCL<sup>1</sup> in druge podatke o izvedbi v mapo z odčitki.

Mapa z odčitki je potrebna, razen če je središče BaseSpace Sequence Hub konfigurirano za način »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe). Za privzeto mapo z odčitki uporabite le zunanji ali omrežni pogon. Če uporabite mapo z odčitki v instrumentu, lahko to negativno vpliva na izvedbo sekvenciranja.

### Določitev mape z odčitki na zunanjem pogonu

Upoštevajte ta navodila, da izberete zunanji prenosni pogon kot privzeto mapo z odčitki. Priporočljiv je pogon s samostojnim napajanjem, ki je formatiran za NFTS ali GPT/EXTA.

1. Priključite zunanji prenosni pogon na vrata 3.0 USB on strani ali na zadnji strani instrumenta. Zagotovite, da so za zunanji prenosni pogon omogočena dovoljenja za pisanje. Če je nastavljen način »Read Only« (Samo branje), programska oprema za nadzor ne more shranjevati podatkov na pogon.
2. Ustvarite novo mapo na zunanjem prenosnem pogonu. Ta mapa bo lokacija privzete mape z odčitki. Programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000 zahteva najmanj dve ravni ugnezenih map za prepoznavanje lokacije kot zunanjega prenosnega pogona.
3. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Settings** (Nastavitve).
4. V razdelku »Default Output Folder« (Privzeta mapa z odčitki) izberite obstoječo pot mape in se pomaknite do nove mape na zunanjem prenosnem pogonu.
5. **[Izbirno]** Če ste izbrali možnost **Online Run Setup** (Nastavitev spletne izvedbe) v razdelku »Run Mode« (Način izvedbe), izberite možnost v spustnem meniju »Hosting Location« (Lokacija gostovanja).
6. Izberite **Save** (Shrani).

### Določanje privzete mape z odčitki v omrežnem pogonu

Upoštevajte ta navodila za vpetje trajnega omrežnega pogona in določitev lokacije privzete mape z odčitki. Strežniški sporočilni blok (SMB)/skupni internetni datotečni sistem (CIF-ji) in omrežni datotečni sistem (NFS) so edini podprti načini za trajno vpetje omrežnega pogona v sistemu NextSeq 1000/2000.

#### Navodila za vpetje z načinom SMB/CIFS

1. Če je programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000 odprta, izberite **Minimize Application** (Minimiraj aplikacijo).

---

<sup>1</sup>Vsebuje dodelitev baze in povezano oceno kakovosti za posamezne gruče posameznih ciklov sekvenciranja.

2. Prijavite se v ilmnadmin.
3. Izberite **Applications** (Aplikacije).
4. V razdelku »Favorites« (Priljubljeno) izberite **Terminal**.
5. Vnesite `sudo touch /root/.smbcreds`, nato pa izberite **Enter**.
6. Ko ste pozvani, vnesite geslo ilmnadmin.  
Geslo ilmnadmin morate vnesti vsakič, ko uporabite ukaz `sudo`.
7. Vnesite `sudo gedit /root/.smbcreds`, nato pa izberite **Enter**, da odprete besedilno datoteko »smbcreds«.
8. Ko se besedilna datoteka `.smbcreds` odpre, vnesite poverilnice za prijavo v omrežje v tej obliki zapisa.

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

Oklepaji niso zahtevani za uporabniško ime, geslo in poverilnice domene. Poverilnica domene je zahtevana le, če je oddaljeni račun del domene.
9. Izberite **Save** (Shrani) in zaprite datoteko.
10. Določite ime strežnika in ime strežnika za SMB/CIF-je za skupno rabo.  
Ime strežnika in ime za skupno rabo ne smeta vsebovati presledkov, na primer:  
Ime strežnika: `192.168.500.100` ali `Myserver-myinstitute-03`  
Ime za skupno rabo: `/share1`
11. V terminalu vnesite `sudo chmod 400 /root/.smbcreds`, nato pa izberite **Enter**, da omogočite dostop za branje za besedilno datoteko `.smbcreds`.
12. Vnesite `sudo mkdir /mnt/<local name>`.  
`<local name>` je ime novega imenika v omrežnem pogonu in lahko vsebuje presledke. To je imenik, ki bo prikazan v instrumentu.
13. Izberite **Enter**.
14. Vnesite `sudo gedit /etc/fstab`, nato pa izberite **Enter**.
15. Ko se odpre datoteka »fstab«, na konec datoteke vnesite to ime, nato pa izberite **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. Izberite **Save** (Shrani) in zaprite datoteko.
17. V terminalu vnesite `sudo mount -a -vvv`, nato pa izberite **Enter**.  
Omrežni pogon je zdaj vpet kot `/mnt/<local name>`.
18. Če želite potrditi uspešno vpetje, vnesite `<df | grep <local name>>`, nato pa izberite **Enter**.  
Prikaže se ime skupne rabe datotek.



19. Vnesite `sudo mkdir /mnt/<local name>/<output directory>`, da ustvarite podmapo v lokalnem imeniku. `<output directory>` je mesto privzete mape z odčitki.  
Programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000 zahteva najmanj dve ravni ugnezdenih map za prepoznavanje lokacije kot vpetega omrežnega pogona.
20. Znova zaženite instrument. Glejte razdelek [Ponovni zagon instrumenta na strani 82](#).
21. Trajni vpeti omrežni pogon nastavite kot privzeto mapo z odčitki. Glejte [Določanje trajnega omrežnega pogona kot privzete mape z odčitki na strani 17](#).

## Navodila za vpetje z načinom NFS

1. Če je programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000 odprta, izberite **Minimize Application** (Minimiraj aplikacijo).
2. Prijavite se v `ilmnadmin`.
3. Določite ime strežnika za strežnik NFS.  
Ime strežnika ne sme vsebovati presledkov, na primer:  
Ime strežnika: `192.168.500.100` ali `Myserver-myinstitute-03`
4. Izberite **Applications** (Aplikacije).
5. V razdelku »Favorites« (Priljubljeno) izberite **Terminal**.
6. Vnesite `sudo mkdir /mnt/<local name>`, nato pa izberite **Enter**.  
`<local name>` je ime novega imenika v omrežnem pogonu.
7. Vnesite `sudo gedit /etc/fstab`, nato pa izberite **Enter**.
8. Ko se odpre datoteka »fstab«, vnesite to ime, nato pa izberite **Enter**.  
Ime strežnika: `/share //mnt/<local name> nfs x-systemd.automount,defaults 0 0`
9. Izberite **Save** (Shrani) in zaprite datoteko.
10. V terminalu vnesite `sudo mount -a -vvv`, nato pa izberite **Enter**.  
Omrežni pogon je zdaj vpet v `/mnt/directory` v mapi `<local name>`.
11. Ustvarite nov element `<sub folder>` v mapi `<local name>`. Podmapa je mesto privzete mape z odčitki.  
Programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000 zahteva najmanj dve ravni ugnezdenih map za prepoznavanje lokacije kot vpetega omrežnega pogona.
12. Znova zaženite instrument. Glejte razdelek [Ponovni zagon instrumenta na strani 82](#).
13. Trajni vpeti omrežni pogon nastavite kot privzeto mapo z odčitki. Glejte [Določanje trajnega omrežnega pogona kot privzete mape z odčitki na strani 17](#).

## Določanje trajnega omrežnega pogona kot privzete mape z odčitki

1. Prijavite se v `ilmnuser`.
2. V meniju programske opreme za nadzor NextSeq 1000/2000 izberite **Settings** (Nastavitve).

3. V razdelku »Default Output Folder« (Privzeta mapa z odčitki) izberite trajni vpeti omrežni pogon na mestu `/mnt/<local name>/<output directory>`.
4. **[Izbirno]** Če ste izbrali možnost **Online Run Setup** (Nastavitev spletne izvedbe) v razdelku »Run Mode« (Način izvedbe), izberite možnost v spustnem meniju »Hosting Location« (Lokacija gostovanja).
5. Izberite **Save** (Shrani).

## Uvoz vzorčnih genomov po meri

Nove vzorčne genome po meri lahko uvozite le s skrbniškim računom. Seznam združljivih vzorčnih genomov je na voljo na strani za združljivost izdelka NextSeq 1000/2000.

1. Ustvarite vzorčni genom z aplikacijo Reference Builder for Illumina Instruments BaseSpace Sequence Hub. Za več informacij glejte *Spletna pomoč za aplikacijo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0*.
2. Izberite meni programske opreme za nadzor, nato pa izberite **Process Management** (Upravljanje postopka).
3. Prepričajte se, da se ne izvaja nobeno sekvenciranje ali sekundarna analiza v instrumentu.
4. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Minimize Application** (Minimiraj aplikacijo).
5. Prijavite se v `ilmnadmin`.
6. Izberite meni programske opreme za nadzor in nato izberite **DRAGEN**.
7. V razdelku »Genome« (Genom) izberite **View Installed Genomes** (Prikaži nameščene genome), da si ogledate seznam vseh trenutno nameščenih genomov družbe Illumina in genomov po meri.
8. Zaprite modalno okno.
9. V razdelku »Import New Reference Genomes« (Uvozi nove vzorčne genome) izberite **Choose** (Izberi), poiščite datoteko vzorčnega genoma (\*.tar.gz) v prenosnem ali vpetem omrežnem pogonu, nato pa izberite **Open** (Odpri).
10. Izberite **Import** (Uvozi).

## Uvoz datotek Noise Baseline

Če uporabljate potek dela DRAGEN Enrichment v načinu »somatic«, lahko uporabite datoteko Noise Baseline za filtriranje šuma sekvenciranja ali systemskega šuma. Standardne datoteke s šumom po meri lahko prenesete [s spletnega mesta s podporo družbe Illumina](#) ali pa ustvarite datoteko Noise Baseline po meri.

### Ustvarjanje datoteke Noise Baseline po meri

Če uporabljate način »somatic«, lahko ustvarite datoteko Noise Baseline po meri. Datoteka Noise Baseline je ustvarjena z uporabo običajnih vzorcev, ki se ne ujemajo s subjektom, iz katerega izhajajo vzorci. Priporočeno število običajnih vzorcev je 50.

Če želite ustvariti datoteko Noise Baseline po meri, uporabite enega od teh načinov:

- Uporabite strežnik platforme DRAGEN Bio-IT. Za navodila glejte *spletno pomoč za platformo DRAGEN Bio-IT*.
- Uporabite aplikacijo DRAGEN Baseline Builder v središču BaseSpace Sequence Hub. Uporabite cevovod BCL Convert v funkciji Instrument Run Setup v središču BaseSpace Sequence Hub, da ustvarite datoteke FASTQ. Ko je izvedba sekvenciranja dokončana in je na voljo 50 vzorcev, vnesite datoteke FASTQ v aplikacijo DRAGEN Baseline Builder.

## Uvoz datotek Baseline z uporabniškim vmesnikom

Ko uvozite datoteko Baseline, lahko nastavite izvedbo sekvenciranja z uporabo poteka dela DRAGEN Enrichment v načinu »somatic«.

1. Prenesite standardno datoteko Baseline s [spletnega mesta s podporo družbe Illumina](#) ali pa prenesite datoteko Baseline po meri v strežniku DRAGEN ali aplikaciji DRAGEN Baseline Builder.
2. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Minimize Application** (Minimiraj aplikacijo).
3. Prijavite se v ilmnadmin.
4. Izberite **Applications** (Aplikacije) in nato **Favorites** (Priljubljeno).
5. Izberite **+Other Locations** (+Druge lokacije) in nato **Computer** (Računalnik).
6. Dvokliknite **usr** in nato **local**.
7. Dvokliknite **illumina** in nato **aux\_files**.
8. Povlecite datoteko Noise Baseline v aux\_files.

## Uvoz datotek Baseline z uporabo terminala

Ko uvozite datoteko Baseline, lahko nastavite izvedbo sekvenciranja z uporabo poteka dela DRAGEN Enrichment v načinu »somatic«.

1. Prenesite standardno datoteko Baseline s [spletnega mesta s podporo družbe Illumina](#) ali pa prenesite datoteko Baseline po meri v strežniku DRAGEN ali aplikaciji DRAGEN Baseline Builder.
2. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Minimize Application** (Minimiraj aplikacijo).
3. Prijavite se v ilmnadmin.
4. Izberite **Applications** (Aplikacije).
5. V razdelku »Favorites« (Priljubljeno) izberite **Terminal**.
6. Vnesite ta ukaz.

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

## Konfiguracija načina izvedbe

Način izvedbe velja za vse izvedbe sekvenciranja in določa mesta vnosa parametrov izvedbe ter način analiziranja podatkov.

### Način v oblaku ali hibridni način

1. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Settings** (Nastavitve).
2. Izberite **Online Run Setup** (Nastavitev spletne izvedbe) v razdelku »BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support« (Storitve središča BaseSpace Sequence Hub in Proactive Support).
3. Konfigurirajte ustrezne dodatne nastavitve tako, da izberete te možnosti:
  - a. **Proactive and Run Monitoring** (Proaktivno in nadzor izvedbe) ali **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe).
  - b. Spustni meni za **Hosting Location** (Lokacija gostovanja).
  - c. **[Izbirno]** Vnesite ime v razdelek **Private Domain Name** (Ime zasebne domene).
4. Izberite **Save** (Shrani).

### Lokalni ali samostojni način

1. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Settings** (Nastavitve).
2. Izberite **Local Run Setup** (Nastavitev lokalne izvedbe) v razdelku »BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support« (Storitve središča BaseSpace Sequence Hub in Proactive Support).
3. Konfigurirajte ustrezne dodatne nastavitve tako, da izberete te možnosti:
  - a. **Proactive Support Only** (Le Proactive Support), **Proactive and Run Monitoring** (Proaktivno in nadzor izvedbe), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe) ali **None** (Brez).



BaseSpace Sequence Hub omogoča funkcijo ponovnega premika v čakalno vrsto, če je izbran način **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe). V primeru neveljavnega vzorčnega lista lahko s to funkcijo izvedete popravke vzorčnega lista in znova premaknete analizo demultipleksiranja v čakalno vrsto. Za funkcijo ponovnega premika v čakalno vrsto v instrumentu glejte [Ponovni premik izvedbe sekvenciranja v čakalno vrsto na strani 82](#).

- b. Spustni meni za **Hosting Location** (Lokacija gostovanja).
  - c. **[Izbirno]** Vnesite ime v razdelek **Private Domain Name** (Ime zasebne domene).
4. Izberite **Save** (Shrani).

## Dejavniki vzorčnega lista za lokalni in samostojni način

Za izvedbo analize z aplikacijo DRAGEN morate uporabiti vzorčni list v obliki zapisa datoteke v2. Vzorčni list v obliki zapisa datoteke v2 je združljiv tudi z aplikacijami središča BaseSpace Sequence Hub, ki ne podpirajo platforme DRAGEN. Za informacije o ustvarjanju vzorčnega lista v obliki zapisa datoteke v2 glejte [Nastavitve za vzorčni list v2 na strani 86](#).

## Prilagoditev instrumenta

To poglavje vključuje informacije o konfiguriranju razpoložljivih nastavitvev prilagoditev. Če želite nastaviti privzeto mapo z odčitki, glejte [Določanje mesta privzete mape z odčitki na strani 15](#).

### Poimenovanje instrumenta

1. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Settings** (Nastavitve).
2. Izberite »Instrument Nickname« (Vzdevek instrumenta) in vnesite želeno ime instrumenta. Ime je prikazano na vrhu vsakega zaslona.
3. Izberite **Save** (Shrani).

### Nastavitev denaturiranja in redčenja

1. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Settings** (Nastavitve).
2. Izberite, ali želite samodejno denaturirati in redčiti knjižnice v instrumentu. Privzeto je izbrana nastavev, ki ste jo določili za prejšnjo izvedbo sekvenciranja.
  - Če želite samodejno denaturirati in redčiti knjižnice v instrumentu, potrdite polje **Denature and Dilute On Board** (Denaturiranje in redčenje v instrumentu).
  - Če želite ročno denaturirati in redčiti knjižnice, prekličite izbiro potrditvenega polja **Denature and Dilute On Board** (Denaturiranje in redčenje v instrumentu).  
Za informacije o ročnem denaturiranju in redčenju knjižnic glejte *Navodila za denaturiranje in redčenje knjižnic za sistema NextSeq 1000 in 2000 (dokument št. 1000000139235)*.

### Nastavitev samodejnega odstranjevanja reagenta

1. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Settings** (Nastavitve).
2. Izberite, ali želite, da sistem samodejno odstrani neuporabljene reagente v vsebnik za že uporabljene reagente po vsaki izvedbi, da zagotovite učinkovitejše odstranjevanje odpadnega reagenta po dokončanju izvedbe:
  - Če želite samodejno odstraniti reagent, potrdite polje **Purge Reagent Cartridge** (Očisti kartušo z reagentom).
  - Če želite preskočiti odstranitev reagenta, prekličite izbiro potrditvenega polja **Purge Reagent Cartridge** (Očisti kartušo z reagentom) (to je privzeta nastavev).

Postopek čiščenja neuporabljenih reagentov podaljša potek dela za 2 uri.

3. Izberite **Save** (Shrani).

## Konfiguracija posodobitev programske opreme

1. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Settings** (Nastavitve).
2. Izberite, ali želite, da sistem samodejno preveri posodobitve programske opreme:
  - Če želite omogočiti samodejno preverjanje, potrdite potrditveno polje **Autocheck for software updates** (Samodejno preveri posodobitve programske opreme).
  - Če želite omogočiti ročno preverjanje, počistite potrditveno polje **Autocheck for software updates** (Samodejno preveri posodobitve programske opreme).

Za samodejno preverjanje posodobitev programske opreme potrebujete internetno povezavo. Več informacij o nameščanju posodobitev programske opreme najdete v poglavju [Posodobitve programske opreme na strani 74](#).

3. Izberite **Save** (Shrani).

## Spreminjanje svetlosti zaslona LCD

1. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Settings** (Nastavitve).
2. Premaknite drsnik za svetlost zaslona LCD do želenega odstotka.
3. Izberite **Save** (Shrani).

## Nastavitev strežnika proxy

Podpora za strežnik proxy je na voljo samo v programski opremi NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3.

1. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Settings** (Nastavitve).
2. Izberite trenutne nastavitve strežnika proxy, da odprete zaslon »Proxy Settings« (Nastavitve strežnika proxy).
3. Potrdite polje **Enable Proxy** (Omogoči proxy), nato pa vnesite naslov IP za vrata strežnika.
4. **[Izbirno]** Če strežnik proxy zahteva preverjanje pristnosti, potrdite polje **Requires Username and Password** (Zahteva uporabniško ime in geslo) ter vnesite uporabniško ime in geslo.
5. Izberite **Save** (Shrani), da shranite in preverite veljavnost informacij proxyja.
6. Izberite eno od teh možnosti:
  - Izberite **Yes, I'm Finished** (Da, dokončano), da znova zaženete sistem in uporabite nove nastavitve za proxy.
  - Izberite **No, Take Me Back** (Ne, želim nazaj), da se vrnete na zaslon z nastavitvami. Nove nastavitve strežnika proxy so shranjene, vendar niso uporabljene, dokler znova ne zaženete sistema.

# Potrošni material in oprema

V tem poglavju so navedeni vsi elementi, priloženi kompletu reagentov, s pogoji shranjevanja. Naveden je tudi pomožen potrošni material in pomožna oprema, ki jo morate kupiti, če želite dokončati protokol ter izvajati vzdrževanje in postopke odpravljanja težav.

## Potrošni material za sekvenciranje

Za sekvenciranje v sistemu NextSeq 1000/2000 potrebujete en komplet reagentov NextSeq 1000/2000 P2 družbe Illumina za enkratno uporabo ali pa en komplet reagentov NextSeq 1000/2000 P3 družbe Illumina za enkratno uporabo. Komplet reagentov NextSeq 1000/2000 P2 je na voljo v treh velikostih (100, 200 in 300 ciklov). Komplet reagentov NextSeq 1000/2000 P3 pa je na voljo v štirih velikostih (50, 100, 200 in 300 ciklov).

Sistem za sekvenciranje NextSeq 1000 je združljiv samo s kompletom reagentov Illumina NextSeq 1000/2000 P2.

Komplet reagentov vsebuje kartušo in pretočno celico za sekvenciranje. Ko prejmete reagente NextSeq 1000/2000 P2 ali komplet reagentov NextSeq 1000/2000 P3 družbe Illumina, naredite to:

- Nemudoma shranite sestavne dele pri označenih temperaturah, da zagotovite ustrezno učinkovitost delovanja.
- Ne odprite katere koli srebrne vrečke, dokler niste k temu pozvani.
- Kartuše shranjujte v embalaži, da preprečite raztrganje ali preluknjanje vrečke.
- Kartuše shranjujte tako, da so puščice obrnjene gor.


 Če nalepka na kartuši ni obrnjena navzgor, bo to negativno vplivalo na podatke sekvenciranja.

Tabela 2 Sestavni deli kompletov

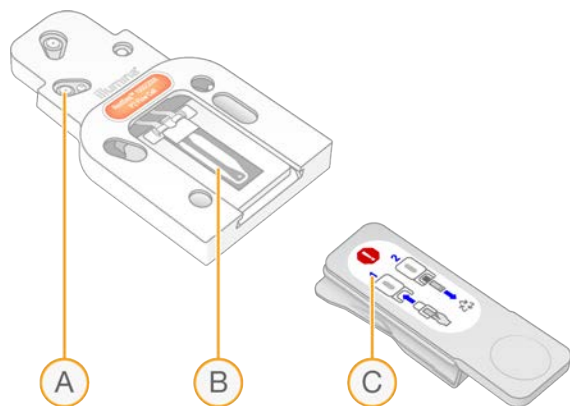
Potrošni material	Količina	Temperatura za shranjevanje	Mere
Kartuša	1	od -25 °C do -15 °C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm (11,5 × 7 × 5 palcev)
Pretočna celica	1	od 2 °C do 8 °C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm (8,5 × 5 × 0,75 palca)
RSB s snovjo Tween 20	1	od -25 °C do -15 °C	4 cm × 6,6 cm × 5 cm (1,6 × 2,6 × 2 palca)

\*Odpremljeno pri sobni temperaturi.

Oba elementa potrošnega materiala vključujeta identifikatorje za sledenje in zagotavljata združljivost. Kartuša in pretočna celica uporabljata RFID<sup>1</sup>.

## Pretočna celica

Pretočna celica je vzorčna, enopasovna pretočna celica. Plastična kartuša obdaja stekleno pretočno celico. Sivo držalo prekriva pretočno celico in gleda ven iz kartuše za lažje rokovanje.



- A. Plastična kartuša
- B. Pretočna celica
- C. Sivo držalo

Na notranji površini pretočne celice je več milijonov nano vdolbinic. Gruče se ustvarijo v nano vdolbinicah, v katerih se nato izvede reakcija sekvenciranja. Vzorčna razporeditev nano vdolbinic zagotavlja boljše rezultate za odčitke in podatke.

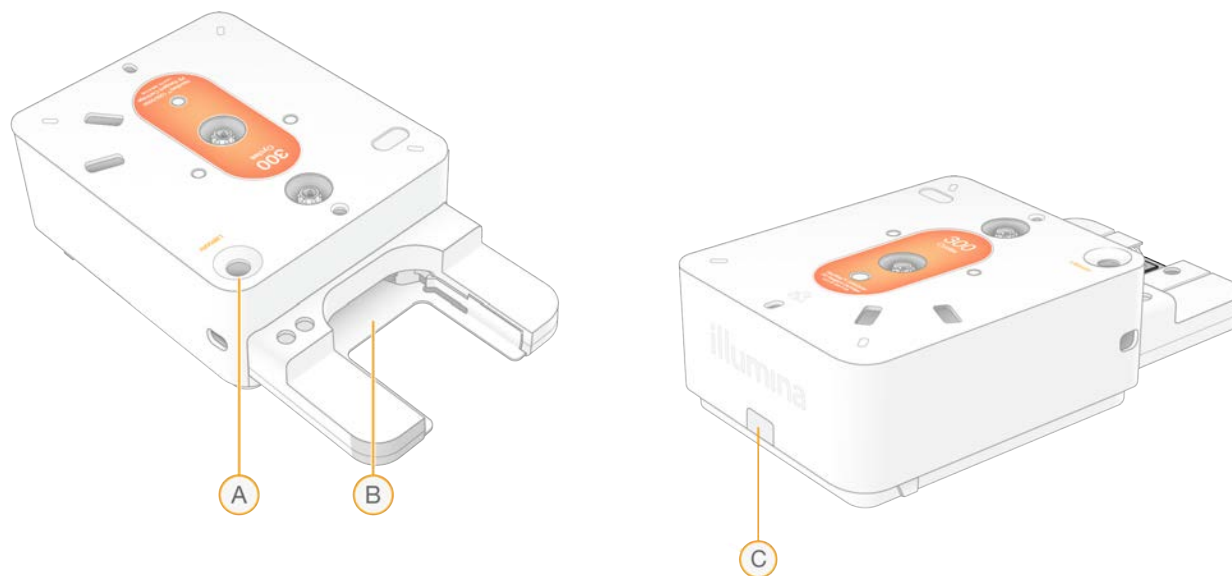
---

<sup>1</sup>radiofrekvenčna identifikacija



## Kartuša

Kartuša z reagentom za sekvenciranje je vnaprej napolnjena z reagenti za gručenje, sekvenciranje, odčitavanje v paru in indeksiranje. Rezervoar v zatesnjeni foliji je namenjen knjižnicam, reža na sprednjem delu pa je namenjena pretočni celici.



- A. Rezervoar knjižnice
- B. Reža pretočne celice
- C. Odtočni čep

Kartuša vsebuje ves potrošni material za izvedbo sekvenciranja: reagente, knjižnico in pretočno celico. Knjižnica in pretočna celica sta nameščeni v odmrznjeni kartuši, ki se nato namesti v instrument. Ko se začne izvedba sekvenciranja, se reagenti in knjižnice samodejno prenesejo iz kartuše v pretočno celico.

Kartuša vsebuje črpalke, ventile in vse tekočinske elemente, potrebne za sistem, vključno z rezervoarjem na spodnji strani za zbiranje uporabljenih reagentov. Kartušo je treba po izvedbi sekvenciranja zavreči, zato instrumenta ni treba izpirati.

## Podprto število ciklov

Nalepka na kartuši pomeni, koliko ciklov je analiziranih in ne koliko se jih izvede. Pretočna celica je združljiva s poljubnim številom ciklov in vrsto odčitavanja.

Vse kartuše s 100 in 200 cikli vključujejo dodatnih 38 ciklov. Kartuša s 300 cikli vključuje dodatnih 27 ciklov. Kartuša s 300 cikli na primer zagotavlja zadosti reagentov za do 327 ciklov sekvenciranja. Več informacij o številu ciklov v sekvenciranju poiščite v razdelku [Število ciklov v odčitavanju na strani 31](#).

## Opisi simbolov

V naslednji tabeli so opisani simboli na ohišju ali embalaži potrošnih materialov.

Simbol	Opis
	Datum poteka potrošnega materiala. Za najboljše rezultate uporabite potrošne materiale pred tem datumom.
	Označuje proizvajalca (Illumina).
	Namen uporabe je »Samo za raziskave« (RUO – Research Use Only).
	Označuje številko dela za identifikacijo potrošnega materiala. <sup>1</sup>
	Označuje številko paketa za identifikacijo paketa ali serije, v kateri je bila oprema proizvedena. <sup>1</sup>
	Označuje nevarnost za zdravje.
	Temperatura za shranjevanje v stopinjah Celzija. Opremo shranite pri navedeni temperaturi. <sup>2</sup>

## Pomožen potrošni material

Za sekvenciranje in vzdrževanje kupite ta potrošni material.

### Potrošni material za sekvenciranje

Tabela 3 Potrošni material za sekvenciranje

Potrošni material	Dobavitelj	Namen
Nepudrane rokavice za enkratno uporabo	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Splošni namen
Komplet reagentov NextSeq 1000/2000 P2 (v3)	Illumina: kataloška št. 20046811 (100 ciklov) kataloška št. 20046812 (200 ciklov) kataloška št. 20046813 (300 ciklov)	Zagotavlja kartušo z reagentom, pretočno celico in NextSeq 1000/2000 RSB s snovjo Tween 20 za eno izvajanje. Združljivo s sistemoma NextSeq 1000 in NextSeq 2000.
Komplet reagentov NextSeq 2000 P3	Illumina: kataloška št. 20046810 (50 ciklov) kataloška št. 20040559 (100 ciklov) kataloška št. 20040560 (200 ciklov) kataloška št. 20040561 (300 ciklov)	Zagotavlja kartušo z reagentom, pretočno celico in NextSeq 1000/2000 RSB s snovjo Tween 20 za eno izvajanje. Združljiv samo s sistemom NextSeq 2000.
Mikroeprovete, 1,5 ml	Fisher Scientific, kataloška št. 14-222-158 ali enakovredne epruvete z nizko vezavo	Redčenje knjižnic do koncentracije ob vstavljanju.
Konice za pipete, 10 µl	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Redčenje knjižnic.
Konice za pipete, 20 µl	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Redčenje in vstavljanje knjižnic.
Konice za pipete, 200 µl	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Redčenje knjižnic.
Konice za pipete, 1000 µl	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Preluknanje folije rezervoarja knjižnice.

Potrošni material	Dobavitelj	Namen
[Izbirno] PhiX Control v3	Illumina, kataloška št. FC-110-3001	Izvajanje sekvenciranja le s kontrolnikom PhiX ali dodajanje v genomu PhiX za kontrolno uporabo.
[Izbirno] Papirnate brisače	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Sušenje kasete po vodni kopeli.

## Potrošni material za vzdrževanje

Tabela 4 Potrošni material za vzdrževanje

Potrošni material	Dobavitelj	Namen
Nepudrane rokavice za enkratno uporabo	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Splošni namen
Zamenjava zračnega filtra NextSeq 1000/2000*	Illumina, kataloška št. 20029759	Zamenjava zračnega filtra vsakih šest mesecev.

\* Instrument je dobavljen z enim nameščenim in enim dodatnim filtrom. Če instrument ni pod garancijo, nadomestne izdelke dobi uporabnik. Shranite zapakirano do uporabe.

## Pomožna oprema

Za namene sekvenciranja kupite to opremo.

Element	Vir	Namen
Zamrzovalnik, od -25 do -15 °C	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Shranjevanje kasete
Posoda za led	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Hranjenje knjižnic do začetka izvajanja sekvenciranja.
Pipeta, 10 µl	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Redčenje knjižnic do koncentracije ob vstavljanju.
Pipeta, 20 µl	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Redčenje knjižnic do koncentracije ob vstavljanju in vstavljanje knjižnic v kartušo.
Pipeta, 200 µl	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Redčenje knjižnic do koncentracije ob vstavljanju.

Element	Vir	Namen
Hladilnik, od 2 do 8 °C	Dobavitelj običajne laboratorijske opreme	Shranjevanje pretočne celice ali odmrzovanje kasete.
[Izbirno] Ena od teh vodnih kopeli z nadzorovano temperaturo ali enakovredna: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cirkulacijska vodna kopel Thermo Scientific Precision 35L (za 5 kartuš hkrati)</li> <li>• Digitalna cirkulacijska vodna kopel SHEL LAB 22L (za 3 kartuše hkrati)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thermo Fisher Scientific, kataloška št. TSCIR 35</li> <li>• Shel Lab, kataloška št. SWBC22</li> </ul>	Odmrzovanje kartuše.

# Protokol

V tem razdelku so na voljo navodila po korakih za pripravo potrošnega materiala, redčenje knjižnic in nastavitve izvedbe sekvenciranja v enem od štirih načinov izvedbe (način v oblaku ter hibridni in lokalni način uporabljajo aplikacijo DRAGEN ali središče BaseSpace Sequence Hub, samostojni način pa uporabljen za samostojno izvedbo generiranja podatkov cBCL samo za poteke dela analize po meri).

Pri delu z reagenti in drugimi kemikalijami uporabljajte zaščitna očala, laboratorijsko haljo in nepudrane rokavice.

Pred začetkom protokola se prepričajte, da imate pripravljen potreben potrošni material in opremo. Glejte razdelek [Potrošni material in oprema na strani 23](#).

Protokole izvajajte v prikazanem vrstnem redu ter pri tem uporabite določene volumne, upoštevajte navedene temperature in obdobja trajanja.

## Dejavniki sekvenciranja

Pred začetkom protokola preglejte te podatke, da se pripravite za postopek redčenja knjižnic in nastavitve izvedbe sekvenciranja. Doseganje optimalne koncentracije ob vstavljanju je ključno za zagotovitev uspešnega sekvenciranja in analize. Vnos pravilnega števila ciklov v odčitavanju zagotavlja optimalno odčitavanje podatkov.

### Volumni in koncentracije ob vstavljanju

Volumen ob vstavljanju je 20 µl. Koncentracija ob vstavljanju je odvisna od vrste knjižnice:

Vrsta knjižnice	Koncentracija ob vstavljanju (pM)
AmpliSeq™ for Illumina Library PLUS	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep with Enrichment	1000
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA PCR-Free	1000
100 % PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1200
TruSeq DNA Nano 550	1500
TruSeq Stranded mRNA	1000

Za druge vrste knjižnic je priporočena začetna koncentracija ob vstavljanju 650 pM. Optimizirajte koncentracijo v naslednjih izvajanjih sekvenciranja, da določite koncentracijo ob vstavljanju, ki zagotavlja dosleden donos v skladu s specifikacijami.

**i** | Če želite optimizirati koncentracijo ob vstavljanju, uporabite metriko »% Loading Concentration« (% koncentracije ob vstavljanju) v mapi z odčitki `PrimaryAnalysisMetrics.csv`, ki je na voljo po dokončanju izvedbe sekvenciranja. Če je % koncentracije ob vstavljanju < 95 %, povečajte koncentracijo ob vstavljanju v korakih po 100 pM za naslednje izvedbe sekvenciranja.

## Število ciklov v odčitavanju

Kakovost podatkov je zagotovljena, če za vsako odčitavanje vnesete najmanj 26 ciklov in največ 151 ciklov. Natančno število ciklov je odvisno od posameznega eksperimenta. Programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000 zahteva najmanj 1 cikel za »Read 1« (Odčitavanje 1), vendar prikaže opozorilo, če je število ciklov za »Read 1« (Odčitavanje 1) manjše kot 26.

Skupno število ciklov za »Read 1« (Odčitavanje 1), »Index 1« (Indeks 1), »Index 2« (Indeks 2) in »Read 2« (Odčitavanje 2) ne sme biti večje kot število ciklov, ki jih podpira komplet, ter 38 ciklov za komplete za 100 in 200 ciklov in 27 ciklov za komplete P3 za 300 ciklov. Programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000 prikaže opozorilo, če imata »Index 1« (Indeks 1) in »Index 2« (Indeks 2) manj kot 6 ciklov. Opozorilo ni prikazano, če je za »Index 1« (Indeks 1) ali »Index 2« (Indeks 2) izbranih 0 ciklov.

Najmanjše in največje število ciklov vključujeta tudi dodatni cikel. Želeni dolžini odčitavanja vedno dodajte še en cikel, s katerim popravite učinke faziranja in predfaziranja. Dolžina odčitavanja je število ciklov *sekvenciranja* v odčitavanju 1 in odčitavanju 2, vendar brez dodatnih in indeksnih ciklov. Za več informacij glejte razdelek o faznem popravku v poglavju [Potek analize v realnem času na strani 56](#).

Primer nastavitve izvedbe:

- Če je dolžina odčitavanja 35 (eno odčitavanje), v polje »Read 1« (Odčitavanje 1) vnesite **36**.
- Če je dolžina odčitavanja 150 na odčitavanje (odčitavanje z obeh strani), v polje »Read 1« (Odčitavanje 1) vnesite **151** in v polje »Read 2« (Odčitavanje 2) vnesite **151**.

## Načrtovanje izvedbe sekvenciranja v središču BaseSpace Sequence Hub

Uporabite funkcijo Instrument Run Setup v središču BaseSpace Sequence Hub, da ustvarite in konfigurirate nastavitve izvedbe sekvenciranja. Če želite nastaviti izvedbo v načinu v oblaku ali v hibridnem načinu, pošljite konfiguracijo izvedbe seznamu načrtovanih izvedb za račun za BaseSpace Sequence Hub na zavihku »Planned Runs« (Načrtovane izvedbe). Izvedbe, ki so na voljo za sekvenciranje v sistemih za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000, so prikazane na zavihku »Planned Runs« (Načrtovane izvedbe). Če želite nastaviti izvedbo v lokalnem načinu, uporabite funkcijo

Instrument Run Setup, s katero ustvarite in uvozite vzorčni list v obliki zapisa v2. Vzorčni list pa lahko ustvarite tudi brez uporabe središča BaseSpace Sequence Hub z razpoložljivo predlogo – glejte poglavje [Nastavitve za vzorčni list v2 na strani 86](#).

Funkcija Instrument Run Setup v središču BaseSpace Sequence Hub ne podpira več kot 1536 vzorcev.

## Nastavitev izvedbe sekvenciranja

1. Odprite središče BaseSpace Sequence Hub.
2. Vnesite svoj e-poštni račun in geslo za BaseSpace Sequence Hub, nato pa izberite **Sign In** (Vpis).
3. Izberite zavihek **Runs** (Izvedbe), nato pa izberite spustni meni **New Run** (Nova izvedba).
4. Izberite **NextSeq 1000/2000**.
5. V polje »Run Name« (Ime izvedbe) vnesite enolično ime po lastnem izboru, da poimenujete trenutno izvedbo.

Ime izvedbe lahko vsebuje največ 225 alfanumeričnih znakov, presledkov, črtic in podčrtajev.

6. Izberite eno od teh mest analize.
  - **BaseSpace** – analiziranje podatkov sekvenciranja v oblaku.
  - **Local** – analiziranje podatkov sekvenciranja v instrumentu ali ustvarjanje vzorčnega lista v2 za lokalni ali hibridni način.
7. Izberite vrsto in različico analize.

Več informacij o sekundarni analizi je na voljo v poglavju [Datoteke z odčitki sekundarne analize v aplikaciji DRAGEN na strani 61](#) ali v dokumentaciji aplikacije BaseSpace Sequence Hub. Če ste izbrali analizo DRAGEN Single Cell RNA, si lahko ogledate stran z datotekami izdelka NextSeq 1000/2000, kjer so na voljo informacije o združljivosti kompleta za pripravo knjižnic Single Cell RNA drugega izdelovalca.



Za analizo v instrumentu se mora izbrana različica ujemati z različico aplikacije DRAGEN, ki je nameščena v dokumentu. Če želite potrditi različico aplikacije DRAGEN, ki je nameščena v instrumentu, glejte [Potek dela v aplikaciji DRAGEN in posodobitve licence na strani 76](#).

8. **[Izbirno]** Nastavite prilagojene komplete za indeksiranje tako, da upoštevate ta postopek. Če uporabljate več kot eno knjižnico, morajo imeti knjižnice enake dolžine indeksnega odčitavanja.
  - a. Izberite **Add Custom Index Adapter Kit** (Dodaj prilagojeni komplet vmesnika indeksiranja) v spustnem meniju »Index Adapter Kit« (Komplet vmesnika indeksiranja).
  - b. Izberite vrsto predloge in vnesite ime kompleta, sekvence vmesnika, strategije indeksiranja in indeksne sekvence.

Prepričajte se, da so sekvence vmesnika drugega indeksa (i5) usmerjene naprej.
  - c. Izberite **Create New Kit** (Ustvari nov komplet).
9. **[Izbirno]** Nastavite prilagojeni komplet za pripravo knjižnic tako, da upoštevate ta postopek.
  - a. Izberite **Add Custom Library Prep Kit** (Dodaj prilagojeni komplet za pripravo knjižnic) v spustnem meniju »Library Prep Kit« (Komplet za pripravo knjižnic).



- b. Vnesite ime, vrste odčitavanja, privzete cikle odčitavanja in združljive komplete vmesnika indeksiranja za prilagojeni komplet za pripravo knjižnic.
  - c. Izberite **Create New Kit** (Ustvari nov komplet).
10. Izberite te nastavitve instrumenta. Priporočene možnosti so samodejno izbrane glede na komplet za pripravo knjižnic. Nekateri kompleti za pripravo knjižnic imajo vprogramirano število indeksnih odčitavanj in vrst odčitavanj, ki jih ni mogoče spremeniti.
  - Komplet za pripravo knjižnic
  - Komplet vmesnika indeksiranja
  - Število indeksih odčitavanj
  - Vrsta odčitavanja
  - Število ciklov sekvenciranja na odčitavanje

**i** | Če je za komplet za pripravo knjižnic izbrana možnost »Not Specified« (Ni določeno), število indeksnih odčitavanj ni posodobljeno, dokler ne vnesete indeksnih sekvenc v razdelek »Sample Data« (Podatki vzorca).
11. Vnesite podatke o vzorcu v preglednico »Sample Data« (Podatki vzorca) z eno od teh možnosti. Če želite združiti vzorce za združevanje podatkov med analizo iz strežnika v skupino, dodelite ime za skupino v stolpcu »Project« (Projekt).
  - Izberite **Import Data** (Uvozi podatke), nato pa izberite vzorčni list. Prepričajte se, da vzorčni list izpolnjuje zahteve glede oblike zapisa. Glejte [Nastavitve za vzorčni list v2 na strani 86](#). Če vzorčni list spremenite, ko ga prenesete, lahko pride do napake pri analizi.
  - Prilepite ID-je vzorca in položaje vdolbinic katere koli indeksne ploščice ali indeksa i7 in i5 neposredno iz zunanje datoteke. Preden prilepite, vnesite število vrstic vzorca v polje »Rows« (Vrstice), nato pa izberite +. ID-ji vzorca lahko vsebujejo največ 20 alfanumeričnih znakov, vezajev in podčrtajev.

**i** | Indeksne ploščice s fiksno postavitvijo zahtevajo vnose za položaj vdolbinice. Indeksi, ki nimajo fiksne postavitve, zahtevajo vnose za indeksa i7 in i5. Indekse i5 morate vnesti tako, da so usmerjeni naprej.
  - Ročno vnesite ID-je vzorca in ustrezne položaje vdolbinic ali indekse. Če je za komplet za pripravo knjižnic izbrana možnost »Not Specified« (Ni določeno), vnesite sekvence za »Index 2« (Indeks 2) (i5) usmerjene naprej.
12. Izberite **Next** (Naprej).

## Nastavitev sekundarne analize

Konfigurirajte nastavitve za vrsto analize, ki ste jo izbrali za izvedbo sekvenciranja. Za več informacij o potekih dela analize v aplikaciji DRAGEN glejte [Datoteke z odčitki sekundarne analize v aplikaciji DRAGEN na strani 61](#)

## Illumina DRAGEN BCL Convert

Uporabite spodnje korake za konfiguriranje analize Illumina DRAGEN BCL Convert.

1. Vnesite te izbirne nastavitve.

Nastavitev	Opis
»AdapterRead1« (Odčitavanje vmesnika 1)	Sekvenca vmesnika za odčitavanje 1. Če uporabljate komplet za pripravo knjižnic družbe Illumina, pustite polje »AdapterRead1« (Odčitavanje vmesnika 1) prazno.
»AdapterRead2« (Odčitavanje vmesnika 2)	Sekvenca vmesnika za odčitavanje 2. Če uporabljate komplet za pripravo knjižnic družbe Illumina, pustite polje »AdapterRead2« (Odčitavanje vmesnika 2) prazno.
»BarcodeMismatchesIndex1« (Neujemanja črtne kode za indeks 1)	Število dovoljenih neujemanj med prvim indeksnim odčitavanjem in indeksno sekvenco. Privzeta vrednost je 1. Če je črna koda 6 bp, je priporočena vrednost 0.
»BarcodeMismatchesIndex2« (Neujemanja črtne kode za indeks 2)	Število dovoljenih neujemanj med drugim indeksnim odčitavanjem in indeksno sekvenco. Privzeta vrednost je 1. Če je črna koda 6 bp, je priporočena vrednost 0.
»OverrideCycles« (Cikli preglasitve)	Niz, uporabljen za določitev ciklov UMI in maskiranje ciklov odčitavanja. Dovoljene so te vrednosti: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N – določitev ciklov, ki bodo prezrti.</li> <li>• Y – določitev ciklov sekvenciranja.</li> <li>• I – določitev ciklov indeksiranja.</li> <li>• U – določitev ciklov UMI, ki bodo obrezani.</li> </ul> Vsak element je ločen s podpičjem. Spodaj so navedeni primeri vnosa nastavitve »OverrideCycles« (Cikli preglasitve). U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

2. Izberite, ali želite shraniti kopijo datotek FASTQ. Datoteke FASTQ so ustvarjene le, če izberete, da želite ohraniti datoteke FASTQ.
3. Izberite eno od teh možnosti oblik zapisa datoteke z odčitki FASTQ:
  - **gzip** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa gzip.
  - **DRAGEN** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa ora.
4. Dokončajte konfiguracijo izvedbe sekvenciranja.

- Če želite poslati izvedbo konfiguracije v račun za BaseSpace Sequence Hub, izberite **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Izvedbe, poslane v BaseSpace Sequence Hub, so prikazane na seznamu načrtovanih izvedb in so na voljo za sisteme, ki uporabljajo način v oblaku ali hibridni način.
- Če želite shraniti konfiguracijo izvedbe kot vzorčni list v obliki zapisa datoteke v2, izberite **Export Sample Sheet** (Izvozi vzorčni list) na spustnem seznamu **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Vzorčni list je zahtevan za zagon izvedb sekvenciranja v sistemih z uporabo lokalnega načina. Ta možnost je na voljo le, če je bila za mesto analize izbrana možnost »Local« (Lokalno).

## Illumina DRAGEN Enrichment

Uporabite spodnje korake za konfiguriranje analize Illumina DRAGEN Enrichment.

1. Izberite vzorčni genom.  
Če je možno, uporabite vzorčni genom z imenom »alt aware«.
2. Izberite datoteko \*.bed z regijami, ki jih želite uporabiti, ali pa prenesite novo datoteko po meri. Prepričajte se, da se referenčni genom datoteke BED ujema z referenčnim genomom, ki ste ga izbrali v koraku 1. Za novo datoteko BED po meri uporabite to obliko zapisa imena: ime\_plošče\_številkarazličice.referenčnigenom.bed.
  - **Lokalni način** – izberite **Select Custom File (Local)** (Izberi datoteko po meri (lokalno)), da naložite za eno izvedbo sekvenciranja, ali pa **Upload Custom File (BaseSpace)** (Naloži datoteko po meri (BaseSpace)) za ponavljajočo se uporabo.
  - **Način v oblaku ali hibridni način** – izberite **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prenesi datoteko po meri (BaseSpace)). Datoteka BED po meri je na voljo le v delovni skupini, v katero ste jo prenesli.
3. Izberite način klicanja različic »germline« ali »somatic«.
4. **[Izbirno]** Če uporabljate način klicanja različic »somatic«, izberite datoteko Noise Baseline. Za več informacij glejte [Uvoz datotek Noise Baseline na strani 18](#).
5. Izberite obliko zapisa mape z odčitki za preslikanje/usklajevanje.
6. Izberite, ali želite shraniti kopijo datotek FASTQ. Datoteke FASTQ so ustvarjene le, če izberete, da želite ohraniti datoteke FASTQ.
7. Izberite eno od teh možnosti oblik zapisa datoteke z odčitki FASTQ:
  - **gzip** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa gzip.
  - **DRAGEN** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa ora.
8. Dokončajte konfiguracijo izvedbe sekvenciranja.

- Če želite poslati izvedbo konfiguracije v račun za BaseSpace Sequence Hub, izberite **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Izvedbe, poslane v BaseSpace Sequence Hub, so prikazane na seznamu načrtovanih izvedb in so na voljo za sisteme, ki uporabljajo način v oblaku ali hibridni način.
- Če želite shraniti konfiguracijo izvedbe kot vzorčni list v obliki zapisa datoteke v2, izberite **Export Sample Sheet** (Izvozi vzorčni list) na spustnem seznamu **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Vzorčni list in datoteke sekundarne analize so prenesene v mapo \*.zip in so zahtevane za zagon izvedb sekvenciranja v sistemih z uporabo lokalnega načina. Ta možnost je na voljo le, če je bila za mesto analize izbrana možnost »Local« (Lokalno).

## Illumina DRAGEN Germline

Uporabite spodnje korake za konfiguriranje analize Illumina DRAGEN Germline.

1. Izberite vzorčni genom.  
Če je možno, uporabite vzorčni genom z imenom »alt aware«.
2. Izberite obliko zapisa mape z odčitki za preslikanje/usklajevanje.
3. Izberite, ali želite shraniti kopijo datotek FASTQ. Datoteke FASTQ so ustvarjene le, če izberete, da želite ohraniti datoteke FASTQ.
4. Izberite eno od teh možnosti oblik zapisa datoteke z odčitki FASTQ:
  - **gzip** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa gzip.
  - **DRAGEN** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa ora.
5. Dokončajte konfiguracijo izvedbe sekvenciranja.
  - Če želite poslati izvedbo konfiguracije v račun za BaseSpace Sequence Hub, izberite **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Izvedbe, poslane v BaseSpace Sequence Hub, so prikazane na seznamu načrtovanih izvedb in so na voljo za sisteme, ki uporabljajo način v oblaku ali hibridni način.
  - Če želite shraniti konfiguracijo izvedbe kot vzorčni list v obliki zapisa datoteke v2, izberite **Export Sample Sheet** (Izvozi vzorčni list) na spustnem seznamu **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Vzorčni list in datoteke sekundarne analize so prenesene v mapo \*.zip in so zahtevane za zagon izvedb sekvenciranja v sistemih z uporabo lokalnega načina. Ta možnost je na voljo le, če je bila za mesto analize izbrana možnost »Local« (Lokalno).

## Illumina DRAGEN RNA

Uporabite spodnje korake za konfiguriranje analize Illumina DRAGEN RNA.

1. Izberite vzorčni genom.  
Če je možno, uporabite vzorčni genom brez imena »alt aware«.
2. Izberite obliko zapisa mape z odčitki za preslikanje/usklajevanje.

3. Izberite, ali želite shraniti kopijo datotek FASTQ. Datoteke FASTQ so ustvarjene le, če izberete, da želite ohraniti datoteke FASTQ.
4. Izberite eno od teh možnosti oblik zapisa datoteke z odčitki FASTQ:
  - **gzip** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa gzip.
  - **DRAGEN** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa ora.
5. **[Izbirno]** Prenesite datoteko »RNA Annotation« (Opombe za RNA) v obliki zapisa Gene Transfer Format (GTF).
  - **Lokalni način** – izberite **Select Custom File (Local)** (Izberi datoteko po meri (lokalno)), da naložite za eno izvedbo sekvenciranja, ali pa **Upload Custom File (BaseSpace)** (Naloži datoteko po meri (BaseSpace)) za ponavljajočo se uporabo.
  - **Način v oblaku ali hibridni način** – izberite **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prenesi datoteko po meri (BaseSpace)). Datoteka GTF je na voljo le v delovni skupini, v katero ste jo prenesli.

Ko datoteko GTF prenesete v delovno skupino središča BaseSpace Sequence Hub, izberite datoteko »RNA Annotation« (Opombe za RNA) v spustnem meniju.

6. Izberite, ali želite omogočiti diferencialno izražanje.
7. Če omogočite diferencialno izražanje, izberite vrednost nadzora ali primerjave za posamezen vzorec.

V posamezni primerjalni skupini je vsak vzorec, označen za nadzor, primerjan z vsemi vzorci, označenimi za primerjavo. Če vzorec ne vključuje vrednosti nadzora ali primerjave, za vrednost izberite **na** (ni na voljo).

8. Dokončajte konfiguracijo izvedbe sekvenciranja.
  - Če želite poslati izvedbo konfiguracije v račun za BaseSpace Sequence Hub, izberite **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Izvedbe, poslane v BaseSpace Sequence Hub, so prikazane na seznamu načrtovanih izvedb in so na voljo za sisteme, ki uporabljajo način v oblaku ali hibridni način.
  - Če želite shraniti konfiguracijo izvedbe kot vzorčni list v obliki zapisa datoteke v2, izberite **Export Sample Sheet** (Izvozi vzorčni list) na spustnem seznamu **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Vzorčni list in datoteke sekundarne analize so prenesene v mapo \*.zip, če je na voljo izbirna datoteka GTF, in so zahtevane za zagon izvedb sekvenciranja v sistemih z uporabo lokalnega načina. Ta možnost je na voljo le, če je bila za mesto analize izbrana možnost »Local« (Lokalno).

## Illumina DRAGEN Single Cell RNA

Uporabite spodnje korake za konfiguriranje analize Illumina DRAGEN Single Cell RNA.

1. Izberite vzorčni genom.  
Če je možno, uporabite vzorčni genom brez imena »alt aware«.

2. **[Izbirno]** Prenesite datoteko »RNA Annotation« (Opombe za RNA) v obliki zapisa Gene Transfer Format (GTF).
  - **Lokalni način** – izberite **Select Custom File (Local)** (Izberi datoteko po meri (lokalno)), da naložite za eno izvedbo sekvenciranja, ali pa **Upload Custom File (BaseSpace)** (Naloži datoteko po meri (BaseSpace)) za ponavljajočo se uporabo.
  - **Način v oblaku ali hibridni način** – izberite **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prenesi datoteko po meri (BaseSpace)). Datoteka GTF je na voljo le v delovni skupini, v katero ste jo prenesli.

Ko datoteko GTF prenesete v delovno skupino središča BaseSpace Sequence Hub, izberite datoteko »RNA Annotation« (Opombe za RNA) v spustnem meniju.
3. Izberite obliko zapisa mape z odčitki za preslikanje/usklajevanje.
4. Izberite, ali želite shraniti kopijo datotek FASTQ. Datoteke FASTQ so ustvarjene le, če izberete, da želite ohraniti datoteke FASTQ.
5. Izberite eno od teh možnosti oblik zapisa datoteke z odčitki FASTQ:
  - **gzip** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa gzip.
  - **DRAGEN** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa ora.
6. Izberite konfiguracijo, ki je enaka kot vrsta kompleta za pripravo knjižnic  
Če ste za komplet za pripravo knjižnic na primer izbrali »Single Cell RNA Library Kit 1« (Komplet za pripravo knjižnic 1 za Single Cell RNA), izberite »Type 1« (Vrsta 1) za vrsto konfiguracije.
7. Izberite odčitavanje črtne kode.
8. **[Izbirno]** Uredite število baz v črtnih kodah in UMI-ju. Vrednosti so samodejno zapolnjene glede na izbrani komplet za pripravo knjižnic in vrsto konfiguracije.
9. Izberite usmerjenost verige.
10. **[Izbirno]** Izberite datoteko s sekvencami črtne kode ali pa prenesite novo datoteko po meri.
11. Če uporabljate vrsto konfiguracije »Advanced« (Napredno)/»Custom« (Po meri), vnesite vrednosti za število ciklov preglasitve, položaj črtne kode in položaj UMI.
12. Dokončajte konfiguracijo izvedbe sekvenciranja.
  - Če želite poslati izvedbo konfiguracije v račun za BaseSpace Sequence Hub, izberite **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Izvedbe, poslane v BaseSpace Sequence Hub, so prikazane na seznamu načrtovanih izvedb in so na voljo za sisteme, ki uporabljajo način v oblaku ali hibridni način.
  - Če želite shraniti konfiguracijo izvedbe kot vzorčni list v obliki zapisa datoteke v2, izberite **Export Sample Sheet** (Izvozi vzorčni list) na spustnem seznamu **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Vzorčni list in datoteke sekundarne analize so prenesene v mapo \*.zip, če je na voljo izbirna datoteka GTF, in so zahtevane za zagon izvedb sekvenciranja v sistemih z uporabo lokalnega načina. Ta možnost je na voljo le, če je bila za mesto analize izbrana možnost »Local« (Lokalno).

## Illumina DRAGEN Amplicon

Uporabite spodnje korake za konfiguriranje analize Illumina DRAGEN Amplicon.

1. Izberite vzorčni genom.
2. Izberite datoteko \*.bed z regijami, ki jih želite uporabiti, ali pa prenesite novo datoteko po meri. Prepričajte se, da se referenčni genom datoteke BED ujema z referenčnim genomom, ki ste ga izbrali v koraku 1. Za novo datoteko BED po meri uporabite to obliko zapisa imena: `ime_plošče_številkarazličice.referenčnigenom.bed`.
  - **Način v oblaku ali hibridni način** – izberite **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prenesi datoteko po meri (BaseSpace)). Datoteka BED po meri je na voljo le v delovni skupini, v katero ste jo prenesli.
  - **Lokalni način** – izberite **Select Custom File (Local)** (Izberi datoteko po meri (lokalno)), da naložite za eno izvedbo sekvenciranja, ali pa **Upload Custom File (BaseSpace)** (Naloži datoteko po meri (BaseSpace)) za ponavljajočo se uporabo.
3. Izberite način klicanja različic »germline« ali »somatic«.
4. Izberite obliko zapisa mape z odčitki za preslikanje/usklajevanje.
5. **[Lokalno]** Izberite, ali želite shraniti kopijo datotek FASTQ. Datoteke FASTQ so ustvarjene le, če izberete, da želite ohraniti datoteke FASTQ.
6. Izberite, ali želite shraniti kopijo datotek FASTQ. Datoteke FASTQ so ustvarjene le, če izberete, da želite ohraniti datoteke FASTQ.
7. Izberite eno od teh možnosti oblik zapisa datoteke z odčitki FASTQ:
  - **gzip** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa gzip.
  - **DRAGEN** – shranjevanje datotek FASTQ v obliki zapisa ora.
8. Dokončajte konfiguracijo izvedbe sekvenciranja.
  - Če želite poslati izvedbo konfiguracije v račun za BaseSpace Sequence Hub, izberite **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Izvedbe, poslane v BaseSpace Sequence Hub, so prikazane na seznamu načrtovanih izvedb in so na voljo za sisteme, ki uporabljajo način v oblaku ali hibridni način.
  - **[Lokalno]** Če želite shraniti konfiguracijo izvedbe kot vzorčni list v obliki zapisa datoteke v2, izberite **Export Sample Sheet** (Izvozi vzorčni list) na spustnem seznamu **Submit Run** (Pošlji izvedbo). Vzorčni list in datoteke sekundarne analize so prenesene v mapo \*.zip in so zahtevane za zagon izvedb sekvenciranja v sistemih z uporabo lokalnega načina. Ta možnost je na voljo le, če je bila za mesto analize izbrana možnost »Local« (Lokalno).

## Odmrzovanje kartuše v vrečki in pretočne celice

V tem koraku odmrznete kartušo v *neodprti vrečki* in pripravite pretočno celico. Odmrznite kartušo v vrečki z enim od treh načinov: vodna kopel z nadzorovano temperaturo, hladilnik ali zrak sobne temperature. Kartušo uporabite takoj po odmrznitvi; ne smete je znova zamrzniti. Če kartuše ne

morete uporabiti takoj po odmrznitvi, glejte poglavje [Ponovno shranjevanje potrošnega materiala na strani 81](#).

Slika 4 Kartuša v vrečki



### Odmrzovanje kartuše v vodni kopeli z nadzorovano temperaturo

1. Nadenite si nov par nepudranih rokavic in vzemite kartušo iz shrambe.
2. Vzemite kartušo iz škatle, vendar **ne odprite srebrne vrečke**.

❗ Če v vodni kopeli odmrznete strgano ali preluknjano vrečko, lahko pride do napake pri sekvenciranju. Namesto tega kartušo odmrznite pri sobni temperaturi ali hladilniku.

3. Kartušo v vrečki odmrzujte v vodni kopeli z nadzorovano temperaturo 25 °C 6 ur:

- Globina vode mora biti najmanj 9,5–10 cm, ne glede na to, koliko kartuš želite odmrzniti.
- Pripravite vodno kopel z nadzorovano temperaturo do 25° C.
- Nalepko na vrečki obrnite navzgor in vrečko položite v vodno kopel, ne da bi jo v celoti potopili.



❗ Kartuše ne poskušajte obtežiti za namenom, da bi jo v celoti potopili. Če nalepka na vrečki ni obrnjena navzgor ali pa se kartuša med odmrzovanjem obrne, bo to negativno vplivalo na podatke sekvenciranja.

- Kartuše ne odmrzujte v vodni kopeli več kot 8 ur.
- Ne odmrzujte več kartuš hkrati, kot je primerno za vodno kopel. Za združljive vodne kopeli glejte [Pomožna oprema na strani 28](#).
- Kartuš ne zlagajte ene na drugo.




4. Vzemite kartušo iz vodne kopeli in jo osušite s papirnatimi brisačami.

### Odmrzovanje kartuše v hladilniku

1. Nadenite si nov par nepudranih rokavic.
2. En dan pred načrtovano izvedbo sekvenciranja, prestavite kartušo s temperature  $-25\text{ °C}$  na temperaturo  $-15\text{ °C}$ .
3. Vzemite kartušo iz škatle, vendar **ne odprite srebrne vrečke**.
4. Kartušo položite pri sobni temperaturi tako, da je nalepka obrnjena navzgor in da zrak lahko kroži s strani in od zgoraj.  
 Če nalepka na vrečki ni obrnjena navzgor, bo to negativno vplivalo na podatke sekvenciranja.
5. Odmrzujte pri sobni temperaturi 6 ur.
6. Kartušo prestavite v hladilnik s temperaturo od  $2\text{ °C}$  do  $8\text{ °C}$ , tako da je nalepka obrnjena navzgor in da zrak lahko kroži s strani.  
 Če nalepka na vrečki ni obrnjena navzgor, bo to negativno vplivalo na podatke sekvenciranja.
7. Odmrzujte v hladilniku 12 ur. Ne odmrzujte več kot 72 ur.

### Odmrzovanje kartuše pri sobni temperaturi

1. Nadenite si nov par nepudranih rokavic.
2. Kartušo prestavite s temperature  $-25\text{ °C}$  na temperaturo  $-15\text{ °C}$ .
3. Vzemite kartušo iz škatle, vendar **ne odprite srebrne vrečke**.
4. Kartušo položite tako, da je nalepka obrnjena navzgor in da zrak lahko kroži s strani in od zgoraj.  
 Če nalepka na vrečki ni obrnjena navzgor, bo to negativno vplivalo na podatke sekvenciranja.
5. Odmrzujte pri sobni temperaturi 9 ur. Ne odmrzujte več kot 16 ur.

### Priprava pretočne celice in kartuše

1. Pretočne celice pripravite tako, da upoštevate ta postopek.
  - a. Novo pretočno celico vzemite iz hladilnika, kjer je bila shranjena (pri temperaturi med  $2\text{ °C}$  in  $8\text{ °C}$ ).
  - b. Neodprto embalažo pustite stati na sobni temperaturi približno 10–15 minut, da preprečite kondenzacijo, ko vzamete pretočno celico iz embalaže. Če zdaj pripravite pretočno celico, poskrbite, da se bo pravočasno segrela na sobno temperaturo.
2. Uporaba načina odmrzovanja v hladilniku:
  - a. Odmrznjeno kartušo vzemite iz shrambe s temperaturo od  $2\text{ °C}$  do  $8\text{ °C}$ .

- b. Kartušo v neodprti embalaži pustite stati na sobni temperaturi najmanj 15 minut, preden izvedete sekvenciranje. Ne pustite stati več kot 1 uro.

## Redčenje knjižnic

Če uporabljate denaturiranje in redčenje v instrumentu, s tem korakom razredčite knjižnice do ustrezne koncentracije ob vstavljanju. Izbirno 2-odstotno spajanje kontrolnika PhiX<sup>1</sup> v genom zagotavlja dodatno metriko, raznolikost baze ali pozitivno kontrolo. Odstotek spajanja kontrolnika PhiX v genom morate povečati za knjižnice z nižjo raznolikostjo baze.

Če knjižnice denaturirate in redčite ročno, si oglejte *Navodila za denaturiranje in redčenje knjižnic za sistema NextSeq 1000 in 2000 (dokument št. 1000000139235)*. Ta korak velja le za denaturiranje in redčenje v instrumentu.

### Redčenje knjižnice do koncentracije 2 nM

- [Izbirno] Prestavite 10 nM kontrolnika PhiX s temperature  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  na temperaturo  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Kontrolnik PhiX potrebujete le za izbirno spajanje v genom ali za izvedbo sekvenciranja le s kontrolnikom PhiX.
- [Izbirno] Odmrzujte kontrolnik PhiX pri sobni temperaturi 5 minut in nato izmerite z uporabo fluorescentne metode, kot je Qubit, da potrdite koncentracijo kontrolnika PhiX. Če meritev ni mogoča, nadaljujte s koncentracijo 10 nM.
- Knjižnico ali kontrolnik PhiX na kratko postavite v vrtnični mešalnik, nato pa 1 minuto centrifugirajte pri  $280 \times g$ .
- Ob uporabi RSB-ja s snovjo Tween 20 kot razredčila pripravite najmanj 24  $\mu\text{l}$  knjižnice s koncentracijo 2 nM v mikroepreveti z nizko vezavo. Navodila za spajanje kontrolnika PhiX v genom so na voljo v razdelku [Dodajanje kontrolnika PhiX Control \(izbirno\) na strani 43](#).
- Na kratko postavite v vrtnični mešalnik, nato pa 1 minuto centrifugirajte pri  $280 \times g$ .

### Redčenje knjižnice s koncentracijo 2 nM do koncentracije ob vstavljanju

- Kombinirajte te volumne v mikroepreveti z nizko vezavo in pripravite 24  $\mu\text{l}$  knjižnice, razredčene do ustrezne koncentracije pri vstavljanju:

Vrsta knjižnice*	Koncentracija ob vstavljanju (pM)	Volumen knjižnice s koncentracijo 2 nM ( $\mu\text{l}$ )	Volumen RSB-ja s snovjo Tween 20 ( $\mu\text{l}$ )
AmpliSeq for Illumina Library PLUS	750	9	15

<sup>1</sup>PhiX je majhna knjižnica družbe Illumina, pripravljena za uporabo, z reprezentacijo uravnoteženega nukleotida.

Vrsta knjižnice*	Koncentracija ob vstavljanju (pM)	Volumen knjižnice s koncentracijo 2 nM (μl)	Volumen RSB-ja s snovjo Tween 20 (μl)
Illumina DNA Prep	750	9	15
Illumina DNA Prep with Enrichment	1000	12	12
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750	9	15
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA PCR-Free	1000	12	12
TruSeq DNA Nano 350	1200	14,4	9,6
TruSeq DNA Nano 550	1500	18	6
TruSeq Stranded mRNA	1000	12	12
100 % PhiX	650	7,8	16,2

\* Če imate nenavedene vrste knjižnic, začnite s koncentracijo ob vstavljanju 650 pM in jo optimizirajte v nadaljnjih izvajanjih sekvenciranja

V tej tabeli so navedene vzorčne koncentracije ob vstavljanju. Sistem NextSeq 1000/2000 je združljiv z vsemi paketi za pripravo knjižnic družbe Illumina, vendar se optimalna koncentracija ob vstavljanju lahko razlikuje.

- Na kratko postavite v vrtnični mešalnik, nato pa 1 minuto centrifugirajte pri 280 × g.
- Razredčeno knjižnico postavite na stran na led, dokler ni pripravljena za sekvenciranje. Razredčene knjižnice sekvencirajte do koncentracije ob vstavljanju istega dne, ko je bila razredčena.
- Nadaljujte, kot je opisano v nadaljevanju.
  - Če želite dodati PhiX, glejte poglavje [Dodajanje kontrolnika PhiX Control \(izbirno\) na strani 43](#).
  - Če kontrolnika PhiX ne želite dodati ali če izvajate sekvenciranje le s kontrolnikom PhiX, glejte poglavje [Vstavljanje potrošnega materiala v kartušo na strani 44](#).

### Dodajanje kontrolnika PhiX Control (izbirno)

- V mikroepreveti z nizko vezavo kombinirajte te volumne in pripravite 20 μl kontrolnika PhiX s koncentracijo 1 nM:
  - Kontrolnik PhiX (2 μl) s koncentracijo 10 nM
  - RSB s snovjo Tween 20 (18 μl)

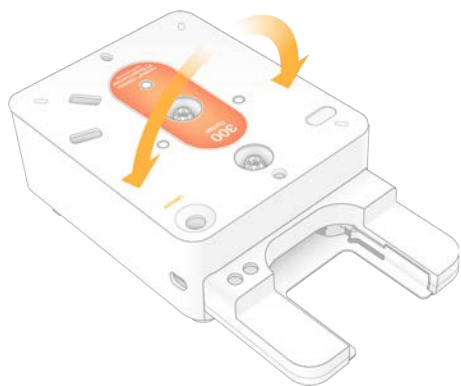
2. Na kratko postavite v vrtilni mešalnik, nato pa 1 minuto centrifugirajte pri  $280 \times g$ .
3. Dodajte 1  $\mu\text{l}$  kontrolnika PhiX s koncentracijo 1 nM v 24  $\mu\text{l}$  knjižnice, razredčene do končne koncentracije ob vstavljanju.  
S temi volumni dobite pribl. 2-odstotno spajanje kontrolnika PhiX v genom. Dejanski odstotek je odvisen od kakovosti in obsega knjižnice.
4. Knjižnico s spajanjem kontrolnika PhiX v genom postavite na stran na led, dokler ni pripravljena za sekvenciranje.  
Knjižnice s spajanjem kontrolnika PhiX v genom morate sekvencirati isti dan, kot so bile razredčene.

## Vstavljanje potrošnega materiala v kartušo

V tem koraku pripravite kartušo na postopek sekvenciranja tako, da zmešate vnaprej napolnjene reagente ter vstavite razredčene knjižnice in pretočno celico.

### Priprava kartuše

1. Odprite vrečko s kartušo tako, da jo raztrgate ali prerežete s škariami na vrhu na obeh straneh, kjer vso zareze.
2. Vzemite kartušo iz vrečke. Zavrzite vrečko in sušilo.
3. Kartušo 10-krat obrnite, da se reagenti premešajo.  
Med obračanjem boste morda slišali notranje komponente, kar je normalno.



### Vstavljanje pretočne celice

1. Odprite srebrno vrečko tako, da jo raztrgate ali prerežete s škariami na vrhu na obeh straneh, kjer so zareze.  
Če pretočne celice ne morete uporabiti takoj, glejte [Ponovno shranjevanje potrošnega materiala na strani 81](#).

2. Povlecite pretočno celico iz embalaže.

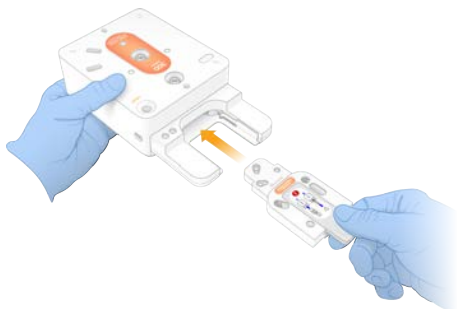
Srebrno vrečko in sušilo odložite na stran za primer morebitnega ponovnega shranjevanja pretočne celice. Sušilo se nahaja v mošnjičku na dnu srebrne vrečke. Oboje zavržite, ko se začnete izvajati postopek sekvenciranja.



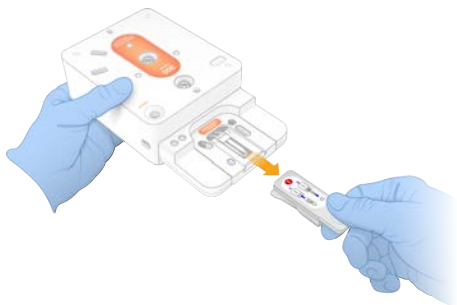
3. Pretočno celico držite za sivo držalo, pri tem naj bo nalepka na držalu obrnjena navzgor.

4. Pretočno celico vstavite v režo na sprednji strani kartuše.

Ko zaslišite klik, je pretočna celica na svojem mestu. Če je pretočna celica pravilno vstavljena, sivo držalo gleda ven iz kartuše.



5. Povlecite sivo držalo in ga odstranite, da razkrijete pretočno celico. Reciklirajte držalo.



## Vstavljanje knjižnic

1. S konico nove pipete P1000 preluknjajte rezervoar knjižnice in potisnite folijo proti robu, da povečate odprtino.
2. Zavržite konico pipete, da preprečite kontaminacijo.

3. Dodajte 20 µl razredčene knjižnice na *dno* rezervoarja tako, da konico pipete počasi približate dnu rezervoarja, preden dodate knjižnico. Pri tem se ne dotikajte folije.




## Začetek izvedbe sekvenciranja

S tem korakom začnete izvedbo sekvenciranja v enem od štirih načinov:

- **Način v oblaku** – Izvedba je izbrana na seznamu načrtovanih izvedb v programski opremi za nadzor NextSeq 1000/2000. Med sekvenciranjem so podatki cBCL preneseni v središče BaseSpace Sequence Hub. Po dokončanem sekvenciranju se aplikacija DRAGEN samodejno zažene v središču BaseSpace Sequence Hub.
- **Hibridni način** – Izvedba je izbrana na seznamu načrtovanih izvedb v programski opremi za nadzor NextSeq 1000/2000. Po dokončanem sekvenciranju se analiza v instrumentu samodejno zažene. Podatki cBCL in datoteke z odčitki sekundarne analize v aplikaciji DRAGEN so shranjeni v izbrani mapi z odčitki.
- **Lokalni način** – Vzorčni list v obliki zapisa datoteke v2 je ročno uvožen v programsko opremo za nadzor NextSeq 1000/2000. Po dokončanem sekvenciranju se analiza v instrumentu samodejno zažene. Podatki cBCL in datoteke z odčitki sekundarne analize v aplikaciji DRAGEN so shranjeni v izbrani mapi z odčitki. Če izberete možnost »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe), lahko analizo zaženete tudi v aplikaciji BaseSpace Sequence Hub po dokončanju sekvenciranja.
- **Samostojni način** – Nastavite izvedbo v skladu z navodili v programski opremi za nadzor NextSeq 1000/2000, da ustvarite podatke cBCL.




Če odpirate vizir med preverjanjem pred izvedbo ali med samo izvedbo sekvenciranja, izvedba morda ne bo uspela.

-  Rok ne približujte instrumentu med odpiranjem in zapisanjem vizirja, da preprečite morebitne poškodbe.

## Začetek izvedbe v načinu v oblaku ali hibridnem načinu

1. Konfigurirajte način izvedbe, kot je opisano v razdelku [Konfiguracija načina izvedbe na strani 20](#).
2. Izberite **Start** (Začetek).
3. Vnesite poverilnice za vpis v središče BaseSpace Sequence in izberite **Sign In** (Vpis).
4. Če izberete »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe), izberite delovno skupino, ki vključuje izvedbo, ustvarjeno v funkciji Instrument Run Setup v središču BaseSpace Sequence Hub.

-  Če želite preprečiti napake, morate izbrati delovno skupino. Preden nadaljujete, se prepričajte, da ste izbrali delovno skupino.

5. Izberite **Next** (Naprej).
6. Izberite izvedbo.
7. Prepričajte se, da se parametri »Analysis« (Analiza), »Run Length« (Dolžina izvedbe) in »Secondary Analysis« (Sekundarna analiza) ujemajo z ustrezno izvedbo.  
V analizi je prikazan element »Cloud\_ to«, kar označuje, da je analiza izvedena v središču BaseSpace Sequence Hub.
8. Izberite **Review** (Preglej).
9. **[Izbirno]** Vnesite lokacije prilagojenega začetnika za odčitavanje in prilagojenega začetnika za indeksiranje.  
Za informacije o pripravi in dodajanju prilagojenih začetnikov glejte *Navodila za uporabo prilagojenih začetnikov za sistema NextSeq 1000 in 2000 (dokument št. 1000000139569)*. Oglejte si tudi stran z združljivimi izdelki za komplet za pripravo knjižnic, kjer lahko preverite, ali so zahtevani prilagojeni začetniki družbe Illumina.
10. **[Izbirno]** Izberite recept po meri. Za več informacij glejte [Sekvenciranje temnega cikla na strani 99](#). Če uporabljate programsko opremo za nadzor NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 in komplet Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus ali komplet Illumina Stranded mRNA Prep, je recept po meri samodejno izbran.
11. **[Izbirno]** Če želite ročno denaturirati in redčiti knjižnice, prekličite izbiro potrditvenega polja **Denature and Dilute On Board** (Denaturiranje in redčenje v instrumentu). Glejte navodila za denaturiranje in redčenje knjižnic za sistema *NextSeq 1000 in 2000 (dokument št. 1000000139235)*. Privzeti izbor je konfiguriran v nastavitvah programske opreme za nadzor NextSeq 1000/2000.
12. **[Izbirno]** Če želite spremeniti mapo z odčitki, izberite polje »Output Folder« (Mapa z odčitki) in vnesite novo lokacijo.  
Polje »Output Folder« (Mapa z odčitki) je samodejno izpolnjeno v privzetih nastavitvah in je zahtevano, razen če je izbrana možnost **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe).


Če ste izbrali možnost »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe), je v razdelku »Save to BaseSpace Sequence Hub« (Shrani v BaseSpace Sequence Hub) prikazan način »Enabled« (Omogočeno).

Če ste izbrali možnost »Proactive and Run Monitoring« (Proaktivno in nadzor izvedbe), je v razdelku »Save to BaseSpace Sequence Hub« (Shrani v BaseSpace Sequence Hub) prikazan način »Disabled« (Onemogočeno).

13. Preglejte podatke izvedbe in izberite **Prep** (Priprava).

## Začetek izvedbe v lokalnem načinu


1. Konfigurirajte način izvedbe, kot je opisano v razdelku [Konfiguracija načina izvedbe na strani 20](#).
2. Izberite **Start** (Začetek).
3. Če ste izbrali možnost »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe) ali »Proactive and Run Monitoring« (Proaktivno in nadzor izvedbe), vnesite poverilnice za vpis v središče BaseSpace Sequence Hub, nato pa izberite **Sign In** (Vpis).
4. Če ste izbrali »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe), izberite delovno skupino v središču BaseSpace Sequence Hub, kamor želite shraniti izvedbo sekvenciranja, nato pa izberite **Next** (Naprej).

 Če želite preprečiti napake, morate izbrati delovno skupino. Preden nadaljujete, se prepričajte, da ste izbrali delovno skupino.

5. Izberite **Choose...** (Izberi ...) v razdelku »Start With Sample Sheet« (Začni z vzorčnim listom) in se pomaknite do vzorčnega lista v obliki zapisa v2 v instrumentu NextSeq 1000/2000, prenosnem pogonu in vpetem omrežnem pogonu. Imena datotek vzorčnega lista ne smejo vključevati posebnih znakov.

Programska oprema NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 samodejno zazna različico aplikacije DRAGEN v vzorčnem listu in vas po potrebi pozove k zamenjavi različice. Različica aplikacije DRAGEN mora biti nameščena v sistemu. Informacije o namestitvi so na voljo v poglavju [Posodobitve programske opreme na strani 74](#).

- **Uporabljen je funkcija Instrument Run Setup** – Izberite mapo .zip, ki vsebuje vzorčni list v2 in podporne datoteke (če so na voljo). V nasprotnem primeru izberite vzorčni list v2.
- **Ni uporabljena funkcija Instrument Run Setup** – Prepričajte se, da je podpora datoteka sekundarne analize v istem imeniku kot vzorčni list v2.

 Izbrani vzorčni list mora imeti obliko zapisa v2. Če želite ustvariti vzorčni list v2, prenesite ustvarjeni vzorčni list v funkciji Instrument Run Setup v središču BaseSpace Sequence Hub ali pa uredite predlogo vzorčnega lista v2, ki je na voljo na strani s podporo za NextSeq 1000/2000. Več informacij o vzorčnem listu v obliki zapisa v2 in zahtevah je na voljo v poglavju [Nastavitve za vzorčni list v2 na strani 86](#). Zagotovite, da so vse referenčne datoteke vzorčnega lista shranjene v isti mapi kot vzorčni list.



6. Izberite **Review** (Preglej).
7. **[Izbirno]** Vnesite lokacije prilagojenega začetnika za odčitavanje in prilagojenega začetnika za indeksiranje.  
Za informacije o pripravi in dodajanju prilagojenih začetnikov glejte *Navodila za uporabo prilagojenih začetnikov za sistema NextSeq 1000 in 2000 (dokument št. 1000000139569)*. Oglejte si tudi stran z združljivimi izdelki za komplet za pripravo knjižnic, kjer lahko preverite, ali so zahtevani prilagojeni začetniki družbe Illumina.
8. **[Izbirno]** Izberite recept po meri. Za več informacij glejte [Sekvenciranje temnega cikla na strani 99](#). Če uporabljate programsko opremo za nadzor NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 in komplet Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus ali komplet Illumina Stranded mRNA Prep, je recept po meri samodejno izbran.
9. **[Izbirno]** Če želite ročno denaturirati in redčiti knjižnice, prekličite izbiro potrditvenega polja **Denature and Dilute On Board** (Denaturiranje in redčenje v instrumentu). Glejte navodila za denaturiranje in redčenje knjižnic za sistema *NextSeq 1000 in 2000 (dokument št. 1000000139235)*. Privzeti izbor je konfiguriran v nastavitvah programske opreme za nadzor NextSeq 1000/2000.
10. **[Izbirno]** Če želite spremeniti mapo z odčitki, izberite polje »Output Folder« (Mapa z odčitki) in vnesite novo lokacijo.  
Polje »Output Folder« (Mapa z odčitki) je samodejno izpolnjeno v privzetih nastavitvah in je zahtevano, razen če je izbrana možnost »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe).  
Če ste izbrali možnost »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe), je v razdelku »Save to BaseSpace Sequence Hub« (Shrani v BaseSpace Sequence Hub) prikazan način »Enabled« (Omogočeno).  
Če ste izbrali možnost »Proactive and Run Monitoring« (Proaktivno in nadzor izvedbe), je v razdelku »Save to BaseSpace Sequence Hub« (Shrani v BaseSpace Sequence Hub) prikazan način »Disabled« (Onemogočeno).
11. Preglejte podatke izvedbe in izberite **Prep** (Priprava).

## Začetek izvedbe v samostojnem načinu

1. Konfigurirajte način izvedbe, kot je opisano v razdelku [Konfiguracija načina izvedbe na strani 20](#).
2. Izberite **Start** (Začetek).
3. Če ste izbrali možnost »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe) ali »Proactive and Run Monitoring« (Proaktivno in nadzor izvedbe), vnesite poverilnice za vpis v središče BaseSpace Sequence Hub, nato pa izberite **Sign In** (Vpis).
4. Če ste izbrali »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe), izberite delovno skupino v središču BaseSpace Sequence Hub, kamor želite shraniti izvedbo sekvenciranja, nato pa izberite **Next** (Naprej).
5. Izberite **Set Up New Run** (Nastavi novo izvedbo).

6. V polje »Run Name« (Ime izvedbe) vnesite enolično ime po lastnem izboru, da poimenujete trenutno izvedbo.

Ime izvedbe lahko vključuje alfanumerične znake, črtice, vezaje in podčrtaje.

7. Za »Read Type« (Vrsta odčitavanja) izberite število odčitavanj v okviru sekvenciranja, ki jih želite izvesti:

- **Single Read** (Eno odčitavanje) – izvede eno odčitavanje, kar je enostavnejša in hitrejša možnost.
- **Paired End** (Odčitavanje v paru) – izvede dve odčitavanji, s čimer se zagotovijo podatki višje kakovosti in natančnejša uskladitev.

8. Vnesite število ciklov, izvedenih v vsakem posameznem postopku odčitavanja:

Največje število ciklov indeksiranja ni določeno, vendar skupno število ciklov odčitavanja in indeksiranja ne sme presegati števila ciklov, označenih na oznaki kartuše plus 27.

**Read 1** (Odčitavanje 1) – vnesite **1–151** ciklov.

**Index 1** (Indeks 1) – vnesite število ciklov za začetnika za »Index 1« (Indeks 1) (i7). Za izvajanje sekvenciranja le z enim kontrolnikom PhiX vnesite **0** v obe polji za indeks.

**Index 2** (Indeks 2) – vnesite število ciklov za začetnika za »Index 2« (Indeks 2) (i5).

**Read 2** (Odčitavanje 2) – vnesite do **151** ciklov. Ta vrednost je običajno enaka kot vrednost za »Read 1« (Odčitavanje 1).

9. Če ste izbrali možnost »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe), izberite **Choose...** (Izberi ...), da uvozite vzorčni list.

Programska oprema NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 samodejno zazna različico aplikacije DRAGEN v vzorčnem listu in vas po potrebi pozove k zamenjavi različice. Različica aplikacije DRAGEN mora biti nameščena v sistemu. Informacije o namestitvi so na voljo v poglavju [Posodobitve programske opreme na strani 74](#).

**i** | Izbrani vzorčni list mora imeti obliko zapisa v2. Če želite ustvariti vzorčni list v2, prenesite ustvarjeni vzorčni list v funkciji Instrument Run Setup v središču BaseSpace Sequence Hub ali pa uredite predlogo vzorčnega lista v2, ki je na voljo na strani s podporo za NextSeq 1000/2000. Več informacij o vzorčnem listu v obliki zapisa v2 in zahtevah je na voljo v poglavju [Nastavitve za vzorčni list v2 na strani 86](#). Zagotovite, da so vse referenčne datoteke vzorčnega lista shranjene v isti mapi kot vzorčni list.

10. **[Izbirno]** Vnesite lokacije prilagojenega začetnika za odčitavanje in prilagojenega začetnika za indeksiranje.

Za informacije o pripravi in dodajanju prilagojenih začetnikov glejte *Navodila za uporabo prilagojenih začetnikov za sistema NextSeq 1000 in 2000 (dokument št. 1000000139569)*. Oglejte si tudi stran z združljivimi izdelki za komplet za pripravo knjižnic, kjer lahko preverite, ali so zahtevani prilagojeni začetniki družbe Illumina.

11. **[Izbirno]** Izberite recept po meri. Za več informacij glejte [Sekvenciranje temnega cikla na strani 99](#)

12. **[Izbirno]** Če želite ročno denaturirati in redčiti knjižnice, prekličite izbiro potrditvenega polja **Denature and Dilute On Board** (Denaturiranje in redčenje v instrumentu). Glejte navodila za denaturiranje in redčenje knjižnic za sistema *NextSeq 1000 in 2000 (dokument št. 1000000139235)*. Privzeti izbor je konfiguriran v nastavitvah programske opreme za nadzor NextSeq 1000/2000.
13. **[Izbirno]** Če želite spremeniti mapo z odčitki, izberite polje »Output Folder« (Mapa z odčitki) in vnesite novo lokacijo.  
Polje »Output Folder« (Mapa z odčitki) je samodejno izpolnjeno v privzetih nastavitvah in je zahtevano, razen če je izbrana možnost »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe).
14. Izberite **Prep** (Priprava).

### Vstavljanje potrošnega materiala v instrument

1. Zagotovite, da kartušo predhodno odtajate in obrnete 10-krat, da premešate reagente, preden vstavite pretočno celico (odstranite sivo držalo) in razredčite knjižnico.
2. Izberite **Load** (Vstavi).  
Programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000 odpre vizir in izvrže pladenj.
3. Postavite kartušo na pladenj tako, da je oznaka obrnjena navzgor in je pretočna celica znotraj instrumenta. Potisnite kartušo, dokler se ne zaskoči.



4. Izberite **Close** (Zapri), da instrument povleče kartušo in zapre vizir.  
V programski opremi za nadzor NextSeq 1000/2000 se po pribl. 3 minutah prikažejo informacije o pregledanem potrošnem materialu.
5. **[Izbirno]** Izberite **Eject Cartridge** (Izvrzi kartušo), da odstranite kartušo.  
Vizir se odpre po 1 minuti in izvrže kartušo.
6. Izberite **Sequence** (Sekvenca).

## Postopki preverjanja pred izvedbo sekvenciranja

Preverjanja pred izvedbo sekvenciranja vključujejo preverjanje instrumenta, ki mu sledi preverjanje tekočin. Pri preverjanju tekočin instrument preluknja pečate na kartuši, tako da se slišijo 3–4 poki v instrumentu. To je pričakovani postopek. Pri tem reagent potuje skozi pretočno celico.

**!** | Potrošnega materiala ne smete znova uporabiti, ko začnete postopek preverjanja tekočin.

1. Preverjanja pred izvedbo sekvenciranja potekajo približno 15 minut.  
Ko so postopki uspešno zaključeni, se izvedba sekvenciranja samodejno začne.
2. Če pride do napake med preverjanjem instrumenta, izberite **Retry** (Poskusi znova), da ponovite preverjanje.  
Ko poteka preverjanje, je v njegovem krogu prikazana animacija.
3. Za odpravljanje ponavljajočih se napak glejte [Odpravljanje sporočil o napakah na strani 80](#).

## Nadzorovanje napredka izvedbe

1. Napredek in metriko izvedbe lahko spremljate, ko se prikaže na zaslonu za sekvenciranje.
  - **Estimated run completion** (Ocenjen konec izvedbe) – približen datum in čas, ko se bo izvedba dokončala. Če želite izračunati natančen čas konca izvedbe, metrika ocenjenega konca izvedbe zahteva 10 predhodnih izvedb.
  - **Average %Q30** (Povprečen %Q30) – povprečen odstotek dodelitev baze z oceno kakovosti  $\geq 30$ .
  - **Projected Yield** (Projiciran donos) – pričakovano število baz, ki so dodeljene za izvedbo.
  - **Total Reads PF** (Skupna odčitavanja PF) – število uspešno filtriranih gruč (če so na voljo) v paru (v milijonih).
  - **Real Time Demux** (Demultipleksiranje v realnem času) – stanje demultipleksiranja, ko je to inicializirano na začetku postopka za »Read 2« (Odčitavanje 2) po dokončanju ciklov za »Read 1« (Odčitavanje 1), »Index 1« (Indeks 1) in »Index 2« (Indeks 2). Prikazano je stanje »Complete« (Dokončano), tudi če cikli indeksiranja niso izvedeni. Ni na voljo za izvedbe sekvenciranja v načinu v oblaku.
  - **Real Time Demux** (Usklajevanje v realnem času) – stanje usklajevanja za »Read 1« (Odčitavanje 1), ko je to inicializirano na začetku postopka za »Read 2« (Odčitavanje 2), ko so dokončani cikli za »Read 1« (Odčitavanje 1), »Index 1« (Indeks 1) in »Index 2« (Indeks 2). Ni na voljo za izvedbe sekvenciranja v načinu v oblaku.

Q30 in metrika donosa se prikažeta po 26. ciklu (pribl. 6 ur po začetku izvedbe).
2. Če želite spremljati posamezne postopke izvedb, izberite meni programske opreme za nadzor, nato pa izberite **Process Management** (Upravljanje postopka).
3. Če želite preklicati izvedbo, izberite **End Run** (Končaj izvedbo). Za več informacij o preklicu izvedb sekvenciranja glejte poglavje [Preklic izvedbe sekvenciranja na strani 81](#).

4. Odstranite potrošni material iz instrumenta. Kartušo morate odstraniti iz instrumenta v roku treh dni.

## Odstranjevanje potrošnega materiala

1. Ko je sekvenciranje dokončano, izberite **Eject Cartridge** (Izvrzi kartušo). Programska oprema iz instrumenta izvrže uporabljeno kartušo.
2. Odstranite kartušo s pladnja.
3. Vzemite pretočno celico iz kartuše.
4. Pretočno celico, ki vključuje elektronske sestavne dele, zavržite v skladu z veljavnimi standardi, ki veljajo v vaši regiji.
5. [Izbirno] Odstranite odtočni čep pod logotipom družbe Illumina ob strani kartuše na ustreznem mestu (npr. nad umivalnikom ali posodo za odlaganje nevarnih snovi) tako, da je čep usmerjen vodoravno ali navzdol, stran od vašega obraza. Odstranite uporabljene reagente v skladu z veljavnimi standardi, ki veljajo v vaši regiji. Če samodejno odstranjevanje reagenta ni omogočeno, je čas odstranjevanja reagentov odvisen od velikosti kartuše.

**!** Ta nabor reagentov vsebuje kemikalije, ki so lahko nevarne. Do telesnih poškodb lahko pride zaradi vdihavanja, zaužitja, stika s kožo in z očmi. Uporabljajte zaščitno opremo, vključno z zaščito za oči, rokavicami in laboratorijsko haljo, glede na tveganje izpostavljenosti. Uporabljene reagente obravnavajte kot kemične odpadke in jih zavržite v skladu z veljavnimi regijskimi, nacionalnimi in lokalnimi zakoni in uredbami. Za dodatne informacije o varovanju okolja in zdravja ter zagotavljanju varnosti glejte »SDS« na spletnem mestu [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

6. Zavržite kartušo z reagentom. Izpiranje po sekvenciranju ni potrebno, saj tekočine odstranite skupaj s kartušo.
7. Izberite **Close Door** (Zapri vrata), da znova naložite pladenj in se vrnete na začetni zaslon. Programska oprema samodejno znova zapre pladenj in senzorji potrdijo odstranitev kartuše.

## Čiščenje pladnja za kartušo

Pladenj za kartušo morate očistite le v primeru puščanja reagenta na pladenj s kartušo.

1. Odstranite kartušo iz instrumenta.
2. Nadenite si nov par nepudranih rokavic in morebitno drugo zaščitno opremo.
3. Na krpo razpršite 10-odstotno raztopino belila.
4. Pladenj za kartušo očistite s krpo, nato pa takoj obrišite raztopino belila s čistilno krpo. Če belila ne odstranite takoj, lahko ta pusti madeže na kartuši.
5. Na pladenj za kartušo razpršite 70-odstotno raztopino etanola in takoj očistite s čistilno krpo.
6. Pladenj za kartušo vstavite nazaj v položaj za vstavljanje.

# Odčitek sekvenciranja

V tem poglavju je opisana programska oprema za analizo v realnem času, s katero lahko dodelite bazo in ocene kakovosti ter pridobite odčitke podatkov. Preberite več o različnih vrstah datotek z odčitki ter o tem, kje so te datoteke shranjene po dokončani izvedbi sekvenciranja.

## Pregled analize v realnem času

Programska oprema Real-Time Analysis (analiza v realnem času) oziroma RTA3 v sistemih za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000 se izvaja v mehanizmu Compute Engine (CE) v instrumentu. RTA3 izračuna jakost na podlagi slik, pridobljenih iz kamere, dodeli bazo, dodeli oceno kakovosti dodelitvam baze, izvede uskladitev s kontrolnikom PhiX in posreduje podatke v datoteke InterOp, kjer so na voljo za prikaz v programski opremi za nadzor v instrumentu.

Za optimiziranje časa obdelave RTA3 shrani informacije v pomnilnik. Če RTA3 onemogočite, se postopek obdelave ne nadaljuje in morebitni podatki izvedbe sekvenciranja, za katere poteka obdelava v pomnilniku, so izgubljeni.

### Vneseni elementi v programski opremi RTA3

Za izvajanje obdelave programska oprema RTA3 zahteva ploščice slik v lokalnem pomnilniku sistema. RTA3 prejme informacije o izvedbi in ukaze od programske opreme za nadzor.

### Ustvarjeni elementi v programski opremi RTA3

Slike posameznega barvnega kanala so posredovane v pomnilnik v RTA3 kot ploščice. Iz teh slik RTA3 ustvari nabor datotek za dodelitev baze z oceno kakovosti in datotek s filtri. Vsi drugi ustvarjeni elementi so podporne datoteke z odčitki.

Vrsta datoteke	Opis
Datoteke za dodelitev baze	Vsaka analizirana ploščica je shranjena v datoteki z združeno dodelitvijo baze (*.cbcl). Ploščice iz istega pasu in površine so združene v eno datoteko 1 *.cbcl za posamezen pas in površino.
Datoteke s filtri	Vsaka ploščica ustvari datoteko s filtri (*.filter), kjer je določeno, ali so bile gruče uspešno filtrirane.
Datoteke z mesti gruč	Datoteke z mesti gruč (*.locs) vključujejo koordinati X in Y za posamezno gručo na ploščici. Datoteka z mesti gruč je ustvarjena za vsako izvedbo sekvenciranja.

Datoteke z odčitki so uporabljene za analizo iz strežnika v aplikaciji DRAGEN in središču BaseSpace Sequence Hub.

## Ravnanje v primeru napak

RTA3 ustvari dnevniške datoteke in jih zapiše v mapo Logs. Napake so zabeležene v besedilno datoteko v obliki zapisa \*.log.

Te dnevniške datoteke so na koncu obdelave prenesene do ciljnega mesta z odčitki:

info\_00000.log – vključuje povzetek pomembnih dogodkov izvedbe.

error\_00000.log – vključuje seznam napak, do katerih je prišlo med izvedbo.

warning\_00000.log – vključuje seznam opozoril, sproženih med izvedbo.

## Ploščice pretočne celice

Ploščice so majhna slikovna območja na pretočni celici. Kamera ustvari eno sliko na ploščico.

Pretočna celica NextSeq 1000/2000 P2 ima skupaj 132 ploščic. Pretočna celica NextSeq 1000/2000 P3 ima skupaj 264 ploščic.

Tabela 5 Ploščice pretočne celice

Sestavni deli pretočne celice	Pretočna celica NextSeq 1000/2000 P2	Pretočna celica NextSeq 1000/2000 P3	Opis
Pasovi	1	2	Pasovi so optično različni, vendar niso tekočinsko ločeni kanali.
Površine	2	2	Pretočni celici P2 in P3 sta preslikani na dve površini: zgornjo in spodnjo. Najprej je ustvarjena slika zgornje površine ploščice.
Proge na pas	6	6	Proga je stolpec na pasu pretočne celice.
Ploščice na progo	11	11	Ploščica je del proge in predstavlja slikovno območje na pretočni celici.
Skupno število ustvarjenih ploščic	132	264	$\text{Pasovi} \times \text{površine} \times \text{proge} \times \text{ploščice na progo} = \text{skupno število ploščic}$ .

## Poimenovanje ploščic

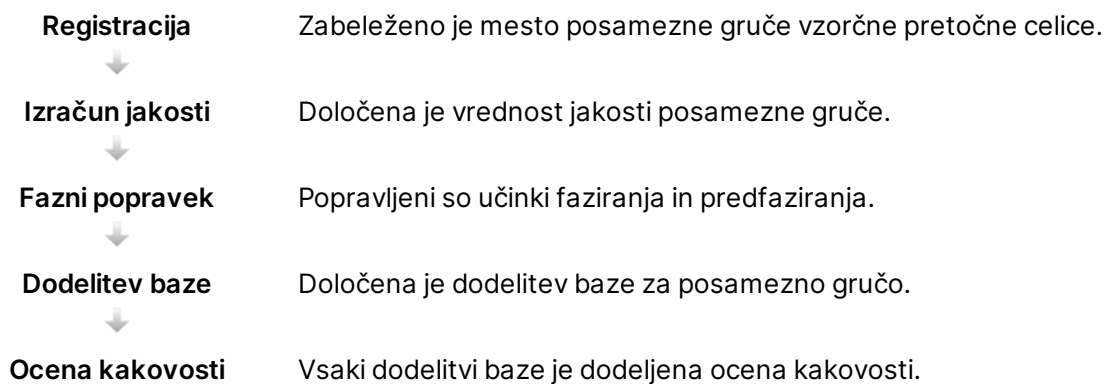
Ime ploščice je številka, sestavljena iz štirih števk, ki predstavlja mesto ploščice na pretočni celici. Ime ploščice 1205 na primer označuje zgornjo površino, progo 2, ploščico 05.

Prva številka predstavlja površino: 1 za zgornjo in 2 za spodnjo površino.

Druga številka predstavlja številko proge: 1, 2, 3, 4, 5 ali 6.

Zadnji dve števki predstavljata številko ploščice. Za številke prog 1–4 se oštevilčenje začne z 01 na izhodnem delu pretočne celice in nadaljuje do 11 na vhodnem delu. Za številke prog 5–6 se oštevilčenje začne z 01 na vhodnem delu pretočne celice in nadaljuje do 11 na izhodnem delu.

## Potek analize v realnem času



### Registracija

Registracija poravnava sliko z zasukanim kvadratnim poljem nano vdolbinic na vzorčni pretočni celici. Zaradi urejene razporeditve nano vdolbinic sta koordinati X in Y za vsako gručo na ploščici vnaprej določeni. Položaji gruč so zabeleženi v datoteko z mesti gruč (s.locs) za posamezno izvedbo.

Če registracije ni mogoče izvesti za katero koli sliko v ciklu, ni ustvarjena nobena dodelitev baze za to ploščico v tem ciklu. Uporabite Sequencing Analysis Viewer, da določite, za katere slike registracija ni bila uspešna.

### Izračun jakosti

Ko je registracija dokončana, je z izračunom jakosti pridobljena vrednost jakosti za vsako posamezno nano vdolbinico na določeni sliki. Če registracija ni uspela, jakosti za to ploščico ni mogoče pridobiti.

### Fazni popravek

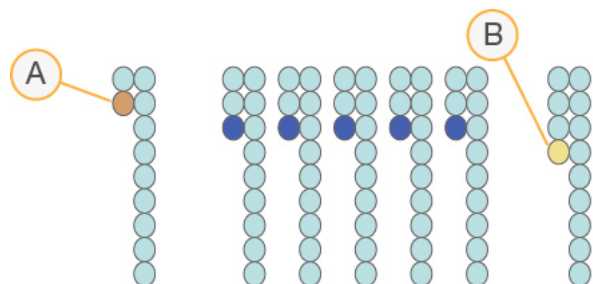
Med reakcijo sekvenciranja se vsaka veriga DNK v gruči razširi za eno bazo v vsakem ciklu. Do faziranja in predfaziranja pride, ko veriga ni več skladna s fazo trenutnega cikla sestavljanja.

Do faziranja pride, ko baza zaostaja.



Do predfaziranja pride, ko baza prehiteva.

Slika 5 Faziranje in predfaziranje



- A. Odčitek z bazo, za katero poteka faziranje.
- B. Odčitek z bazo, za katero poteka predfaziranje.

RTA3 popravi učinke faziranja in predfaziranja, pri čemer se maksimira kakovost podatkov v vsakem ciklu med izvedbo sekvenciranja.

## Dodelitev baze

Z dodelitvijo baze se določi baza (A, C, G ali T) za vsako gručo določene ploščice v določenem ciklu. Sistema za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000 uporabljata dvokanalno sekvenciranje, kjer sta za kodiranje podatkov za štiri baze DNK potrebni le dve sliki – ena iz zelenega kanala in ena iz modrega kanala.

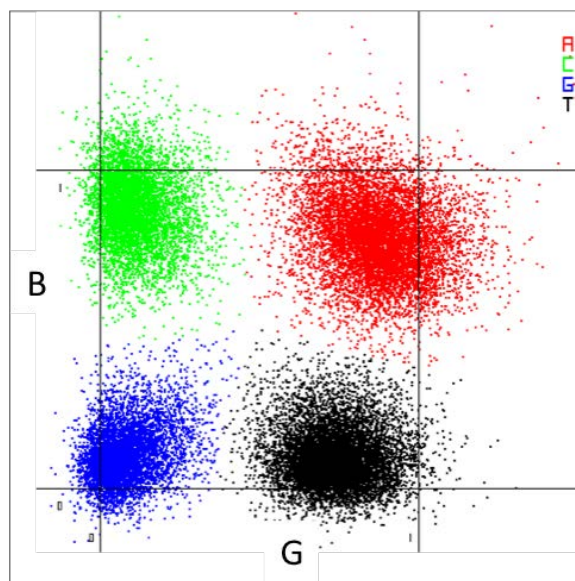
Če ni na voljo nobene dodelitve, je to označeno kot »N«. Do stanja brez dodelitve pride, če gruča ni uspešno filtrirana, registracija ni uspešno izvedena ali pa gruča ni zajeta na sliki.

Jakosti za posamezne gruče so pridobljene iz zelenih in modrih slik ter medsebojno primerjane. Rezultat tega postopka so štiri različne populacije. Vsaka populacija ustreza bazi. Postopek dodelitve baze določa, kateri populaciji pripada posamezna gruča.

Tabela 6 Dodelitve baze v dvokanalnem sekvenciranju

Baza	Zeleni kanal	Modri kanal	Rezultat
A	1 (na voljo)	1 (na voljo)	Gruče s prikazom jakosti v zelenih in modrih kanalih.
C	0 (ni na voljo)	1 (na voljo)	Gruče s prikazom jakosti samo v modrem kanalu.
G	0 (ni na voljo)	0 (ni na voljo)	Gruče brez prikaza jakosti na znanem mestu gruč.
T	1 (na voljo)	0 (ni na voljo)	Gruče s prikazom jakosti samo v zelenem kanalu.

Slika 6 Vizualizacija jakosti gruče



**i** Barva posamezne gruče ustreza grafom za »%Base« (% baze) v orodju Sequence Analysis Viewer (SAV) in parametru »Data by Cycle« (Podatki o izvedbi po ciklu) v središču BaseSpace Sequence Hub, ni pa povezana z zelenim in modrim kanalom.

## Gruče, ki so uspešno filtrirane

Med izvedbo sekvenciranja RTA3 filtrira neobdelane podatke, da odstrani odčitke, ki ne izpolnjujejo praga kakovosti podatkov. Gruče, ki se prekrivajo, in tiste slabe kakovosti, so odstranjene.

Za dvokanalno analizo RTA3 uporablja sistem, ki temelji na populaciji, da določi čistost (meritev čistosti intenzitete) dodelitve baze. Filtriranje gruč je uspešno (PF), ko ima čistost pod pragom kakovosti v prvih 25 ciklih nič več kot ena dodelitev baze. Če je vključeno, se izvede usklajevanje s kontrolnikom PhiX v 26. ciklu za podniz ploščic, in sicer za gruče, ki so bile uspešno filtrirane. Gruče, ki niso bile uspešno filtrirane, niso dodeljene bazi in usklajene.

## Ocene kakovosti

Ocena kakovosti (Q-score) je predvidena verjetnost, da ne bo dodeljena pravilna baza. Višja ocena kakovosti pomeni višjo kakovost dodelitve baze, kar pomeni, da je večja verjetnost, da je baza pravilno dodeljena. Ko je določena ocena kakovosti, se rezultati zabeležijo v datoteke za dodelitev baze (\*.cbcl).

Z oceno kakovosti sistem sporoči verjetnost majhnih napak. Ocene kakovosti so prikazane »Q(X)«, pri čemer je X ocena. V spodnji tabeli je prikazan odnos med oceno kakovosti in verjetnostjo napake.

Ocena kakovosti Q(X)	Verjetnost napake
Q40	0,0001 (1 od 10.000)
Q30	0,001 (1 od 1.000)
Q20	0,01 (1 od 100)
Q10	0,1 (1 od 10)

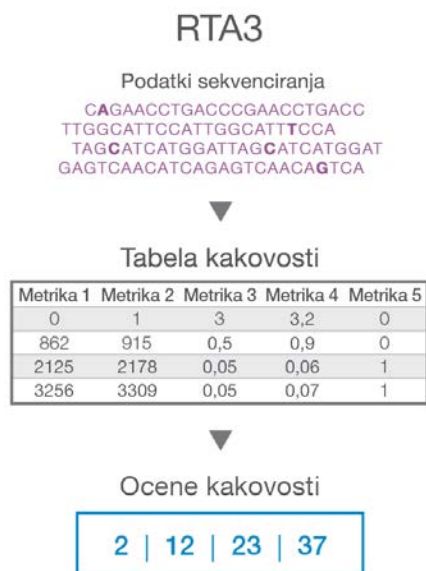
## Ocena kakovosti in poročanje

Funkcija ocene kakovosti izračuna nabor napovedi za vsako dodelitev baze in nato na podlagi vrednosti teh napovedi poišče oceno kakovosti v tabeli. S tabelami kakovosti dobimo optimalno točne napovedi kakovosti za izvedbe sekvenciranja, ki se izvedejo z določeno konfiguracijo platforme za sekvenciranje in različico kemične mešanice.

**i** | Ocena kakovosti temelji na prilagojeni različici algoritma Phred.

Za namene ustvarjanja tabele kakovosti za sistema za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000 so določene tri skupine dodelitev baze glede na gručenje teh določenih predvidevanih funkcij. Po določitvi skupin za dodelitve baz, je empirično izračunano število glavnih napak za vsako od treh skupin, ustrezne ocene kakovosti pa so zabeležene v tabelo kakovosti ob predvidevanih funkcijah, povezanih z določeno skupino. Programska oprema RTA3 omogoča samo tri ocene kakovosti in te ocene kakovosti predstavljajo povprečno število napak skupine (*Poenostavljena ocena kakovosti s programsko opremo RTA3 na strani 60*). Rezultat tega postopka so poenostavljene in hkrati visoko natančne ocene kakovosti. Tri skupine v tabeli kakovosti ustrezajo dodelitvam baze mejne kakovosti (< Q15), srednje kakovosti (pribl. Q20) in visoke kakovosti (> Q30) ter so dodeljene določenim ocenam 12, 23 oziroma 37. Ocena 2 je dodeljena ocenam z vrednostjo »null«, ki ne vsebujejo nobene dodelitve baze. Ta model poročanja o ocenah kakovosti zmanjša zasedenost prostora v shrambi in zahteve za pasovno širino brez vpliva na natančnost ali učinkovitost delovanja.

Slika 7 Poenostavljena ocena kakovosti s programsko opremo RTA3



## Sekvenciranje datotek z odčitki

Vrsta datoteke	Opis datoteke, mesto in ime
Datoteke z združeno dodelitvijo baze	<p>Vsaka analizirana gruča je vključena v datoteko z združeno dodelitvijo baze, ki je združena v eno datoteko na cikel, pas ali površino. V tej združeni datoteki sta združena dodelitev baze in šifrirana ocena kakovosti za posamezno gručo. Datoteke z združeno dodelitvijo baze uporablja BaseSpace Sequence Hub ali bcl2fastq2.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1 L[lane]_[surface].cbcl, na primer L001_1.cbcl</p>
Datoteke z mesti gruč	<p>Za vsako pretočno celico binarna datoteka z mesti gruč vsebuje koordinate XY za gruče na ploščici. Koordinate so vnaprej določene s šesterkotno postavitvijo, ki ustreza postavitvi nano vdolbinice pretočne celice.</p> <p>Data/Intensities s_[lane].locs</p>
Datoteke s filtri	<p>Datoteka s filtri določa, ali je bila gruča uspešno filtrirana. Sistem ustvari datoteke s filtri v 26. ciklu, in sicer iz podatkov iz 25 ciklov. Za vsako ploščico se ustvari ena datoteka s filtri.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001 s_[lane]_[tile].filter</p>

Vrsta datoteke	Opis datoteke, mesto in ime
Datoteke InterOp	Binarne datoteke s poročili si je mogoče ogledati v instrumentu s programsko opremo za nadzor ali v orodju SAV oziroma središču BaseSpace Sequence Hub zunaj instrumenta. Datoteke InterOp se posodablajo med izvedbo sekvenciranja. Mapa <code>InterOp</code>
Datoteka s podatki o izvedbi	V njej so navedeni ime izvedbe, število ciklov posameznega odčitavanja, ali gre za indeksno odčitavanje, ter število prog in ploščic na pretočni celici. Datoteka s podatki o izvedbi je ustvarjena na začetku izvedbe <code>[Root folder], RunInfo.xml</code>

## Datoteke z odčitki sekundarne analize v aplikaciji DRAGEN

V platformi DRAGEN Bio-IT izvedete dodatno analizo odčitka sekvenciranja v instrumentu z enim od teh cevovodov analize.

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

V tem poglavju so na voljo informacije o posameznih cevovodih aplikacije DRAGEN, vključno s podatki o datoteki z odčitki. Poleg možnosti ustvarjanja datotek za določene cevovode so v aplikaciji DRAGEN na voljo tudi metrike analize v datoteki `<sample_name>.metrics.json` ter poročila, opisana v razdelku [Cevovod DRAGEN BCL Convert na strani 66](#). Za več informacij o aplikaciji DRAGEN glejte [stran s podporo za platformo DRAGEN Bio-IT](#).

Vsi cevovodi DRAGEN podpirajo raztezanje vhodnih datotek BCL in stiskanje datotek BAM/CRAM z odčitki.

Dejavniki datoteke z odčitki:

- Za cevovode Germline, RNA, Enrichment in DNA Amplicon, kjer se izvaja analiza v instrumentu, datoteke BAM niso prenesene v središče BaseSpace Sequence Hub, če je izbran način »Proactive, Run Monitoring and Storage« (Proaktivno, nadzor in shranjevanje izvedbe).

### Cevovod DRAGEN Enrichment

Cevovod DRAGEN Enrichment podpira te funkcije. Če uporabljate DRAGEN 3.7 ali novejšo različico, sta podprta tako način germline kot tudi način somatic (samo tumor).

- Demultipleksiranje vzorca
- Preslikava in usklajevanje, vključno z razvrščanjem in ustvarjanju dvojnikov
- Klicanje majhnih različic
- Klicanje strukturnih različic

Če želite izvesti klicanje različic, morate vključiti datoteko \*.bed v vzorčni list ali pa jo določiti v funkciji Instrument Run Setup v središču BaseSpace Sequence Hub. Klicanje strukturnih različic je ustvarjeno le za odčitavanja v paru in način germline.

Če uporabljate DRAGEN Enrichment, različica 3.8 ali novejša, lahko vnesete datoteko Noise Baseline za izboljšanje učinkovitosti delovanja v načinu »somatic«. Glejte [Uvoz datotek Noise Baseline na strani 18](#).

Cevovod ustvari te datoteke z odčitki.

Komponenta	Vrsta	Ime datoteke z odčitki
Preslikava/usklajevanje	BAM ali CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.bam ali</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.cram</li> </ul>
Klicanje majhnih različic	VCF in gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>
Klicanje strukturnih različic	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.sv.vcf.gz</li> </ul>

\* Datoteke z odčitki gVCF so na voljo samo za način germline.

## Cevovod DRAGEN Germline

Cevovod DRAGEN Germline podpira te funkcije:

- Demultipleksiranje vzorca
- Preslikava in usklajevanje, vključno z razvrščanjem in ustvarjanju dvojnikov
- Klicanje majhnih različic
- Klicanje strukturnih različic za odčitavanja v parih
- Klicanje različic števila kopij za človeške genome
- Ponavljajoče se ekspanzije za človeške genome
- Regije homozigotnosti za človeške genome
- **[DRAGEN v3.8 ali novejša različica]** Zaznavanje CYP2D6

Klicanje strukturnih različic je ustvarjeno le za odčitavanja v paru.

Cevovod ustvari te datoteke z odčitki.

Komponenta	Vrsta	Ime datoteke z odčitki
Preslikava/usklajevanje	BAM ali CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.bam ali</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.cram</li> </ul>
Klicanje majhnih različic	VCF in gVCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>
Klicatelj strukturnih različic	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.sv.vcf.gz</li> </ul>
Različice števila kopij	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.cnv.vcf.gz</li> </ul>
Ponavljajoča se ekspanzija	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.repeats.vcf.gz</li> </ul>
Regije homozigotnosti	CSV in BED	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.roh_metrics.csv</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.roh.bed</li> </ul>
Zaznavanje CYP2D6	TSV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.cyp2d6.tsv</li> </ul>

## Cevovod DRAGEN DNA Amplicon

Cevovod DRAGEN podpira te funkcije:

- Demultipleksiranje vzorca
- Preslikava in usklajevanje, vključno z razvrščanjem in ustvarjanjem dvojnikov
- Klicanje majhnih različic v načinu germline ali somatic.

Če želite izvesti klicanje različic, morate vključiti datoteko \*.bed v vzorčni list ali pa jo določiti v funkciji Instrument Run Setup v središču BaseSpace Sequence Hub.

Cevovod ustvari te datoteke z odčitki.

Komponenta	Vrsta	Ime datoteke z odčitki
Preslikava/usklajevanje	BAM ali CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.bam ali</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.cram</li> </ul>
Klicanje majhnih različic	VCF in gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;sample_name&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>

\* Datoteke z odčitki gVCF so na voljo samo v načinu germline.

## Cevovod DRAGEN RNA

Cevovod DRAGEN RNA podpira te funkcije.

- Demultipleksiranje vzorca
- Preslikava in usklajevanje, vključno z razvrščanjem in ustvarjanjem dvojnikov
- Zaznavanje fuzije genov
- Merjenje količine prepisa

- [DRAGEN v3.8 ali novejša različica] Diferencialno izražanje genov

Če želite ustvariti datoteke z odčitki, določite datoteko GTF v vzorčnem listu oziroma zagotovite, da je na voljo privzeta datoteka `genes.gtf.gz` z vzorčnim genomom.

Cevovod ustvari te datoteke z odčitki.

Komponenta	Vrsta	Ime datoteke z odčitki	Opis
Preslikava/usklajevanje	BAM ali CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.bam</code> ali</li> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.cram</code></li> </ul>	Specifikacije SAM uskladitve odčitkov.
Zaznavanje fuzije genov	Navadno besedilo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.fusion_candidates.preliminary</code></li> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.fusion_candidates.final</code></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kandidati za fuzijo pred uporabo filtrov.</li> <li>• Kandidati za fuzijo po uporabi filtrov.</li> </ul>
Merjenje količine prepisa	Navadno besedilo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>sample_name.quant.genes.sf</code></li> <li>• <code>sample_name.quant.sf</code></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rezultati merjenja količine prepisa na ravni gena.</li> <li>• Vsi rezultati merjenja količine prepisa.</li> </ul>
Diferencialno izražanje	PNG	Oglejte si spodnjo tabelo z datotekami z odčitki diferencialnega izražanja.	Če želite ustvariti datoteke z odčitki, morate nastaviti primerjavo v vzorčnem listu.

Če je omogočeno diferencialno izražanje, so ustvarjene te datoteke z odčitki.

Ime datoteke	Opis
<code>Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv</code>	Vključuje metriko analize diferencialnega izražanja.
<code>Control_vs_Comparison.genes.counts.csv</code>	Opisuje število odčitkov, preslikanih v posamezne gene za posamezne vzorce v skupinah nadzora in primerjave.



Ime datoteke	Opis
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Toplotni zemljevid izražanja diferencialno izraženih genov za vzorce v skupinah nadzora in primerjave. Toplotni zemljevid prikazuje samo diferencialno izražene gene s prilagojeno vrednostjo $P < -0.05$ . Če je na voljo več kot 30 diferencialno izraženih genov, je uporabljenih le zgornjih 30 diferencialno izraženih genov. Če DESeq1 ni mogoče konvergirati ali pa ni diferencialno izraženih genov, datoteka ni ustvarjena.
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Vključuje variacijo razmerij izražanja genov kot funkcijo povprečne jakosti signala. Če želite prikazati razlike med meritvami, opravljenimi v dveh vzorcih, so podatki preoblikovani glede na merili M (razmerje dnevnika) in A (povprečna vrednost), nato pa so vrednosti prikazane na grafu. Na grafu MA so prikazane spremembe pregiba dnevnika $\log_2$ za ustrezno spremenljivo vrednost glede na povprečje normaliziranih vrednosti za vse vzorce. Če je prilagojena vrednost P manj kot 0,1, so točke rdeče. Točke, ki so zunaj okna, so prikazane na grafu kot odprti trikotniki. Navzgor obrnjeni trikotniki predstavljajo pozitivno spremembo pregiba dnevnika. Navzdol obrnjeni trikotniki predstavljajo negativno spremembo pregiba dnevnika.
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	Na grafu sta prikazani prvi dve glavni komponenti z največjo varianco.
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Vključuje rezultate za DESeq2, kjer so opisani glavno izražanje, $\log_2$ (sprememba pregiba), standardna napaka za $\log_2$ , vrednost P, prilagojena vrednost P ter stanje izražanja posameznih genov.
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Vključuje urejeno število preoblikovanj v dnevniku, ki jih je ustvaril DESeq2.

## Cevovod DRAGEN Single Cell RNA

Aplikacija DRAGEN podpira te funkcije:

- Demultipleksiranje vzorca
- Preslikava in usklajevanje, vključno z razvrščanjem in ustvarjanjem dvojnikov

- Klasifikacija celice in gena

Če želite ustvariti datoteke z odčitki, določite datoteko GTF v vzorčnem listu oziroma zagotovite, da je na voljo privzeta datoteka `genes.gtf.gz` z vzorčnim genomom.

Cevovod ustvari te datoteke z odčitki.

Komponenta	Vrsta	Ime datoteke z odčitki
Preslikava/usklajevanje	BAM ali CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.bam</code> ali</li> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.cram</code></li> </ul>
Klasifikacija celice/gena	TSV, CSV in MTX	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.scRNA.barcodeSummary.tsv</code></li> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.scRNA.genes.tsv</code></li> <li>• <code>&lt;sample_name&gt;.scRNA.matrix.mtx</code></li> </ul>
Poročila analize	HTML	<code>&lt;sample_name&gt;.dragen.scrna-report.*.html</code>

## Cevovod DRAGEN BCL Convert

Cevovod DRAGEN BCL Convert uporablja podatke BCL, pridobljene z izvedbo sekvenciranja, ter podatke vzorčnega lista za ustvarjanje datoteke FASTQ z odčitki za posamezne vzorce. Ime datoteke FASTQ je `<sample_name>.fastq.gz`.

Cevovod ustvari ta poročila.

Komponenta	Vrsta	Ime datoteke z odčitki
Demultipleksiranje	CSV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>Demultiplex_Stats.csv</code></li> </ul>
Metrika vmesnika	CSV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>Adapter_Metrics.csv</code></li> </ul>
Preskakovanje indeksov	CSV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>Index_Hopping_Counts.csv</code></li> </ul>
Najpomembnejše neznane črtne kode	CSV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <code>Top_Unknown_Barcodes.csv</code></li> </ul>

## Statistično poročilo demultipleksiranja

Statistično poročilo demultipleksiranja vključuje informacije o številu uspešno filtriranih odčitavanj, ki so dodeljena posameznim vzorcem v vzorčnem listu. Morebitni odčitki, ki niso jasno povezani z vzorcem, so klasificirani kot nedoločeni. Poročilo vsebuje tudi podatke o ocenah kakovosti baz v uspešno filtriranih (PF) odčitavanjih, dodeljenih posameznim vzorcem.

Vključene so te informacije.

Metrika	Opis
»Lane« (Pas)	Pas pretočne celice, za katero je bilo izvedeno sekvenciranje.

Metrika	Opis
»SampleID« (ID vzorca)	ID vzorca z vzorčnega lista. Če odčitavanje ne ustreza vzorcu, je v polju prikazana vrednost <code>undetermined</code> (nedoločeno).
»Index« (Indeks)	Združevanje za »Index Read 1« (Indeksno odčitavanje 1) in »Index Read 2« (Indeksno odčitavanje 2) z vzorčnega lista, ločena z vezajem. Če odčitavanje ne ustreza vzorcu, je v polju prikazana vrednost <code>undetermined</code> (nedoločeno).
»# Reads« (Št. odčitavanj)	Število odčitavanj PF, demultipleksiranih za vzorec v določenem pasu.
»# Perfect Index Reads« (Št. popolnih indeksnih odčitavanj)	Število odčitavanj s popolnim ujemanjem s kombiniranimi indeksnimi sekvencami, določenimi v vzorčnem listu.
»# One Mismatch Index Reads« (Št. indeksnih odčitavanj z enim neujemanjem)	Število odčitavanj z eno napako v kombiniranih indeksnih sekvencah, določenih v vzorčnem listu.
»# of $\geq$ Q30 Bases (PF)« (Št. baz $\geq$ Q30 (PF))	Število baz, vključno z vmesniki, ki ustrezajo odčitavanjem, ki izpolnjujejo prag kakovosti Q30.
»Mean Quality Score (PF)« (Glavna ocena kakovosti (PF))	Glavna ocena kakovosti za odčitavanja, ki ustrezajo vzorcu v določenem pasu. Vrednost vključuje baze vmesnika.

## Poročila metrike vmesnika

Datoteka metrike vmesnika vključuje število baz vmesnika in vzorca, povezanih s posameznimi odčitavanji.

Vključene so te informacije.

Metrika	Opis
»Lane« (Pas)	Pas pretočne celice, za katero je bilo izvedeno sekvenciranje.
»Sample_ID« (ID vzorca)	ID vzorca z vzorčnega lista. Če odčitavanje ne ustreza vzorcu, je v polju prikazana vrednost <code>undetermined</code> (nedoločeno).
»index« (indeks)	Sekvenca za »index1« (indeks1) z vzorčnega lista. Če indeks ni določen v vzorčnem listu ali če je vrednost ID-ja vzorca <code>undetermined</code> (nedoločeno), je to polje prazno.

Metrika	Opis
»index2« (indeks2)	Sekvenca za »index2« (indeks2) z vzorčnega lista. Če polje »index2« (indeks2) ni določeno v vzorčnem listu ali če je vrednost ID-ja vzorca <code>undetermined</code> (nedoločeno), je to polje prazno.
»R1_ AdapterBases« (R1_Baze vmesnika)	Število baz, ki ustreza vrednosti »AdapterRead1« (Odčitavanje vmesnika 1) v vzorčnem listu.
»R1_ SampleBases« (R1_Baze vzorca)	Število obrezanih ali maskiranih baz za »Read 1« (Odčitavanje 1) za ustrezen pas in vzorec.
»R2_ AdapterBases« (R2_Baze vmesnika)	Število baz, ki ustreza vrednosti »AdapterRead2« (Odčitavanje vmesnika 2) v vzorčnem listu.
»R2_ SampleBases« (R2_Baze vzorca)	Število obrezanih ali maskiranih baz za »Read 2« (Odčitavanje 2) za ustrezen pas in vzorec.
»# Reads« (Št. odčitavanj)	Število odčitavanj za vzorec v določenem pasu.

## Poročilo o številu preskakovanj indeksov

Poročilo o številu preskakovanj indeksov vključuje število odčitavanj za posamezne pričakovane in preskočene indekse za izvedbo dvojnega indeksiranja. Poročilo vsebuje le enolična dvojna indeksiranja za posamezen pas, kjer v nobenem indeksu ni zaznan spor črtne kode. Če želite ustvariti metriko preskakovanja indeksov za pas, mora imeti vsak par vnosov v posameznem indeksu Hammingovo razdaljo najmanj  $2N + 1$ , kjer  $N$  označuje toleranco neujemanja črtne kode, določene za indeks.

Vključene so te informacije.

Za izvedbe, ki ne vključujejo indeksiranja, izvedbe enojnega indeksiranja ali pasove, ki ne vključujejo enoličnega dvojnega indeksiranja, datoteka vsebuje samo naslove.

Metrika	Opis
»Lane« (Pas)	Pas pretočne celice, za katero je bilo izvedeno sekvenciranje.

Metrika	Opis
»# Reads« (Št. odčitavanj)	Število odčitavanj za vzorec v določenem pasu.
»SampleID« (ID vzorca)	ID vzorca z vzorčnega lista. Če odčitavanje ne ustreza vzorcu, je v polju prikazana vrednost <code>undetermined</code> (nedoločeno).
»index« (indeks)	Sekvenca za »index1« (indeks1) z vzorčnega lista. To polje je prazno, če je izbrano eno odčitavanje ali pa je vrednost ID-ja vzorca <code>undetermined</code> (nedoločeno).
»index2« (indeks2)	Sekvenca za »index2« (indeks2) z vzorčnega lista. To polje je prazno, če je izbrano eno odčitavanje ali pa je vrednost ID-ja vzorca <code>undetermined</code> (nedoločeno).

## Poročilo o najpomembnejših neznanih črtnih kodah

Poročilo o najpomembnejših neznanih črtnih kodah vključuje 100 najpomembnejših indeksov ali indeksnih parov na pas, ki niso bili identificirani v vzorčnem listu glede na število dovoljenih neujemanj. Če je za stoto najvišje število indeksov navedenih več indeksnih vrednosti, so vse indeksne vrednosti z istim številom določene kot stota vrednost.

Vključene so te informacije:

Metrika	Opis
»Lane« (Pas)	Pas pretočne celice, za katero je bilo izvedeno sekvenciranje.
»index« (indeks)	Sekvenca posameznega neznanega indeksa za »index Read1« (Indeksno odčitavanje 1). Če ni najden noben neznan indeks, je polje prazno.
»index2« (indeks2)	Sekvenca posameznega neznanega indeksa za »index Read 2« (Indeksno odčitavanje 2). Če izvedba vključuje eno odčitavanje ali pa ni bil najden noben neznan indeks, je to polje prazno.
»# Reads« (Št. odčitavanj)	Število odčitavanj za vzorec v določenem pasu.

## Poročila Illumina DRAGEN QC

DRAGEN FastQC privzeto ustvari grafe QC za vse cevovode. Združeni rezultati QC so shranjeni v mapi `AggregatedFastqcMetrics`, rezultati za posamezne vzorce pa so shranjeni v mapi `<sample_name>`.

Poročila QC niso ustvarjena, če je število vzorcev večje kot 512.

Na voljo si ti grafi QC.

Graf QC	Opis
adapter_content	Odstotek sekvenc za vsak par baz.
positional_mean_quality	Povprečna ocena kakovosti Phred baze za posamezen položaj odčitavanja.
gc_content	Odstotek vsebine GC za posamezno odčitavanje sekvenciranja.
positional_quality.read_1	Povprečna ocena kakovosti Phred baz z določenim nukleotidom in na navedeni lokaciji za »Read 1« (Odčitavanje 1).
gc_quality	
positional_quality.read_2	Povprečna ocena kakovosti Phred baz z določenim nukleotidom in na navedeni lokaciji za »Read 1« (Odčitavanje 1).
n_content	
read_length	Dolžina sekvence posameznega odčitavanja.
positional_base_content.read_1	Število baz posameznega določenega nukleotida na navedenih lokacijah za »Read 1« (Odčitavanje 1).
read_quality	Povprečna ocena kakovosti Phred za posamezno odčitavanje sekvenciranja.
positional_base_content.read_2	Število baz posameznega določenega nukleotida na navedenih lokacijah za »Read 2« (Odčitavanje 2).

## Struktura mape z odčitki sekundarne analize v aplikaciji DRAGEN

Aplikacija DRAGEN privzeto ustvari datoteke z odčitki v mapi z odčitki, ki ste jo izbrali na zavihku »Settings« (Nastavitve). DRAGEN ustvari za vsak potek dela povzetek poročila v datoteki `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

Vhodne datoteke izvajanja (na primer datoteke BED, GTF)

### sample\_name

#### enrich\_caller , germline\_seq, dna\_amplicon\_seq, rna\_seq ali scrna\_seq

##### sample\_name

\*.png

dragen\_\*.log

sample\_name.\*.metrics.csv

[DNA] sample\_name.\*.vcf.gz

[DNA] sample\_name.\*.gvcf.gz – Ni na voljo za cevovod DRAGEN Bio-IT Platform Amplicon (somatic).

sample\_name.\*.bam ali sample\_name.\*.cram

Dnevniki

[RNA] sample\_name.fusion\_candidates.filter\_info

[RNA] sample\_name.fusion\_candidates.final

[RNA] sample\_name.quant.genes.sf

[RNA] sample\_name.quant.genes.sf

sample\_name.metrics.json

[scRNA] sample\_dragen-scrna-report.\*.html

[scRNA] sample\_name.scRNA.barcodeSummary.tsv

[Germline] sample\_name.roh\_metrics.csv

[Germline] sample\_name.roh.bed

[Germline] sample\_name.cyp2d6.tsv

sample\_name.fastqc\_metrics.csv

sample\_name.trimmer\_metrics.csv

#### [RNA] DifferentialExpression

##### Comparison1

Control\_vs\_Comparison.differential\_expression\_metrics.csv

Control\_vs\_Comparison.genes.counts.csv

Control\_vs\_Comparison.genes.disp.pdf

Control\_vs\_Comparison.genes.heatmap.pdf

- Control\_vs\_Comparison.genes.ma.pdf
- Control\_vs\_Comparison.genes.pca.pdf
- Control\_vs\_Comparison.genes.res.csv
- Control\_vs\_Comparison.genes.rlog.csv

#### ComparisonN

##### dnevniki

- \*.txt
- \*.csv

**fastq** – Na voljo le, če je parameter »KeepFastq« (Ohrani Fastq) nastavljen na »true«.

- \*.fastq.gz

**ora\_fastq** – Na voljo le, če je parameter »FastqCompressionFormat« (Oblika zapisa stiskanja Fastq) nastavljen na »dragen«.

- \*.fastq.ora

#### RunInstrumentAnalyticsMetrics

##### 0001

- dataset.json
- fastqc\_metrics.csv

##### 0002

- dataset.json
- fastqc\_metrics.csv
- Adapter\_Metrics.csv
- Demultiplex\_Stats.csv
- Index\_Hopping\_Counts.csv


#### Reports

- Demultiplex\_Stats.csv
- RunInfo.xml
- Trim\_Metrics.csv
- fastq\_list.csv
- SampleSheet.csv
- Index\_Hopping\_Counts.csv
- Top\_Unknown\_Barcodes.csv



 **Read1InstrumentAnalyticsMetrics** – Samo za odčitavanja v parih.


 **0001**


 dataset.json


 **0002**

 dataset.json


 Adapter\_Metrics.csv

 Demultiplex\_Stats.csv

 Index\_Hopping\_Counts.csv

 **Read1Metrics** – Samo za odčitavanja v parih.

 Adapter\_Metrics.csv


 Index\_Hopping\_Counts.csv

# Vzdrževanje

V tem razdelku so opisani postopki, ki jih morate izvesti za ohranjanje ustreznega stanja sistema. Oglejte si, kako namestite posodobitve programske opreme, zamenjate zračni filter in izvedete druge redne postopke vzdrževanja. Redno posodabljanje programske opreme za nadzor zagotavlja, da so v sistemu nameščeni najnovejši popravki in funkcije za optimalno učinkovitost delovanja.

## Čiščenje prostora na trdem disku

Za izvedbo sekvenciranja potrebujete približno 200 GB lokalnega prostora na trdem disku. Ko začne prostora zmanjkovati, se prikaže opozorilo. Izvedite te korake za sprostitev prostora tako, da izbrišete dokončane izvedbe sekvenciranja in nameščene vzorčne genome v mapi z začasnimi izvedbami.

 Izvedbe izbrišite z uporabo programske opreme za nadzor NextSeq 1000/2000 in ne ročno v operacijskem sistemu. Ročno brisanje izvedb lahko negativno vpliva na delovanje programske opreme za nadzor.

1. V meniju programske opreme za nadzor izberite **Disk Management** (Upravljanje diska). Prikaže se zaslon za upravljanje diska s seznamom izvedb sekvenciranja in vzorčnih genomov, shranjenih na lokalnem trdem disku.
2. Za izvedbo, ki jo želite izbrisati, izberite **Delete run** (Izbriši izvedbo). Če izbrišete izvedbo, izbrišete lokalno mapo izvedbe. Mapa z odčitki, ki je kopija mape z izvedbami, se ohrani.
3. V pogovornem oknu izberite **Yes, Delete Run** (Da, izbriši izvedbo), da potrdite brisanje izvedbe.
4. Ponovite koraka 2 in 3 za vsako izvedbo, ki jo želite izbrisati.
5. Za genom, ki ga želite izbrisati, izberite **Delete Genome** (Izbriši genom).
6. V pogovornem oknu izberite **Yes, Delete Genome** (Da, izbriši genom).
7. Ponovite koraka 5 in 6 za vsak genom, ki ga želite izbrisati.
8. Ko končate, zaprite okno »Disk Management« (Upravljanje diska), da se vrnete na začetni zaslon.

## Posodobitve programske opreme

S posodobitvijo programske opreme zagotovite, da ima vaš sistem najnovejše funkcije in popravke. Posodobitve programske opreme so združene v zbirko sistema, ki vključuje to programsko opremo:

- Programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000 Control Software
- Recepti za NextSeq 1000/2000
- Universal Copy Service
- Analiza v realnem času

**i** | Moduli aplikacije DRAGEN niso vključeni v sistemsko zbirko. Po potrebi jih namestite ločeno. Do programske opreme za module aplikacije DRAGEN lahko dostopate na straneh s podporo.

Sistem je konfiguriran za samodejni ali ročni prenos posodobitev programske opreme:

- **Automatic updates** (Samodejne posodobitve) – Posodobitve se samodejno prenesejo iz središča BaseSpace Sequence Hub, vi jih le namestite. Za to možnost potrebujete internetno povezavo, ne pa tudi računa središča BaseSpace Sequence Hub.
- **Manual updates** (Ročne posodobitve) – Posodobitve prenesete ročno iz spleta, jih shranite lokalno ali na prenosni pogon in jih nato namestite s shranjenega mesta. Za to možnost ne potrebujete internetne povezave z instrumentom.

### Namestitev samodejne posodobitve programske opreme


1. Prepričajte se, da se ne izvaja nobeno sekvenciranje ali sekundarna analiza v instrumentu.
2. Prijavite se v ilmnadmin.
3. Izberite **Software Update** (Posodobitev programske opreme) v meniju programske opreme za nadzor.  
Sistemi, ki so konfigurirani za samodejne posodobitve, prikažejo opozorilo, ko so na voljo posodobitve programske opreme.
4. Če želite preveriti, ali je na voljo posodobitev, izberite **Check Online for Software Update** (Preveri posodobitve programske opreme v spletu).
5. Izberite **Update now** (Posodobi zdaj), da prenesete novo različico programske opreme.  
Ko je prenos dokončan, se programska oprema za nadzor zapre in prikaže se čarovnik za namestitev.  
Programska oprema za nadzor se samodejno znova zažene. Če sistem znova zaženete, se morebitne posodobitve vdelane programske opreme prikažejo samodejno.

**i** | Ko se postopek namestitve začne, ni mogoče preklicati posodobitve. Posodobitev je mogoče preklicati samo med prenosom.

### Namestitev ročne posodobitve programske opreme

1. Prijavite se v ilmnadmin.
2. Prepričajte se, da se ne izvaja nobeno sekvenciranje ali sekundarna analiza v instrumentu.
3. Ko je na voljo posodobitev vdelane programske opreme, prenesite program za namestitev zbirke (\*.tar.gz) s [strani s podporo za sistema za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000](#). Namestitveni program shranite na lokalni ali prenosni pogon.
4. Če shranite namestitveni program na prenosni pogon, povežite pogon z vrati USB 3.0 ob strani ali na zadnji strani instrumenta.
5. V programski opremi za nadzor izberite **Software Update** (Posodobitev programske opreme) v meniju programske opreme za nadzor.

- Izberite **Choose...** (Izberi ...), da poiščete namestitveni program.
- Izberite **Update Now** (Posodobi zdaj), da zaženete namestitev.  
Med namestitvijo je v programski opremi za nadzor prikazan indikator zasedenosti. Programska oprema za nadzor se samodejno znova zažene. Če sistem znova zaženete, se morebitne posodobitve vdelane programske opreme prikažejo samodejno.

 Ko se postopek namestitve začne, ni mogoče preklicati posodobitve. Posodobitev je mogoče preklicati samo med prenosom.

## Potek dela v aplikaciji DRAGEN in posodobitve licence

Samo skrbniki sistema lahko namestijo poteke dela v aplikaciji DRAGEN in obnovijo licence za DRAGEN.

### Spletna obnovitev licence za DRAGEN

Če ima sistem NextSeq 1000/2000 vzpostavljeno povezavo z internetom, lahko posodobite licenco za platformo DRAGEN Bio-IT tako, da upoštevate spodnje korake.

- Stopite v stik s tehnično podporo družbe Illumina, da pridobite nov licenčni ključ.
- Počakajte 24 ur, da je licenca samodejno posodobljena, ali pa jo posodobite takoj tako, da izvedete te korake.
  - Izberite meni programske opreme za nadzor in nato izberite **DRAGEN**.
  - Izberite **Check Online** (Preveri v spletu), da preverite, ali je na voljo nov licenčni ključ za DRAGEN.
  - Če je na voljo, izberite **Update** (Posodobi).

### Obnovitev licence za DRAGEN brez povezave

Če sistem NextSeq 1000/2000 nima vzpostavljeno povezavo z internetom, lahko posodobite licenco za platformo DRAGEN Bio-IT tako, da upoštevate spodnje korake.

- Stopite v stik s tehnično podporo družbe Illumina, da pridobite nov licenčni ključ. Shranite datoteko `license.zip` na lokalni ali prenosni pogon.
- Če shranite datoteko \*.zip na prenosni pogon, povežite pogon z vrati USB 3.0 ob strani ali na zadnji strani instrumenta. Po potrebi previdno premaknite instrument, da dostopate do zadnje strani.
- Izberite meni programske opreme za nadzor in nato izberite **DRAGEN**.
- Izberite **Choose** (Izberi), da poiščete datoteko \*.zip, nato pa izberite **Open** (Odpri).

## Spletna namestitev potekov dela v aplikaciji DRAGEN

Če ima sistem NextSeq 1000/2000 vzpostavljeno povezavo z internetom, lahko namestite poteke dela v aplikaciji DRAGEN v programsko opremo za nadzor NextSeq 1000/2000. Spletna namestitev potekov dela v aplikaciji DRAGEN je na voljo samo v programski opremi za nadzor NextSeq 1000/2000 v1.3.

1. Izberite meni programske opreme za nadzor, nato pa izberite **Process Management** (Upravljanje postopka).
2. Prepričajte se, da se ne izvaja nobeno sekvenciranje ali sekundarna analiza v instrumentu.
3. Izberite meni programske opreme za nadzor in nato izberite **DRAGEN**.  
V polju »Version« (Različica) so v razdelku »Available Workflows« (Razpoložljivi poteki dela) navedeni poteki dela, ki so trenutno nameščeni v sistemu.
4. Če želite namestiti poteke dela v aplikaciji DRAGEN v programsko opremo za nadzor NextSeq 1000/2000, izberite **Check Online** (Preveri v spletu).  
Nekatere različice in poteki dela v aplikaciji DRAGEN ne omogočajo spletne namestitve. Za dodatne poteke dela uporabite namestitev brez povezave.
5. Potrdite polje za poteke dela, ki jih želite namestiti. Če potekov dela ni mogoče namestiti, zagotovite, da najprej namestite najnovejšo različico BCL Convert.  
Informacije o najnovejši različici poteka dela si lahko ogledate v opombah ob izdaji.
6. Izberite **Install** (Namesti), da zaženete namestitev.
7. Vnesite ilmnadmin za sistemsko geslo in izberite **Authenticate** (Preveri pristnost).

## Namestitev potekov dela v aplikaciji DRAGEN brez povezave

1. Ko je na voljo posodobitev poteka dela v aplikaciji DRAGEN, prenesite namestitveni program (\*.tar.gz) na [strani s podporo za platformo DRAGEN](#). Namestitveni program shranite na lokalni ali prenosni pogon.
2. Če shranite namestitveni program na prenosni pogon, povežite pogon z vrati USB 3.0 ob strani ali na zadnji strani instrumenta. Po potrebi previdno premaknite instrument, da dostopate do zadnje strani.
3. Izberite meni programske opreme za nadzor, nato pa izberite **Process Management** (Upravljanje postopka).
4. Prepričajte se, da se ne izvaja nobeno sekvenciranje ali sekundarna analiza v instrumentu.
5. Izberite meni programske opreme za nadzor in nato izberite **DRAGEN**.
6. V razdelku »Version« (Različica) izberite **Browse for New Version** (Prebrskaj novo različico), da se pomaknete do namestitvenega programa.
7. Izberite **Install** (Namesti), da zaženete namestitev.
8. Vnesite ilmnadmin za sistemsko geslo in izberite **Authenticate** (Preveri pristnost).

## Zamenjava zračnega filtra

Pretečeni zračni filter zamenjajte vsakih 6 mesecev v skladu z navodili.

Zračni filter je pravokotna kartuša za enkratno uporabo, ki prekriva ventilator na desni strani instrumenta. Zagotavlja ustrezno hlajenje in preprečuje vdor delcev v sistem. Instrument je dobavljen z enim že nameščenim zračnim filtrom, priložen pa je tudi rezervni filter. Priloženi so dodatni zračni filtri z veljavno servisno pogodbo za instrument, lahko pa jih kupite tudi posebej pri družbi Illumina.

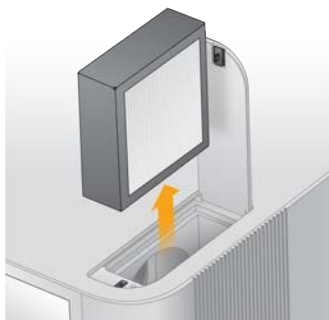
1. Na vrhu instrumenta pritisnite desno stran zgornje ploščice, da se odpre, kot je prikazano na spodnji sliki.



2. Odprite ploščico.



3. Pritisnite, da sprostite kartušo zračnega filtra, jo odstranite in zavržite.



4. Vstavite nov zračni filter in ga pritisnite, da se zaskoči.

5. Zaprite zgornjo ploščico in jo pritisnite na mesto.



6. Instrument znova postavite na prejšnje mesto.

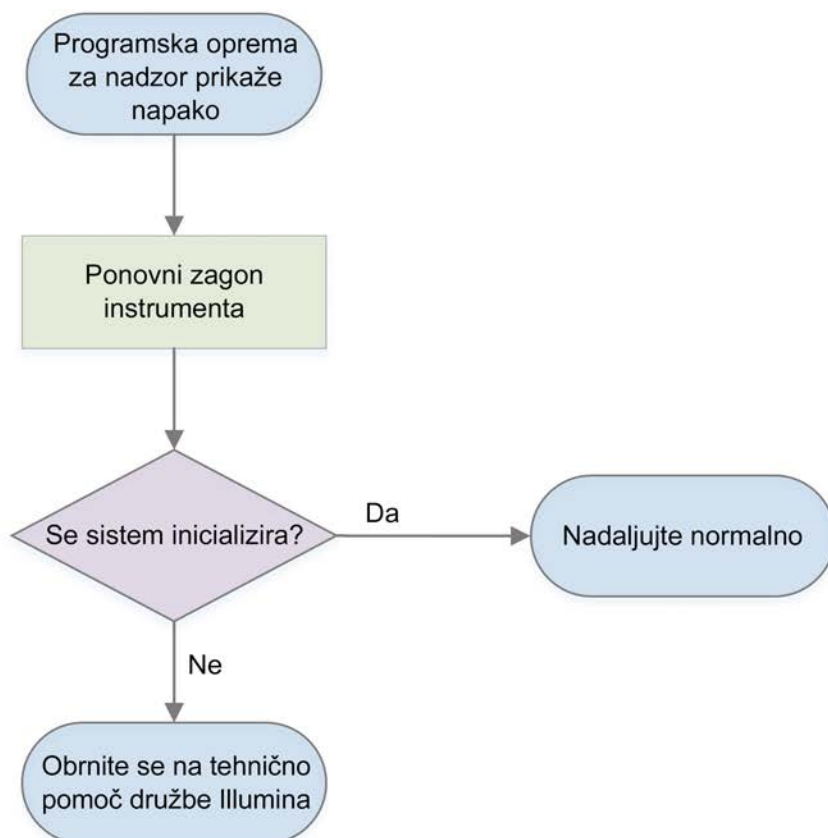
# Odpravljanje težav

V tem poglavju so na voljo navodila po korakih za preklic izvedbe sekvenciranja in ponovni zagon instrumenta ter drugi postopki za odpravljanje težav.

## Odpravljanje sporočil o napakah

V tem dodatku so na voljo podrobna navodila s koraki za odpravljanje različnih napak. V spodnjem diagramu poteka je prikazan pregled odpravljanja sporočil o napakah, ki se prikažejo med inicializacijo, nastavitvijo izvedbe ali sekvenciranjem in jih ni mogoče odpraviti s ponovnim poskusom.

Številne napake lahko odpravite tako, da instrument znova zaženete: ga izklopite in znova vklopite. Za več informacij o ponovnem zagonu glejte razdelek [Ponovni zagon instrumenta na strani 82](#).





## Ponovno shranjevanje potrošnega materiala

Upoštevajte ta navodila za shranjevanje odmrznjene kartuše in pretočne celice v primeru napake v instrumentu, zaznane med preverjanjem pred izvedbo sekvenciranja pred postopkom preverjanja tekočin.

- Ločite pretočno celico in kartušo.
  - Odstranite razredčeno knjižnico iz rezervoarja in jo zavržite (do pribl. 18 µl).
- !** Pripravite sveže redčenje iste knjižnice za naslednjo izvedbo sekvenciranja, da preprečite navzkrižno kontaminacijo vzorca z ostanki knjižnice v rezervoarju.
- Kartušo prestavite v prostor za shranjevanje s temperaturo od 2 °C do 8 °C, tako da je nalepka obrnjena navzgor in da zrak lahko kroži z vseh strani.  
Ne pustite shranjeno več kot 72 ur. Če ste kartušo odmrzovali v hladilniku čez 12 ur oziroma čez noč, ne pustite shranjeno več kot 60 ur.
  - Pretočno celico shranite nazaj v izvorno srebrno vrečko, skupaj s sušilom.
  - Srebrno vrečko zalepite in jo prestavite v prostor za shranjevanje s temperaturo od 2 °C do 8 °C.  
Ne pustite shranjeno več kot 72 ur.

## Preklic izvedbe sekvenciranja

- Izberite **End Run** (Končaj izvedbo).
- Če želite samodejno očistiti kartušo z reagentom, potrdite polje **Purge Reagent Cartridge** (Očisti kartušo z reagentom).  
Privzeti izbor je konfiguriran v nastavitvah programske opreme za nadzor NextSeq 1000/2000.
- Izberite **Yes, end the sequencing run** (Da, končaj izvedbo sekvenciranja).  
Preklic izvedbe sekvenciranja je dokončno dejanje. Programska oprema ne more nadaljevati izvedbe sekvenciranja in potrošnega materiala ne morete znova uporabiti po preverjanju instrumenta, ki je del preverjanj pred izvedbo sekvenciranja.
- Izberite **Eject Cartridge** (Izvrzi kartušo), da odprete vizir in izvržete pladenj.
- Odstranite kartušo s pladnja.
- Shranite ali zavržite kartušo, odvisno od tega, kdaj ste preklicali izvedbo:

Okoliščina	Primer
Izvedbo ste preklicali pred ali med preverjanjem instrumenta pred izvedbo sekvenciranja in želite znova uporabiti potrošni material.	Glejte <a href="#">Ponovno shranjevanje potrošnega materiala na strani 81</a> .
Druge okoliščine.	Glejte <a href="#">Odstranjevanje potrošnega materiala na strani 53</a> .

- Izberite **Close Door** (Zapri vrata), da znova naložite pladenj in se vrnete na začetni zaslon. Senzorji potrdijo odstranitev kartuše.

## Ponovni premik izvedbe sekvenciranja v čakalno vrsto

Če se v razdelku »Process Management« (Upravljanje postopka) prikaže sporočilo o napaki za stanje sekundarne analize, lahko izvedbo ponovno premaknete v čakalno vrsto, da znova izvedete analizo v aplikaciji DRAGEN v instrumentu za ustvarjene datoteke cBCL. Za delovanje funkcije ponovnega premika v čakalno vrsto mora biti v instrumentu še vedno na voljo izvorna mapa izvedbe. Če uporabite to funkcijo ponovnega premika v čakalno vrsto, izvedbe niso ponovno premaknjene v čakalno vrsto v središču BaseSpace Sequence Hub. Za ponovni premik v čakalno vrsto v središču BaseSpace Sequence Hub glejte »Odpravljanje težav z vzorčnim listom v središču za pomoč za BaseSpace Sequence Hub«.

- Posodobite vzorčni list v2, nato pa shranite vzorčni list na prenosni ali vpeti omrežni pogon.
- Če shranite vzorčni list na prenosni pogon, povežite pogon z vrati USB 3.0 ob strani ali na zadnji strani instrumenta. Po potrebi previdno premaknite instrument, da dostopate do zadnje strani.
- Izberite meni programske opreme za nadzor, nato pa izberite **Process Management** (Upravljanje postopka).
- Prepričajte se, da se ne izvaja nobeno sekvenciranje ali sekundarna analiza v instrumentu.
- Izberite **Requeue** (Znova premakni v čakalno vrsto) ob dokončani izvedbi, ki jo želite znova premakniti v čakalno vrsto.
- Izberite **Choose** (Izberi), da poiščete posodobljeni vzorčni list, nato pa izberite **Open** (Odpri).
- Izberite **Start Requeue** (Začni ponovni premik v čakalno vrsto).

## Ponovni zagon instrumenta

Ko izvedete ponovni zagon instrumenta, se sistem varno zaustavi in ponovno zažene ter s tem znova vzpostavi izgubljeno povezavo, uskladi specifikacije ali reši neuspelo inicializacijo. Sporočila programske opreme označujejo, kdaj morate znova zagnati instrument, da odpravite težavo ali opozorilo.

- V meniju programske opreme za nadzor izberite **Shut Down Instrument** (Zaustavitev instrumenta).
- Če se sistem ne zaustavi, držite gumb za vklop/izklop na desni strani instrumenta, dokler se lučke ne ugasnejo.
- Ko gumb za vklop/izklop utripa, pritisnite stran na izklop (**O**) na preklopnem stikalu na zadnji strani instrumenta.  
Gumb za vklop/izklop lahko utripa tudi, ko je instrument izklopljen.

Slika 8 Mesto preklopnega stikala



- Počakajte 30 sekund.
- Pritisnite preklopno stikalo na strani za vklop (I).
- Ko gumb za vklop/izklop utripa, počakajte 30 sekund, nato pa ga pritisnite.

Slika 9 Mesto gumba za vklop/izklop



- Počakajte pribl. 5 minut, da se operacijski sistem naloži. Ko se operacijski sistem naloži, se prijavite v sistem.  
Programska oprema za nadzor se zažene in inicializira sistem. Počakajte pribl. 5 minut, da se izvede inicializacija sistema. Ko je inicializacija dokončana, se prikaže začetni zaslon.

## Preverjanje sistema

Preverjanje sistema ni zahtevano za običajno delovanje in vzdrževanje instrumenta. Kljub temu pa lahko predstavnik tehnične podpore družbe Illumina od vas zahteva, da izvedete postopek preverjanje sistema za namene odpravljanja napak.

Štiri preverjanja podsistema trajajo pribl. 58 minut. V tem času je izvedeno odpravljanje morebitnih napak in drugih težav, zaznanih pri postopkih preverjanja pred izvedbo sekvenciranja. Štirje testi potrdijo, ali so komponente ustrezno usklajene in delujoče.

Rezultati testov so shranjeni v mapo `system-check` na mestu `/usr/local/illumina/system-check`.

Pred izvedbo preverjanj sistema morate odstraniti kartušo.

## Izvedba preverjanja sistema

1. V programski opremi za nadzor izberite **System Checks** (Preverjanja sistema).
2. Potrdite polja za katera koli preverjanja sistema, ki jih želite izvesti.
  - **Network Connectivity** (Omrežna povezljivost) – preverjena sta stanje in učinkovitost delovanja omrežne povezave.
  - **Enclosure** (Ohišje) – preverjena je učinkovitost delovanja termalnega sistema in mehanizma za dvig vizirja.
  - **Motion** (Gibanje) – preverjene so omejitve hoda ter učinkovitost delovanja stopenj Z in XY.
  - **Optics** (Optika) – preverjena je učinkovitost delovanja slikovnega modula.
3. Izberite **Start** (Začetek).

## Povrnitev na tovarniške nastavitve

Sistem povrnite na tovarniške nastavitve, ko želite programsko opremo zamenjati s starejšo različico ali pa ne želite več uporabljati izbrane konfiguracije. To funkcijo lahko uporablja samo predstavnik družbe Illumina.

## Zajem nameščene slike

Zajemite posnetek sistema za varnostno kopiranje učinkovito delujoče namestitve programske opreme. Posnetek sistema lahko pozneje kadar koli obnovite. Priporočamo, da posnetek sistema zajamete takoj po dokončanju začetne nastavitve in spremembi gesla s predstavnikom družbe Illumina.

1. Znova zaženite Linux.
2. Ko ste pozvani k izbiri operacijskega sistema, izberite **Capture Installed Image** (Zajemi nameščeno sliko).

Za kratek čas se prikažejo možnosti operacijskega sistema, preden se samodejno namesti programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000.



Ker je v pomnilniku shranjena samo ena slika, s tem dejanjem prepisete prej zajeto sliko.

3. Počakajte pribl. 30 minut, da sistem zajame trenutno nameščeno sliko.  
Med postopkom zajemanja se lahko sistem večkrat znova zažene. Ko je postopek dokončan, se sistem znova zažene s trenutno nameščeno sliko, ki je shranjena v pomnilniku.

## Obnovitev zajete slike

Sistem obnovite na predhodno zajeto sliko, ko ne želite več uporabljati izbrane konfiguracije.

1. Znova zaženite Linux.
2. Ko ste pozvani k izbiri operacijskega sistema, izberite **Restore Installed Image** (Obnovi nameščeno sliko).

Za kratek čas se prikažejo možnosti operacijskega sistema, preden se samodejno namesti programska oprema za nadzor NextSeq 1000/2000.

**i** | Gesla so povezana s sistemsko sliko. Ko je obnovitev dokončana, se prijavite v sistem z geslom obnovljene slike.

3. Počakajte pribl. 30 minut, da je postopek obnovitve dokončan.  
Med postopkom se sistem večkrat znova zažene. Ko je postopek dokončan, se sistem znova zažene z obnovljeno sliko.

# Viri in reference

## Nastavitve za vzorčni list v2

Če uporabljate način v oblaku, lahko z vzorčnim listom v obliki zapisa datoteke v2 konfigurirate nastavitve izvedbe sekvenciranja. Ustvarite vzorčni list v funkciji Instrument Run Setup ali pa tako, da uredite *predlogo vzorčnega lista v2 za sistema za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000*. Ko urejate vzorčni list, zagotovite, da so vključeni ti razdelki in ta polja v navedenem vrstnem redu ter da izpolnjujejo te zahteve. Ko dokončate urejanje, uporabite prenosni ali vpeti omrežni pogon, da prenesete vzorčni list v sistema za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000. Med krmarjenjem do vzorčnega lista v programski opremi za nadzor, je ta kopiran v mapo s postopki pred izvedbo sekvenciranja v instrumentu, tako da lahko odstranite prenosni pogon.

Prepričajte se, da nastavitve vzorčnega lista v2 izpolnjujejo te zahteve:

- Indeksni sekvence, določene v razdelku vzorčnega lista »BCLConvert\_Data«, morajo ustrezati indeksnemu kompletu, izbranem v sistemu NextSeq 1000/2000.
- Če uporabljate programsko opremo NextSeq 1000/2000 Control Software v1.2, mora biti v sistemu nameščena in aktivna različica aplikacije DRAGEN, ki je določena v vzorčnem listu. Informacije o namestitvi so na voljo v poglavju [Posodobitve programske opreme na strani 74](#).
- Če uporabljate programsko opremo NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3, mora biti v sistemu nameščena različica aplikacije DRAGEN, ki je določena v vzorčnem listu. Programska oprema za nadzor samodejno zazna različico aplikacije DRAGEN v vzorčnem listu in vas po potrebi pozove k zamenjavi aktivne različice. Informacije o namestitvi so na voljo v poglavju [Posodobitve programske opreme na strani 74](#).

Če uporabljate aplikacijo DRAGEN, morate konfigurirati dodatne nastavitve. Za več informacij glejte [Nastavitve vzorčnega lista v aplikaciji DRAGEN na strani 90](#)

Prenesite predlogo vzorčnega lista v2 v razdelku »Product Files« (Datoteke izdelka) na strani s podporo za sistema za sekvenciranje NextSeq 1000 in NextSeq 2000. Če ustvarite vzorčni list s funkcijo Instrument Run Setup in ga spremenite po začetnem prenosu, lahko pride do napake pri analizi.

Imena datotek ne smejo vključevati posebnih znakov.

### Zahteve za razdelek [Header] (Glava)

Razdelek [Header] (Glava) vključuje splošne informacije o izvedbi sekvenciranja. Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [Header].

Polje	Zahtevano	Opis
»FileFormatVersion« (Različica oblike zapisa datoteke)	Da	Različica vzorčnega lista. Vnesite 2 za vrednost.
»RunName« (Ime izvedbe)	Ne	Željeno enolično ime izvedbe. Polje »RunName« (Ime izvedbe) lahko vključuje alfanumerične znake, podčrtaje, črtice in pike. Če polje »RunName« (Ime izvedbe) vsebuje presledke ali posebne znake, pride do napake pri analizi.
»RunDescription« (Opis izvedbe)	Ne	Opis izvedbe.
»InstrumentPlatform« (Platforma instrumenta)	Ne	NextSeq 1000/2000
»InstrumentType« (Vrsta instrumenta)	Ne	NextSeq 1000/2000

### Zahteve za razdelek [Reads] (Odčitavanja)

V razdelku [Reads] (Odčitavanja) je navedeno število ciklov sekvenciranja za genomsko ter indeksno odčitavanje 1 in 2. Spodaj so navedena razpoložljiva polja za [Reads] (Odčitavanja) in njihovi opisi.

Polje	Zahtevano	Opis
»Read1Cycles« (Cikli odčitavanja 1)	Da	Število ciklov v prvem odčitavanju. Vrednost mora biti celo število, večje od nič.
»Read2Cycles« (Cikli odčitavanja 2)	Ne	Število ciklov v drugem odčitavanju.
»Index1Cycles« (Cikli indeksiranja 1)	Ne	Število ciklov v prvem indeksnem odčitavanju. Zahtevano za sekvenciranje več kot enega vzorca. Največ je 10 ciklov.
»Index2Cycles« (Cikli indeksiranja 2)	Ne	Število ciklov v drugem indeksnem odčitavanju. Največ je 10 ciklov.

## Zahteve za razdelek [Sequencing\_Settings] (Nastavitve sekvenciranja)

V razdelku [Sequencing\_Settings] (Nastavitve sekvenciranja) določite komplet za pripravo knjižnic, ki ga uporabljate.

Polje	Zahtevano	Opis
»LibraryPrepKits« (Kompleti za pripravo knjižnic)	Ne	<p>Komplet za pripravo knjižnic. Dovoljen je le en komplet za pripravo knjižnic.</p> <p>V programski opremi za nadzor NextSeq 1000/2000 Control Software v1.3 je zahtevani recept po meri samodejno izbran, če za komplet za pripravo knjižnic določite Illumina Stranded Total RNA Prep s kompletom Ribo-Zero Plus ali kompletom Illumina Stranded mRNA Prep.</p> <p>Vnesite eno od teh vrednosti.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Illumina Stranded Total RNA Prep s kompletom Ribo-Zero Plus – ILMNStrandedTotalRNA</li> <li>Komplet Illumina Stranded mRNA Prep – ILMNStrandedmRNA</li> </ul>

## Zahteve za razdelek »BCL Convert« (Pretvorba BCL)

V razdelkih »BCL Convert« (Pretvorba BCL) so na voljo informacije o pretvorbi podatkov iz BCL v FASTQ. Možnosti za pretvorbo BCL vključujejo dva ločena razdelka: [BCLConvert\_Settings] (Nastavitve pretvorbe BCL) in [BCLConvert\_Data] (Podatki pretvorbe BCL). Razdelki za pretvorbo BCL morajo vključevati informacije o sekvencah vmesnika indeksa. Če želite določiti združljivo sekvenco vmesnika za posamezno odčitavanje in indeksiranje, glejte *Sekvence vmesnika družbe Illumina (dokument št. 1000000002694)*.

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DragenRNA\_Settings] (Nastavitve za Dragen RNA).

Polje	Zahtevano	Opis
»SoftwareVersion« (Različica programske opreme)	Da	Različica programske opreme DRAGEN, ki je trenutno nameščena v sistemu. Uporabite vsa tri cela števila v imenu različice. Na primer 3.5.7.
»BarcodeMismatchesIndex1« (Neujemanja črtne kode za indeks 1)	Ne	Število dovoljenih neujemanj med prvim indeksnim odčitavanjem in indeksno sekvenco. Vrednosti so lahko 0,1 ali 2. Privzeta je vrednost 1.



Polje	Zahtevano	Opis
»BarcodeMismatchesIndex2« (Neujemanja črtne kode za indeks 2)	Ne	Število dovoljenih neujemanj med drugim indeksnim odčitavanjem in indeksno sekvenco. Vrednosti so lahko 0,1 ali 2. Privzeta je vrednost 1.
»FastqCompressionFormat« (Oblika zapisa stiskanja datoteke Fastq)	Ne	Če želite shraniti datoteko FASTQ kot datoteko *.gz, vnesite <code>gzip</code> . Če želite shraniti datoteko FASTQ kot datoteko *.ora in jo uporabiti z s funkcijo raztezanja v aplikaciji DRAGEN, vnesite <code>dragen</code> .
»AdapterRead1« (Odčitavanje vmesnika 1)	Ne	Sekvenca za obrezovanje ali maskiranje od konca odčitavanja 1. Sekvenca vmesnika za »Read 1« (Odčitavanje 1), ki vključuje A, C, G ali T. »AdapterRead1« (Odčitavanje vmesnika 1) privzeto obreže cikle.
»AdapterRead2« (Odčitavanje vmesnika 2)	Ne	Sekvenca za obrezovanje ali maskiranje od konca odčitavanja 2. Sekvenca vmesnika za »Read 2« (Odčitavanje 2), ki vključuje A, C, G ali T. »AdapterRead2« (Odčitavanje vmesnika 2) privzeto obreže cikle.
»OverrideCycles« (Cikli preglasitve)	Ne	Niz, uporabljen za določitev ciklov UMI in maskiranje ciklov odčitavanja. Dovoljene so te vrednosti: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N – določitev ciklov, ki bodo prezrti.</li> <li>• Y – določitev ciklov sekvenciranja.</li> <li>• I – določitev ciklov indeksiranja.</li> <li>• U – določitev ciklov UMI, ki bodo obrezani.</li> </ul> Vsak element je ločen s podpičjem. Spodaj so navedeni primeri vnosa nastavitve »OverrideCycles« (Cikli preglasitve). U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [BCLConvert\_Data] (Podatki za pretvorbo BCL).

Polje	Zahtevano	Opis
»Sample_ID« (ID vzorca)	Da	ID vzorca. ID vzorca lahko vsebuje največ 20 alfanumeričnih znakov, vezajev in podčrtajev. ID razlikuje med velikimi in malimi črkami. Posamezne identifikatorje ločite s črtico ali podčrtajem. Na primer »Sample1-DQB1-022515«.
»Index« (Indeks)	Ne	Indeksna sekvenca, povezana z vzorcem. Dovoljeni so samo A, C, T in G. Zahtevano za sekvenciranje več kot enega vzorca.
»Index2« (Indeks 2)	Ne	Druga indeksna sekvenca, povezana z vzorcem. Dovoljeni so samo A, C, T in G. Prepričajte se, da so sekvence vmesnika drugega indeksa (i5) usmerjene naprej. V aplikaciji DRAGEN so indeksi i5 samodejno obrnjeni med drugo analizo.
»Lane« (Pas)	Ne	Pas pretočne celice. Pasovi so označeni z enim celim številom.

## Nastavitve vzorčnega lista v aplikaciji DRAGEN

V tem poglavju so opisane zahteve vzorčnega lista za posamezen cevovod aplikacije DRAGEN. Dodajte nastavitve cevovoda DRAGEN kot zadnji razdelek vzorčnega lista. Uporabite lahko samo cevovod DRAGEN.

Posamezen cevovod DRAGEN vključuje ločene razdelke za nastavitve in podatke.

### Zahteve za cevovod DRAGEN Germline

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DragenGermline\_Settings].

Polje	Zahtevano	Opis
»SoftwareVersion« (Različica programske opreme)	Da	Različica programske opreme DRAGEN, ki je trenutno nameščena v sistemu. Uporabite vsa tri cela števila v imenu različice. Na primer 3.5.7. Različica programske opreme se mora ujemati z različico, ki je določena v razdelku »BCLConvert_Settings«.

Polje	Zahtevano	Opis
»ReferenceGenomeDir« (Imenik vzorčnega genoma)	Da	Ime vzorčnega genoma. Na primer hg19_alt_aware. Uporabite ime vzorčnega genoma na lokaciji <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Če želite uporabiti vzorčni genom po meri, glejte <i>Spletna pomoč za aplikacijo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
»MapAlignOutFormat« (Preslikava usklajene izhodne oblike zapisa)	Ne	Oblika zapisa datoteke z odčitki. Dovoljena je vrednost »bam« ali »cram«. Če ni določena nobena vrednost, je nastavljena privzeta vrednost »none«.
»KeepFastq« (Ohrani Fastq)	Ne	Če želite shraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>true</code> . Če želite odstraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>false</code> .

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DragenGermline\_Data].

Polje	Zahtevano	Opis
»Sample_ID« (ID vzorca)	Da	ID vzorca. ID vzorca lahko vsebuje največ 20 alfanumeričnih znakov. ID razlikuje med velikimi in malimi črkami. Posamezne identifikatorje ločite s črtico. Na primer »Sample1-DQB1-022515«. ID-ji vzorca se morajo ujemati z ID-ji, določenimi v razdelku »BCLConvert_Data«.

## Zahteve za cevovod DRAGEN RNA

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DragenRNA\_Settings].

Polje	Zahtevano	Opis
»SoftwareVersion« (Različica programske opreme)	Da	Različica programske opreme DRAGEN, ki je trenutno nameščena v sistemu. Uporabite vsa tri cela števila v imenu različice. Na primer 3.5.7. Različica programske opreme se mora ujemati z različico, ki je določena v razdelku »BCLConvert_Settings«.

Polje	Zahtevano	Opis
»ReferenceGenomeDir« (Imenik vzorčnega genoma)	Da	Ime vzorčnega genoma. Na primer hg38_noalt_with_decoy. Uporabite ime vzorčnega genoma na lokaciji /usr/local/illumina/genomes. Če želite uporabiti vzorčni genom po meri, glejte <i>Spletna pomoč za aplikacijo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
»RnaGeneAnnotationFile« (Datoteka z opombami o genu RNA)	Ne	Datoteka, ki vsebuje opombe o genu RNA. Dovoljeni so le alfanumerični znaki. Če element ni naveden, je uporabljena privzeta datoteka z opombami, ki je določena v vzorčnem genomu.
»MapAlignOutFormat« (Preslikava usklajene izhodne oblike zapisa)	Ne	Oblika zapisa datoteke z odčitki. Dovoljena je vrednost »bam« ali »cram«. Če ni določena nobena vrednost, je nastavljena privzeta vrednost »none«.
»KeepFastq« (Ohrani Fastq)	Ne	Če želite shraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>true</code> . Če želite odstraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>false</code> .
»DifferentialExpressionEnable« (Omogoči diferencialno izražanje)	Ne	Če želite omogočiti diferencialno izražanje genov, vnesite <code>true</code> . Vnesite <code>false</code> , da izključite diferencialno izražanje genov iz analize.

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DragenRna\_Data].

Polje	Zahtevano	Opis
»Sample_ID« (ID vzorca)	Da	ID vzorca. ID vzorca lahko vsebuje največ 20 alfanumeričnih znakov. ID razlikuje med velikimi in malimi črkami. Posamezne identifikatorje ločite s črtico. Na primer »Sample1-DQB1-022515«. ID-ji vzorca se morajo ujemati z ID-ji, določenimi v razdelku »BCLConvert_Data«.
»Comparison<N>« (Primerjava<N>)	Ne	Vrednost nadzora ali primerjave posameznega vzorca. Če za vzorec ni navedena vrednost nadzora ali primerjave, je vzorcu dodeljena vrednost <code>na</code> . Vsi vzorci, za katere je navedena vrednost nadzora, so primerjani z vzorci, ki imajo navedeno vrednost primerjave. Vrednost <code>N</code> predstavlja skupino primerjave vzorcev.

## Zahteve za cevovod DRAGEN Enrichment

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DragenEnrichment\_Settings].

Polje	Zahtevano	Opis
»SoftwareVersion« (Različica programske opreme)	Da	Različica programske opreme DRAGEN, ki je trenutno nameščena v sistemu. Uporabite vsa tri cela števila v imenu različice. Na primer 3.5.7. Različica programske opreme se mora ujemati z različico, ki je določena v razdelku »BCLConvert_Settings«.
»ReferenceGenomeDir« (Imenik vzorčnega genoma)	Da	Ime vzorčnega genoma. Na primer hg38_alt_aware. Vzorčni genomi so na lokaciji <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Če želite uporabiti vzorčni genom po meri, glejte <i>Spletna pomoč za aplikacijo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
»BedFile« (Datoteka bed)	Da	Datoteka bed z regijami, ki jih želite uporabiti.
»GermlineOrSomatic« (Germline ali Somatic)	Da	Če želite izvesti analizo Enrichment Germline, vnesite <code>germline</code> . Če želite izvesti analizo Enrichment Somatic, vnesite <code>somatic</code> .
»KeepFastq« (Ohrani Fastq)	Ne	Če želite shraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>true</code> . Če želite odstraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>false</code> .
»MapAlignOutFormat« (Preslikava usklajene izhodne oblike zapisa)	Ne	Oblika zapisa datoteke z odčitki. Dovoljena je vrednost »bam« ali »cram«. Če ni določena nobena vrednost, je nastavljena privzeta vrednost »none«.
»AuxNoiseBaselineFile« (Dodatna datoteka Noise Baseline)	Ne	Ime datoteke Noise Baseline. Uporabite lahko obliko zapisa datoteke *.txt ali *.gz. Datoteke Noise Baseline so na voljo samo pri uporabi načina somatic. Za več informacij glejte <a href="#">Uvoz datotek Noise Baseline na strani 18</a> .

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DrogenEnrichment\_Data].

Polje	Zahtevano	Opis
»Sample_ID« (ID vzorca)	Da	ID vzorca. ID vzorca lahko vsebuje največ 20 alfanumeričnih znakov. ID razlikuje med velikimi in malimi črkami. Posamezne identifikatorje ločite s črtico. ID-ji vzorca »Sample1-DQB1-022515.Sample« se morajo na primer ujemati z ID-ji, določenimi v razdelku »BCLConvert_Data«.

## Zahteve za cevovod DRAGEN DNA Amplicon

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DrogenAmplicon\_Settings].

Polje	Zahtevano	Opis
»SoftwareVersion« (Različica programske opreme)	Da	Različica programske opreme DRAGEN, ki je trenutno nameščena v sistemu. Uporabite vsa tri cela števila v imenu različice. Na primer 3.5.7. Različica programske opreme se mora ujemati z različico, ki je določena v razdelku »BCLConvert_Settings«.
»ReferenceGenomeDir« (Imenik vzorčnega genoma)	Da	Ime vzorčnega genoma. Na primer hg38_alt_aware. Vzorčni genomi so na lokaciji <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Če želite uporabiti vzorčni genom po meri, glejte <i>Spletna pomoč za aplikacijo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
»DnaBedFile« (Datoteka DNA Bed)	Da	Datoteka bed z regijami, ki jih želite uporabiti. Datoteko bed lahko vnesete v obliki zapisa *.txt ali *.gz.
»DnaGermlineOrSomatic« (DNA – germline ali somatic)	Da	Če želite izvesti analizo DNA Amplicon Germline, vnesite <code>germline</code> . Če želite izvesti analizo DNA Amplicon Somatic, vnesite <code>somatic</code> .
»KeepFastq« (Ohrani Fastq)	Ne	Če želite shraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>true</code> . Če želite odstraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>false</code> .

Polje	Zahtevano	Opis
»MapAlignOutFormat« (Preslikava usklajene izhodne oblike zapisa)	Ne	Oblika zapisa datoteke z odčitki. Dovoljena je vrednost »bam« ali »cram«. Če ni določena nobena vrednost, je nastavljena privzeta vrednost »none«.

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DragenAmplicon\_Data].

Polje	Zahtevano	Opis
»Sample_ID« (ID vzorca)	Da	ID vzorca. ID vzorca lahko vsebuje največ 20 alfanumeričnih znakov. ID razlikuje med velikimi in malimi črkami. Posamezne identifikatorje ločite s črtico. ID-ji vzorca »Sample1-DQB1-022515.Sample« se morajo na primer ujemati z ID-ji, določenimi v razdelku »BCLConvert_Data«.
»DnaOrRna« (DNA ali RNA)	Da	Vrsta analize Amplicon, ki jo želite izvesti. DRAGEN v3.8 podpira samo analize DNA. Vnesite dna.

## Zahteve za cevovod DRAGEN Single Cell RNA

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DragenSingleCellRNA\_Settings]. Informacije o združljivosti kompleta drugega izdelovalca so na voljo na strani s podporo za združljivost platforme DRAGEN Bio-IT.

### Komplet za pripravo knjižnic za eno celico 1—5

Spodnje nastavitve vzorčnega lista veljajo za komplete za pripravo knjižnic z enako genetsko strukturo kot kompleti za pripravo knjižnic 1–5 za DRAGEN Single Cell. Genetsko strukturo za svoj komplet potrdite na strani s podporo za združljivost platforme DRAGEN Bio-IT.

Polje	Zahtevano	Opis
»SoftwareVersion« (Različica programske opreme)	Da	Različica programske opreme DRAGEN, ki je trenutno nameščena v sistemu. Uporabite vsa tri cela števila v imenu različice. Na primer 3.5.7. Različica programske opreme se mora ujemati z različico, ki je določena v razdelku »BCLConvert_Settings«.

Polje	Zahtevano	Opis
»ReferenceGenomeDir« (Imenik vzorčnega genoma)	Da	Ime vzorčnega genoma. Na primer hg38_alt_aware. Vzorčni genomi so na lokaciji /usr/local/illumina/genomes. Če želite uporabiti vzorčni genom po meri, glejte <i>Spletna pomoč za aplikacijo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
»RnaLibraryType« (Vrsta knjižnice RNA)	Ne	Vnesite eno od teh vrednosti: <ul style="list-style-type: none"> <li>• SF – verižno naprej. SF je privzeta vrednost.</li> <li>• SR– verižno nazaj.</li> <li>• U – neverižno.</li> </ul>
»RnaGeneAnnotationFile« (Datoteka z opombami o genu RNA)	Ne	Datoteka, ki vsebuje opombe o genu RNA. Dovoljeni so le alfanumerični znaki. Če element ni naveden, je uporabljena privzeta datoteka z opombami, ki je določena v vzorčnem genomu.
»BarcodeRead« (Odčitavanje črtne kode)	Ne	Lokacija odčitavanja črtne kode v izvedbi sekvenciranja, ki vsebuje črtno kodo in UMI. Vrednosti lahko vključuje način <code>Read1</code> (Odčitavanje 1) ali <code>Read2</code> (Odčitavanje 2). Privzeta vrednost je <code>Read1</code> (Odčitavanje 1).
»BarcodePosition« (Položaj črtne kode)	Da	Lokacija baz, ki ustreza črtni kodi v vrednosti, vneseni za »BarcodeRead« (Odčitavanje črtne kode). Položaji baze so indeksirani z začetkom v položaju nič. Vnesite vrednost za »BarcodePosition« (Položaj črtne kode) v tej obliki zapisa: <code>0_&lt;barcode end position&gt;</code> Če črtna koda na primer vsebuje 16 baz, je vrednost <code>0_15</code> .
»UmiPosition« (Položaj UMI)	Da	Lokacija baz, ki ustreza UMI-ju v vrednosti, vneseni za »BarcodeRead« (Odčitavanje črtne kode). Vnesite vrednost za »BarcodePosition« (Položaj črtne kode) v tej obliki zapisa: <code>&lt;UMI start position&gt;_&lt;UMI end position&gt;</code> Če UMI na primer vsebuje 10 baz, črtna koda pa jih vsebuje 16, je vrednost <code>16_25</code> .



Polje	Zahtevano	Opis
»BarcodeSequenceWhitelist« (Seznam sekvenc črtne kode)	Ne	Ime datoteke s sekvencami črtne kode, ki jih želite vključiti. Ime datoteke lahko vključuje le alfanumerične znake, črtice, podčrtaje in pike.
»KeepFastq« (Ohrani Fastq)	Ne	Če želite shraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>true</code> . Če želite odstraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>false</code> .
»MapAlignOutFormat« (Preslikava usklajene izhodne oblike zapisa)	Ne	Oblika zapisa datoteke z odčitki. Dovoljena je vrednost »bam« ali »cram«. Če ni določena nobena vrednost, je nastavljena privzeta vrednost »none«.

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DrogenSingleCellRNA\_Data].

Polje	Zahtevano	Opis
»Sample_ID« (ID vzorca)	Da	ID vzorca. ID vzorca lahko vsebuje največ 20 alfanumeričnih znakov. ID razlikuje med velikimi in malimi črkami. Posamezne identifikatorje ločite s črtico. ID-ji vzorca »Sample1-DQB1-022515.Sample« se morajo na primer ujemati z ID-ji, določenimi v razdelku »BCLConvert_Data«.

## Komplet za pripravo knjižnic za eno celico 6

Spodnje nastavitve vzorčnega lista veljajo za komplete za pripravo knjižnic z enako genetsko strukturo, kot kompleti za pripravo knjižnic DRAGEN Single Cell 6. Genetsko strukturo za svoj komplet potrdite na strani s podporo za združljivost platforme DRAGEN Bio-IT.

Polje	Zahtevano	Opis
»SoftwareVersion« (Različica programske opreme)	Da	Različica programske opreme DRAGEN, ki je trenutno nameščena v sistemu. Uporabite vsa tri cela števila v imenu različice. Na primer 3.5.7. Različica programske opreme se mora ujemati z različico, ki je določena v razdelku »BCLConvert_Settings«.

Polje	Zahtevano	Opis
»ReferenceGenomeDir« (Imenik vzorčnega genoma)	Da	Ime vzorčnega genoma. Na primer hg38_alt_aware. Vzorčni genomi so na lokaciji /usr/local/illumina/genomes. Če želite uporabiti vzorčni genom po meri, glejte <i>Spletna pomoč za aplikacijo Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
»RnaLibraryType« (Vrsta knjižnice RNA)	Ne	Vnesite eno od teh vrednosti: <ul style="list-style-type: none"> <li>• SF – verižno naprej.</li> <li>• SR – verižno nazaj.</li> <li>• U – neverižno.</li> </ul>
»RnaGeneAnnotationFile« (Datoteka z opombami o genu RNA)	Ne	Datoteka, ki vsebuje opombe o genu RNA. Dovoljeni so le alfanumerični znaki. Če element ni naveden, je uporabljena privzeta datoteka z opombami, ki je določena v vzorčnem genomu.
»BarcodeRead« (Odčitavanje črtne kode)	Ne	Lokacija odčitavanja črtne kode v izvedbi sekvenciranja, ki vsebuje črtno kodo in UMI. Vrednosti lahko vključuje način <code>Read1</code> (Odčitavanje 1) ali <code>Read2</code> (Odčitavanje 2). Privzeta vrednost je <code>Read1</code> (Odčitavanje 1).
»BarcodePosition« (Položaj črtne kode)	Da	Lokacija baz, ki ustreza črtnim kodam v vrednosti, vneseni za »BarcodeRead« (Odčitavanje črtne kode). Položaji baze so indeksirani z začetkom v položaju nič. Vnesite vrednost za »BarcodePosition« (Položaj črtne kode) v tej obliki zapisa: <pre>0_&lt;first barcode end position&gt;+&lt;second barcode start position&gt;_&lt;second barcode end position&gt;+&lt;third barcode start position&gt;_&lt;third barcode end position&gt;</pre> Za to strukturo bi bila na primer izbrana vrednost <code>0_8+21_29+43_51</code> : <ul style="list-style-type: none"> <li>• 9 baz v prvi črtni kodi (0_8).</li> <li>• 12 baz med prvo in drugo črtno kodo.</li> <li>• 9 baz v drugi črtni kodi (21_29).</li> <li>• 13 baz med drugo in tretjo črtno kodo.</li> <li>• 9 baz v tretji črtni kodi (43_51).</li> </ul>

Polje	Zahtevano	Opis
»UmiPosition« (Položaj UMI)	Da	Lokacija baz, ki ustreza UMI-ju v določenem polju »BarcodeRead« (Odčitavanje črtne kode). Vnesite niz v tej obliki zapisa: <UMI start position>_<UMI end position> Če na primer UMI vključuje 8 baz in je skupno število baz pred UMI-jem 51, je vrednost 52_59.
»BarcodeSequenceWhitelist« (Seznam sekvenc črtne kode)	Ne	Ime datoteke s sekvenco črtne kode, ki jih želite dodati na seznam. Ime datoteke lahko vključuje le alfanumerične znake, črtice, podčrtaje in pike.
»KeepFastq« (Ohrani Fastq)	Ne	Če želite shraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>true</code> . Če želite odstraniti datoteke FASTQ z odčitki, vnesite vrednost <code>false</code> .
»MapAlignOutFormat« (Preslikava usklajene izhodne oblike zapisa)	Ne	Oblika zapisa datoteke z odčitki. Dovoljena je vrednost »bam« ali »cram«. Če ni določena nobena vrednost, je nastavljena privzeta vrednost »none«.

Spodaj so navedena razpoložljiva polja in opisi za [DragenSingleCellRNA\_Data].

Polje	Zahtevano	Opis
»Sample_ID« (ID vzorca)	Da	ID vzorca. ID vzorca lahko vsebuje največ 20 alfanumeričnih znakov. ID razlikuje med velikimi in malimi črkami. Posamezne identifikatorje ločite s črtico. ID-ji vzorca »Sample1-DQB1-022515.Sample« se morajo na primer ujemati z ID-ji, določenimi v razdelku »BCLConvert_Data«.

## Sekvenciranje temnega cikla

V tem poglavju je opisan način sekvenciranja temnega cikla v receptu.

Sekvenciranje temnega cikla je uporabljeno samo za dokončanje kemičnih korakov cikla sekvenciranja. Oglejte si stran z združljivimi izdelki za komplet za pripravo knjižnice na [spletnem mestu s podporo družbe Illumina](#) in preverite, ali je zahtevano sekvenciranje temnega cikla.

Izvedite te korake za sekvenciranje temnega cikla.

## Urejanje datoteke z receptom

1. Prenesite datoteko XML z receptom s [spletnega mesta s podporo družbe Illumina](#).
2. Uredite datoteko XML z receptom.
  - a. Določite ustrezen razdelek protokola glede na konfiguracijo odčitavanja in indeksnega sekvenciranja. Za urejanje je na voljo šest različnih protokolov na recept po meri. Protokol za eno odčitavanje »Read 1« (Odčitavanje 1) brez konfiguracije indeksnega sekvenciranja je na primer `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
  - b. Pred `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` in `<ReadRef ReadName="Read 2"/>` vnesite ta korak temnega cikla v novo vrstico.
 

```
<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />
```
  - c. Vnesite korak temnega cikla v novo vrstico za posamezen zahtevan temni cikel.
3. Shranite datoteko XML z receptom.

Spodaj je naveden vzorčni recept s temnim ciklom:

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

## Pripenjanje recepta izvedbi sekvenciranja

- 1 V razdelku »Run Setup« (Nastavitev izvedbe) v programski opremi za nadzor izberite **Choose** (Izberi) v razdelku »Custom Recipe« (Recept po meri).
- 2 Pomaknite se do posodobljene datoteke XML z receptom.
- 3 Izberite **Open** (Odpri).
- 4 Vrnite se v razdelek [Začetek izvedbe sekvenciranja na strani 46](#) (Začetek izvedbe sekvenciranja).

# Kazalo

## %

%PF 58

## A

algoritem Phred 59

alkoholni robčki 28

analiza

metode 5, 9

analiza slike 5

analiza v oblaku 1

## B

BaseSpace Sequence Hub 1

dokumentacija 14

nastavitve 14

bcl2fastq2 54

blazinice 28

brez dodelitev 56

brisanje izvedb 6, 74

## C

CE 54

cikli odčitavanja 31

Compute Engine 54

## D

datoteka .xml s podatki o poizvedbi 60

datoteke BCL 6

datoteke CBCL 58

datoteke InterOp 54, 60

datoteke s filtri 54, 60

datoteke za dodelitev baze 9, 54, 60

datum poteka 78

delci recepta 6

denaturiranje 8

disk D 74

dnevnik napak 55

dnevniške datoteke 55

dodatni cikli 31

dodelitev baze 5

dokumentacija 106

dolžine odčitavanja 31

domene 14

dvokanalno sekvenciranje 57

## E

električna vtičnica 4

električni kabel 4

ethernetna vrata 4

ethernetni kabel 4

## F

faziranje in predfaziranje 56

filter čistosti 58

filtriranje gruč 58

## G

garancija 28

gostujoča lokacija 14

gumb za vklop/izklop 3, 82

## I

ikone 6

Illumina Proactive Support (Proaktivna podpora Illumina) 14

ime računalnika 6

indeks

cikli 31

informativni dokumenti 59

inicializacija 83

neuspela 82

internetna povezava 14

izgubljene povezave 82

izvedbe

metrike 54

## J

jakosti gruče 56

## K

kakovost podatkov 58  
kamere 55  
kartuša  
    smer vstavljanja 51  
kataloške številke 27  
knjižnice  
    denaturiranje 8  
komplet za testiranje 28  
kompleti 27  
    kataloške številke 28

## L

Local Run Manager 5  
lokacija strežnika 14  
lokalna analiza 1

## M

mapa izvedbe 74  
mapa z odčitki 50, 74  
mesta gruč 54, 60  
miška 4  
monitor 3

## N

nadomestni RSB 27  
namestitev programske opreme 74  
nano vdolbinice 56  
napake 6, 82  
    sporočila 80  
    verjetnost 58-59  
napake registracije 56  
naročnina za podjetja 14  
naslov IP 6  
nastavitev izvedbe 31

nastavitve zvoka 21  
ni dodelitev 57  
nukleotidi 57

## O

ocene kakovosti 58-59  
odčitavanje z ene strani 50  
operacijski sistem 83  
opozorila 6, 74, 82  
orodje za namestitev zbirke sistema 74  
oštevilčenje ploščic 56  
oštevilčenje površin 56

## P

parametri izvedbe  
    urejanje 50  
pasovi 55  
PhiX 28  
    usklajevanje 54  
PhiX Control v3 27  
ploščice 54  
podatki o učinkovitosti delovanja 14  
podatki o učinkovitosti delovanja  
    instrumenta 14  
podpora strankam 106  
poimenovanje  
    ime instrumenta 21  
    ime računalnika 6  
pomnožitev 8  
pomoč, tehnična 106  
ponoven zagon 80  
posoda za zbiranje tekočine  
    blazinice 28  
poti UNC 50  
potrošna oprema  
    skeniranje 51  
potrošni material  
    spremljanje 1  
predal za potrošni material 3  
preklopno stikalo 4, 82  
premikanje 4

- preslikani pogoni 50
- pretvorba FASTQ 54
- preverjanje sistema 80
- primeri 31
- privzeta mapa z odčitki 50
- proga 56
- proge 55
- programska oprema
  - namestitve 74
  - opozorila o posodobitvah 22
- prostor na disku 6, 74
- pufer za resuspendiranje 27

## R

- rdeči kanal 57
- reagenti NextSeq 1000/2000 27
- recepti 74
- redčenje knjižnic 8
- rezervni deli 78
- robčki z belilom 28
- ročne posodobitve programske opreme 74

## S

- samodejne posodobitve 74
- Sequencing Analysis Viewer 54, 56
- serijska številka 6
- sličice 60
- slikanje 54-55
- slike 54
- specifikacije hladilnika 28
- specifikacije zamrzovalnika 28
- spremljanje potrošnega materiala 1
- stanje izvedbe 6
- strani s podporo 74

## Š

- številke ciklov 31
- število izvedb 6

## T

- tabele kakovosti 59
- tehnična pomoč 106
- tipkovnice 4
- tovarniške nastavitve 84-85
- trdi disk 6, 74

## U

- Universal Copy Service 5, 74
- upravljanje postopka 74
- urejanje parametrov izvedbe 50
- uskladitev specifikacij 82
- uspešno filtrirano (PF) 58
- ustvarjanje predloge 56

## V

- velikost izvedbe 74
- ventilatorji 78
- vrata
  - zapiranje 51
- vrata USB 4
- vrednosti jakosti 56
- vrstica stanja 3
- vrstica z lučkami 3
- vzdevek 21

## W

- Windows
  - prijava 83

## Z

- z obeh strani 50
- začetno nastavljanje 78, 84-85
- zamenjava s starejšo različico 84-85
- zasebna domena 14
- zaustavitev 82
- zbirka programske opreme 1, 5
- zeleni kanal 57



zračni filtri

    dodatni filtri 28

    položaj 78

zvočne nastavitve 21

# Tehnična pomoč

Če želite tehnično pomoč, se obrnite na tehnično podporo družbe Illumina.

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

E-pošta: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Telefonske številke tehnične podpore družbe Illumina

Regija	Brezplačna št.	Mednarodno
Avstralija	+61 1800 775 688	
Avstrija	+43 800 006249	+43 1 9286540
Belgija	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
Danska	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
Filipini	+63 180016510798	
Finska	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
Francija	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Hongkong, Kitajska	+852 800 960 230	
Indija	+91 8006500375	
Indonezija		0078036510048
Irska	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Italija	+39 800 985513	+39 236003759
Japonska	+81 0800 111 5011	
Južna Koreja	+82 80 234 5300	
Kanada	+1 800 809 4566	
Kitajska		+86 400 066 5835
Malezija	+60 1800 80 6789	
Nemčija	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Nizozemska	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Norveška	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Nova Zelandija	+64 800 451 650	
Singapur	1 800 5792 745	

Regija	Brezplačna št.	Mednarodno
Španija	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Švedska	+46 2 00883979	+46 8 50619671
Švica	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Tajska	+66 1800 011 304	
Tajvan, Kitajska	+886 8 06651752	
Vietnam	+84 1206 5263	
ZDA	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Združeno kraljestvo	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197

**Varnostni listi** – na voljo na spletnem mestu družbe Illumina na naslovu [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

**Dokumentacija izdelka** – na voljo za prenos v na spletnem mestu [support.illumina.com](https://support.illumina.com).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (zunaj Severne Amerike)

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

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

**Samo za raziskave. Ni namenjeno uporabi v diagnostičnih postopkih.**

© 2021 Illumina, Inc. Vse pravice so pridržane.

**illumina**<sup>®</sup>