

# MiniSeq

## Systemhandbuch



Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. und deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit dem Gebrauch des hier beschriebenen Produkts (der hier beschriebenen Produkte) und für keinen anderen Bestimmungszweck ausgelegt. Dieses Handbuch und dessen Inhalt dürfen ohne schriftliches Einverständnis von Illumina nicht verwendet und zu keinem anderen Zweck verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichen Recht bzw. ähnlichen Rechten an Drittparteien.

Die Anweisungen in diesem Dokument müssen von qualifiziertem und entsprechend ausgebildetem Personal genau befolgt werden, damit die in diesem Dokument beschriebene Anwendung der Produkte sicher und ordnungsgemäß erfolgt. Vor der Verwendung dieser Produkte muss der Inhalt dieses Dokuments vollständig gelesen und verstanden worden sein.

FALLS NICHT ALLE HIERIN AUFGEFÜHRTEN ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN, WAS ZU EINEM ERLÖSCHEN DER PRODUKTGARANTIE FÜHRT.

ILLUMINA ÜBERNIMMT KEINERLEI HAFTUNG FÜR SCHÄDEN, DIE AUS DER UNSACHGEMÄSSEN VERWENDUNG DER HIERIN BESCHRIEBENEN PRODUKTE (EINSCHLIESSLICH TEILEN HIERVON ODER DER SOFTWARE) ENTSTEHEN.

© 2018 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind das Eigentum von Illumina, Inc. oder ihrer jeweiligen Inhaber. Weitere Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Versionshistorie

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Material-Nr. 20014309 Dokument-Nr. 1000000002695 v02	März 2018	Informationen zum Überwachungsdienst Illumina Proactive im Abschnitt „Konfigurieren der Analyseeinstellungen“ hinzugefügt. Der Standard-Benutzername und das Standard-Kennwort für die Anmeldung beim Betriebssystem wurden entfernt. Illumina empfiehlt die Verwendung standortspezifischer Anmeldeinformationen. Geringfügige Textänderungen
Material-Nr. 20014309 Dokument-Nr. 1000000002695 v01	September 2016	Aktualisierte Software-Beschreibungen zu MiniSeq Control Software v1.1.8, die den Demomodus enthält. Aktualisierung der Dauer des automatischen Nachwaschlaufs auf 60 Minuten. Hinzufügen eines Serverkonfigurationsschritts zu den Anweisungen für die Auswahl von BaseSpace für die Analyse. Hinweis hinzugefügt, dass zugeordnete Laufwerke nicht von der Local Run Manager-Software unterstützt werden.
Material-Nr. 20002370 Dokument-Nr. 1000000002695 v00	Januar 2016	Erste Version.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Kapitel 1 Überblick</b> .....	<b>1</b>
Einleitung .....	1
Weitere Ressourcen .....	1
Gerätekomponenten .....	2
Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien – Überblick .....	5
Vorinstallierte Datenbanken und Genome .....	8
<b>Kapitel 2 Erste Schritte</b> .....	<b>9</b>
Starten des Geräts .....	9
Anpassen der Systemeinstellungen .....	10
Konfigurieren der Analyseinstellungen .....	12
Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	16
<b>Kapitel 3 Sequenzierung</b> .....	<b>19</b>
Einleitung .....	19
Sequenzierungsworkflow .....	20
Vorbereiten der Verbrauchsmaterialien .....	22
Vorbereiten von Bibliotheken für die Sequenzierung .....	23
Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs .....	24
Überwachen des Lauffortschritts .....	32
Automatischer Nachwaschlauf .....	34
Herausnehmen des gebrauchten Behälters in Position 9 .....	34
<b>Kapitel 4 Wartung</b> .....	<b>37</b>
Einleitung .....	37
Durchführen eines manuellen Gerätewaschlaufs .....	37
Software-Updates .....	40
<b>Anhang A Fehlerbehebung</b> .....	<b>43</b>
Dateien für die Fehlerbehebung .....	43
Fehler beim automatischen Selbsttest .....	44
RTA-Fehler .....	46
Workflow für die Rehybridisierung .....	46
Systemprüfung .....	48
Netzwerkkonfigurationseinstellungen .....	51
Anwendungsspezifische Genome .....	52
Ausschalten des Geräts .....	52
<b>Anhang B Echtzeitanalyse</b> .....	<b>55</b>
Überblick über die Echtzeitanalyse .....	55
Eingabe- und Ausgabedateien .....	55
Echtzeitanalyse-Workflow .....	56

<b>Anhang C Ausgabedateien</b> .....	<b>59</b>
Sequenzierungsausgabedateien .....	59
Ordnerstruktur der Sequenzierungsausgabedaten .....	59
Für die Analyse erforderliche Eingabedateien .....	60
 <b>Index</b> .....	 <b>61</b>
 <b>Technische Unterstützung</b> .....	 <b>64</b>

# Kapitel 1 Überblick

Einleitung .....	1
Weitere Ressourcen .....	1
Gerätekomponenten .....	2
Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien – Überblick .....	5
Vorinstallierte Datenbanken und Genome .....	8

## Einleitung

Das Illumina® MiniSeq™-System bietet die dem Industriestandard und den hohen Qualitätsanforderungen entsprechende Sequenzierungstechnologie von Illumina und den Bedienkomfort eines benutzerfreundlichen, kostengünstigen Desktopsystems.

## Merkmale

- ▶ **Sequenzierung mit hohem Qualitätsstandard:** Das MiniSeq-System ermöglicht die Sequenzierung von kleinen Genomen und von Amplikonen sowie eine gezielte Anreicherung und RNA-Sequenzierung unter Verwendung geringer Bibliotheks-Volumina.
- ▶ **MiniSeq-Systemsoftware:** Im MiniSeq-System ist eine Software-Suite integriert, die die Vorgänge auf dem Gerät steuert, Bilder verarbeitet und Base-Calls generiert. Die Suite enthält zudem eine Software für die Datenanalyse im Gerät sowie Datenübertragungstools, die die Datenanalyse mit anderen Methoden, z. B. BaseSpace, ermöglichen.
  - ▶ **Datenanalyse im Gerät:** Die Local Run Manager-Software analysiert die Laufdaten gemäß dem für den Lauf angegebenen Analysemodul. Es sind verschiedene Analysemodule in der Software enthalten.
  - ▶ **BaseSpace®-Integration:** Der Sequenzierungsworkflow ist mit BaseSpace, der Genomik-Computing-Umgebung von Illumina für die Laufüberwachung, Datenanalyse, Speicherung und Zusammenarbeit, integriert. Die Ausgabedateien werden zur Analyse in Echtzeit nach BaseSpace bzw. BaseSpace Onsite gestreamt.
- ▶ **Komfortables Laden von Verbrauchsmaterialien:** Ein Klemmmechanismus positioniert die Fließzelle beim Laden in das Gerät. Eine Reagenzienkartusche zum Einmalgebrauch enthält die Reagenzien für einen Lauf und den anschließenden Gerätewaschlauf. Die Fließzelle und die Reagenzienkartusche lassen sich anhand einer eindeutigen Kennung präzise nachverfolgen.

## Weitere Ressourcen

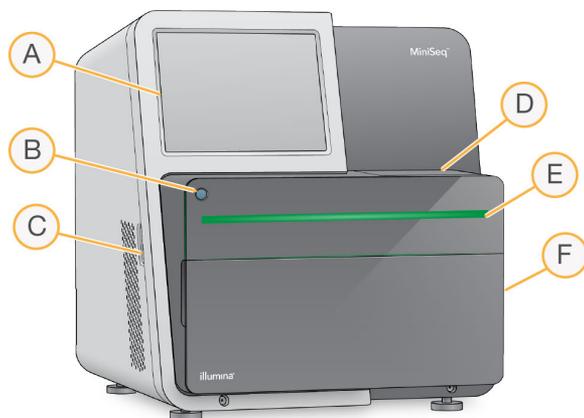
Auf den [Supportseiten zum MiniSeq-System](#) auf der Illumina-Website finden Sie weitere Ressourcen. Diese umfassen Software, Schulungsmaterial, Informationen zu kompatiblen Produkten und die folgende Dokumentation. Vergewissern Sie sich stets auf den Supportseiten, dass Sie über die aktuellen Versionen verfügen.

Ressource	Beschreibung
<i>Custom Protocol Selector</i>	Ein Assistent zum Erstellen einer anwendungsspezifischen End-to-End-Dokumentation, die auf das für den Sequenzierungslauf verwendete Bibliotheksvorbereitungsverfahren, die Laufparameter und die Analysemethoden zugeschnitten ist.
<i>MiniSeq-System Handbuch zur Standortvorbereitung (Dokument-Nr. 1000000002696)</i>	Enthält Spezifikationen für den Arbeitsplatz, die elektrischen Anforderungen und die Umgebungsbedingungen.
<i>MiniSeq-System Sicherheits- und Compliance-Handbuch (Dokument-Nr. 1000000002698)</i>	Bietet Informationen zur Betriebssicherheit, zu Compliance-Erklärungen sowie zu Gerätekennzeichnungen.
<i>RFID Reader Compliance-Handbuch (Dokument-Nr. 1000000002699)</i>	Bietet Informationen zum integrierten RFID Reader des Geräts, Compliance-Zertifizierungen sowie sicherheitsbezogene Informationen.
<i>MiniSeq-System Handbuch zum Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken (Dokument-Nr. 1000000002697)</i>	Bietet Anweisungen zum Denaturieren und Verdünnen von vorbereiteten Bibliotheken für einen Sequenzierungslauf sowie zum Vorbereiten einer optionalen PhiX-Kontrolle.
<i>Local Run Manager Softwarehandbuch (Dokument-Nr. 1000000002702)</i>	Bietet Informationen zur Verwendung der Local Run Manager-Software und der verfügbaren Analyseoptionen.

## Gerätekomponenten

Zum MiniSeq-System gehören ein Touchscreen-Monitor, eine Statusleiste, eine Fließzellen- und eine Reagenzienkammer.

Abbildung 1 Gerätekomponenten

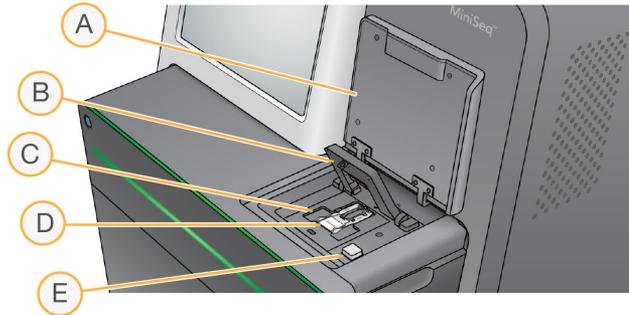


- A **Touchscreen-Monitor:** Ermöglicht die Systemkonfiguration und -einrichtung am Gerät über die Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware.
- B **Ein/Aus-Taste:** Mit dieser Taste werden der integrierte Gerätecomputer eingeschaltet und das Betriebssystem aktiviert.
- C **USB-Anschlüsse:** Ermöglichen den einfachen Anschluss von Peripheriegeräten.
- D **Fließzellenkammer:** Enthält während eines Sequenzierungslaufs die Fließzelle.
- E **Statusleiste:** Gibt den Gerätestatus an, z. B. „In Arbeit“ (blau), „Überprüfung erforderlich“ (orange), „Bereit zum Sequenzieren“ (grün) oder dass in den nächsten 24 Stunden ein Waschlauf durchgeführt werden muss (gelb).
- F **Reagenzienkammer:** Enthält die Reagenzienkartusche und die Flasche für verbrauchte Reagenzien.

## Fließzellenkammer

Der Fließzellentisch verfügt über einen Fließzellenriegel, der die Fließzelle in Position hält, wenn er verriegelt wird. Beim Schließen des Riegels richten Stifte an der Unterseite des Riegels die Fließzellenanschlüsse an den Fluidikanschlüssen aus.

Abbildung 2 Fließzellenkammer



- A Tür der Fließzellenkammer
- B Fließzellenriegel
- C Fließzellentisch
- D Fließzelle
- E Freigabeknopf des Fließzellenriegels

Die thermische Station unter dem Fließzellentisch steuert die für die Clusterbildung und die Sequenzierung erforderlichen Temperaturänderungen.



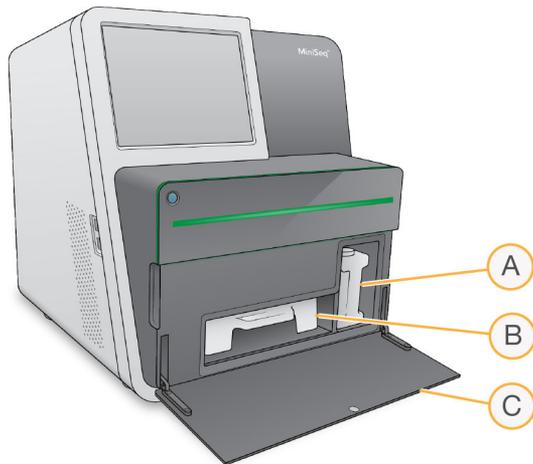
### HINWEIS

Stellen Sie keine Gegenstände neben der Fließzellenkammer auf das Gerät.

## Reagenzienkammer

Zum Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs auf dem MiniSeq-System ist der Zugang zur Reagenzienkammer erforderlich, um die Verbrauchsmaterialien für den Lauf zu laden und die Flasche für verbrauchte Reagenzien zu leeren.

Abbildung 3 Reagenzienkammer



- A **Flasche für verbrauchte Reagenzien:** Hat einen Schraubdeckel, um zu verhindern, dass die Flüssigkeit beim Transport der Flasche verschüttet wird.
- B **Reagenzienkartusche:** Mit Reagenzien vorgefülltes Verbrauchsmaterial für den Einmalgebrauch.
- C **Tür der Reagenzienkammer:** Bietet Zugang zur Reagenzienkammer.

Die Tür der Reagenzienkammer lässt sich an den Scharnieren an der Unterseite des Geräts nach außen öffnen. Um die Tür zu öffnen, ziehen Sie sie vorsichtig an den Seitenkanten nach vorne.

**HINWEIS**

Stellen Sie keine Gegenstände auf die Tür der Reagenzienkammer. Die Kammertür ist nicht zur Nutzung als Ablage geeignet.

**Ein/Aus-Taste**

Mit der Ein/Aus-Taste auf der Vorderseite des Geräts werden das Gerät und der Gerätecomputer eingeschaltet. Die Ein/Aus-Taste des Geräts führt je nach Status der Gerätenetzspannung die folgenden Aktionen durch.

Ein/Aus-Status	Aktion
Gerät ist ausgeschaltet	Drücken Sie kurz die Ein/Aus-Taste, um das Gerät einzuschalten.
Gerät ist eingeschaltet	Drücken Sie kurz die Ein/Aus-Taste, um das Gerät auszuschalten. Ein Dialogfeld erscheint, um ein normales Herunterfahren des Geräts zu bestätigen.
Gerät ist eingeschaltet	Halten Sie die Ein/Aus-Taste für 10 Sekunden gedrückt, um das Herunterfahren des Geräts und des Gerätecomputers zu erzwingen. Verwenden Sie diese Methode zum Ausschalten des Geräts nur dann, wenn das Gerät nicht mehr reagiert.

**HINWEIS**

Schalten Sie das Gerät unter normalen Bedingungen nicht aus.

Wenn Sie das Gerät während eines Sequenzierungslaufs ausschalten, wird der Lauf umgehend beendet. Das Beenden eines Laufs ist endgültig. Die Verbrauchsmaterialien können nicht wiederverwendet werden und die Sequenzierungsdaten werden nicht gespeichert.

## Systemsoftware

Die Gerätesoftware-Suite umfasst integrierte Anwendungen für die Durchführung von Sequenzierungsläufen und die Geräteanalyse.

- ▶ **MiniSeq Control Software:** Die Steuerungssoftware führt Sie durch die Schritte zur Konfiguration eines Sequenzierungslaufs, steuert die Vorgänge auf dem Gerät und gibt während des Laufs einen Überblick über die Laufstatistik.
- ▶ **Echtzeitanalyse-Software (RTA):** RTA führt die Bildanalyse und das Base-Calling während des Laufs durch. Weitere Informationen finden Sie unter *Überblick über die Echtzeitanalyse auf Seite 55*.
- ▶ **Local Run Manager:** Legen Sie vor der Sequenzierung in Local Run Manager die Laufparameter und die Analysemethode fest. Nach der Sequenzierung wird die Datenanalyse im Gerät automatisch gestartet. Weitere Informationen finden Sie im *Handbuch zur Local Run Manager Software (Dokument-Nr. 1000000002702)*.

## Statussymbole

Ein Statussymbol in der oberen rechten Ecke des Bildschirms der Steuerungssoftware weist auf eine Änderung der Bedingungen während der Laufkonfiguration bzw. des Laufs hin.

Statussymbol	Statusname	Beschreibung
	Status OK	Das System funktioniert normal.
	Verarbeitung	Das Gerät führt die Verarbeitung durch.
	Achtung	Ihre Aufmerksamkeit ist erforderlich.
	Warnung	Eine Warnung ist aufgetreten. Warnungen stoppen einen Lauf nicht und es ist keine Aktion erforderlich, damit der Lauf fortgesetzt werden kann.
	Fehler	Ein Fehler ist aufgetreten. Bei Fehlern sind Maßnahmen erforderlich, bevor der Lauf fortgesetzt werden kann.

Wenn eine Bedingungsänderung auftritt, blinkt das entsprechende Symbol, um Sie darauf aufmerksam zu machen. Wählen Sie das Symbol, um eine Beschreibung der Bedingung anzuzeigen. Wählen Sie **Acknowledge** (Bestätigen), um die Meldung zu akzeptieren, und **Close** (Schließen), um das Dialogfeld zu schließen.

## Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien – Überblick

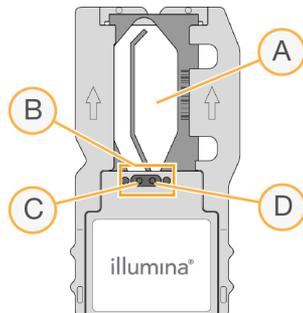
Zur Durchführung eines Sequenzierungslaufs auf dem MiniSeq-System ist ein MiniSeq-Kit für den Einmalgebrauch erforderlich. Jedes Kit enthält eine Fließzelle sowie die für den Sequenzierungslauf erforderlichen Reagenzien.

Die Fließzelle und Reagenzienkartusche verwenden das RFID-Tracking (Radio Frequency Identification), um die Verbrauchsmaterialien genau nachzuverfolgen und die Kompatibilität mit den angegebenen Laufparametern sicherzustellen.

## Fließzelle

Die Fließzelle ist ein Glasträger, auf dem die Clusterbildung und die Sequenzierungsreaktion stattfinden. Die Fließzelle befindet sich in einer Fließzellenkartusche.

**Abbildung 4** Komponenten der Fließzelle



- A Bildgebungsbereich
- B Fließzellendichtung
- C Auslassanschluss
- D Einlassanschluss

Reagenzien werden der Fließzelle durch den Einlassanschluss zugeführt, passieren den Bildgebungsbereich der einzelnen Lane und verlassen die Fließzelle durch den Auslassanschluss.

Die Fließzelle wird in trockenem Zustand in einem Fließzellenbehälter mit Folienverpackung geliefert. Lagern Sie die Fließzelle bis zu ihrem Gebrauch in der versiegelten Folienverpackung bei 2 °C bis 8 °C. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Vorbereiten der Fließzelle* auf Seite 22.

## Überblick über die Reagenzienkartusche

Die Reagenzienkartusche ist ein Verbrauchsmaterial für den einmaligen Gebrauch mit folienversiegelten Behältern, die mit Clusterbildungs-, Sequenzierungs- und Waschlaufragenzien vorgefüllt sind.

**Abbildung 5** Reagenzienkartusche



Die Reagenzienkartusche enthält einen designierten Behälter zum Laden von vorbereiteten Bibliotheken. Nach Beginn des Laufs werden die Bibliotheken automatisch von der Reagenzienkartusche an die Fließzelle übertragen.

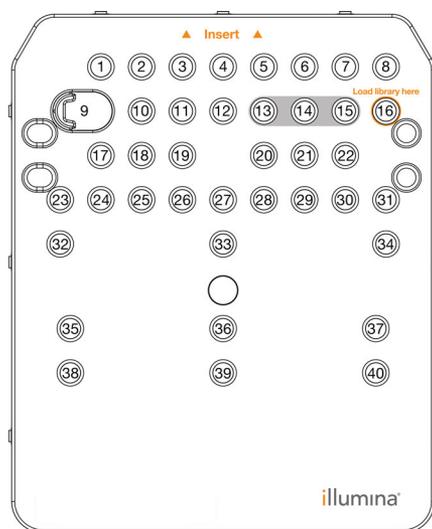
**WARNUNG**

Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und **Vorschriften**. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

Lagern Sie die Reagenzienkartusche bis zu ihrem Gebrauch bei -25 °C bis -15 °C. Weitere Informationen finden Sie unter *Vorbereiten der Reagenzienkartusche* auf Seite 22.

## Reservierte Behälter

Abbildung 6 Nummerierte Behälter



Position	Beschreibung
13, 14 und 15	Reserviert für optionale anwendungsspezifische Primer
16	Laden der Bibliotheken

## Herausnehmbarer Behälter in Position 9

Die vorgefüllte Reagenzienkartusche beinhaltet ein Denaturierungsreagenz in Position 9, das Formamid enthält. Um die sichere Entsorgung nicht verwendeter Reagenzien nach dem Sequenzierungslauf zu erleichtern, ist dieser Behälter herausnehmbar. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Herausnehmen des gebrauchten Behälters in Position 9* auf Seite 34.

## Vorinstallierte Datenbanken und Genome

Die meisten Analysemethoden benötigen zur Durchführung des Alignments eine Referenz. Auf dem Gerätecomputer sind mehrere Referenzdatenbanken und Genome vorinstalliert.

Vorinstalliert	Beschreibung
<b>Datenbanken</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• miRbase für Menschen</li> <li>• dbSNP für Menschen</li> <li>• refGene für Menschen</li> </ul>
<b>Genome</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Arabidopsis thaliana</i></li> <li>• Hausrind (<i>Bos taurus</i>)</li> <li>• <i>E. coli</i> Stamm DH10B</li> <li>• <i>E. coli</i> Stamm MG1655</li> <li>• Taufliegen (<i>Drosophila melanogaster</i>)</li> <li>• Mensch (<i>Homo sapiens</i>) Build hg19</li> <li>• Hausmaus (<i>Mus musculus</i>)</li> <li>• PhiX</li> <li>• Wanderratte (<i>Rattus norvegicus</i>)</li> <li>• <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1</li> <li>• Backhefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S288C)</li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 8325</li> </ul>

# Kapitel 2 Erste Schritte

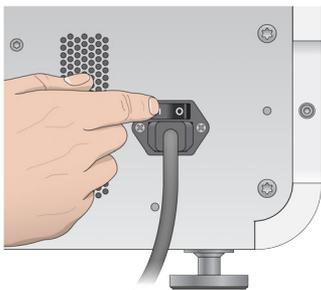
Starten des Geräts .....	9
Anpassen der Systemeinstellungen .....	10
Konfigurieren der Analyseeinstellungen .....	12
Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	16

## Starten des Geräts

Vergewissern Sie sich, dass das Gerät ordnungsgemäß installiert, initialisiert und konfiguriert wurde. Wenn Sie das Gerät starten, bevor es betriebsbereit ist, wird es ggf. beschädigt.

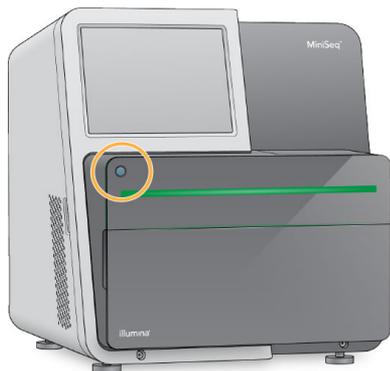
- 1 Bringen Sie den Hauptnetzschalter in die Position I (EIN).

**Abbildung 7** Netzschalter auf der Rückseite des Geräts



- 2 Drücken Sie die Ein/Aus-Taste über der Reagenzienkammer.  
Mit der Ein/Aus-Taste werden der integrierte Gerätecomputer eingeschaltet und das Betriebssystem aktiviert.

**Abbildung 8** Ein/Aus-Taste auf der Vorderseite des Geräts



- 3 Warten Sie, bis das Betriebssystem vollständig geladen wurde.  
Die MiniSeq Control Software wird gestartet und initialisiert das System. Wenn die Initialisierung abgeschlossen ist, wird der Startbildschirm geöffnet.
- 4 Warten Sie, bis das System geladen ist, und melden Sie sich dann beim Betriebssystem an. Fragen Sie, falls erforderlich, den Administrator Ihres Unternehmens nach dem Benutzernamen und dem Kennwort.

## Anpassen der Systemeinstellungen

Die Steuerungssoftware enthält benutzerdefinierbare Einstellungen für die Geräte-Identifikation und die folgenden Workflow-Voreinstellungen:

- ▶ Entsorgung von Verbrauchsmaterialien am Ende des Laufs.
- ▶ Bestätigung des Selbsttests überspringen, um den Lauf automatisch zu starten.
- ▶ Verwendung der Bildschirmtastatur bei der Laufkonfiguration.
- ▶ Aktivieren der Audio-Signale.
- ▶ Durchführen eines simulierten Laufs.

## Anpassen der Geräte-Identifikation

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 2 Um ein Avatarbild für das Gerät auszuwählen, wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zu dem gewünschten Bild.
- 3 Geben Sie im Feld „Nick Name“ (Kurzname) einen bevorzugten Namen für das Gerät ein.
- 4 Wählen Sie **Save** (Speichern), um die Einstellungen zu speichern und mit dem nächsten Bildschirm fortzufahren.  
Das Bild und der Name erscheinen links oben auf jedem Bildschirm.

## Festlegen der Option zur automatischen Entsorgung von Verbrauchsmaterialien

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 2 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Purge consumables at end of run** (Verbrauchsmaterialien am Ende des Laufs entsorgen).  
Wenn diese Option aktiviert ist, werden nach jedem Lauf nicht verwendete Reagenzien automatisch aus der Reagenzienkartusche in den Behälter für verbrauchte Reagenzien befördert. Ist die Option deaktiviert, verbleiben die nicht verwendeten Reagenzien in der Reagenzienkartusche.



### HINWEIS

Durch die automatische Entsorgung von Verbrauchsmaterialien nimmt der Workflow mehr Zeit in Anspruch. Bei einem Lauf mit 300 Zyklen (2 × 151) dauert die Entsorgung von nicht verwendeten Reagenzien etwa 50 Minuten.

- 3 Wählen Sie **Save** (Speichern), um die Einstellungen zu speichern und den Bildschirm zu schließen.

## Auswahl der Option zum automatischen Starten des Laufs

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 2 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Skip pre-run check confirmation** (Bestätigung des Selbsttests überspringen).

Dadurch wird der Sequenzierungslauf automatisch gestartet, nachdem der automatische Selbsttest erfolgreich durchgeführt wurde. Wenn diese Option deaktiviert ist, müssen Sie den Lauf nach der Durchführung des Selbsttests manuell starten.

- 3 Wählen Sie **Save** (Speichern).

## Festlegen der automatischen Suche nach Software-Updates

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 2 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Automatically check for software updates on BaseSpace** (Automatisch nach Software-Updates auf BaseSpace suchen).  
Zur Durchführung dieser Option wird eine Internetverbindung benötigt.
- 3 Wählen Sie **Save** (Speichern), um die Einstellungen zu speichern und den Bildschirm zu schließen.

## Auswahl der Option zur Verwendung der Bildschirmtastatur

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 2 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Use on-screen keyboard** (Bildschirmtastatur verwenden).  
Sie können jetzt die Bildschirmtastatur zur Eingabe von Informationen bei der Konfiguration des Laufs verwenden.
- 3 Wählen Sie **Save** (Speichern).

## Aktivieren der Audio-Signale

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 2 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Play audio** (Audio abspielen), um die Audio-Signale für die folgenden Ereignisse einzuschalten:
  - ▶ Bei der Geräte-Initialisierung
  - ▶ Wenn ein Lauf gestartet wird
  - ▶ Auftreten von Fehlern
  - ▶ Wenn eine Benutzerinteraktion erforderlich ist
  - ▶ Wenn ein Lauf beendet wurde
- 3 Wählen Sie **Save** (Speichern).

## Aktivieren des Demomodus

Der Demomodus simuliert einen Sequenzierungslauf, um die Merkmale und die Funktionsweise des Geräts zu demonstrieren. Verwenden Sie den Demomodus, um die Laufkonfiguration ohne Reagenzien, Fließzelle oder andere Verbrauchsmaterialien zu veranschaulichen.

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 2 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Enable Demo Mode** (Demomodus aktivieren).
- 3 Wählen Sie **Save** (Speichern).
- 4 **[Optional]** Geben Sie eine vierstellige PIN ein.

Ist dieses Feld leer, ist zum Beenden des Demomodus keine PIN erforderlich.

- 5 Wählen Sie **OK**, um die Software im Demomodus neu zu starten.  
Nach dem Neustart ist die MiniSeq Control Software mit einem Spruchbanner mit der Aufschrift „Demonstration Only“ (Nur Demonstration) versehen.

## Beenden des Demomodus

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 2 Deaktivieren Sie das Kontrollkästchen **Enable Demo Mode** (Demomodus aktivieren).
- 3 Wählen Sie **Save** (Speichern).
- 4 Wenn eine PIN erforderlich ist, geben Sie diese ein, wenn Sie dazu aufgefordert werden.
- 5 Wählen Sie **OK**, um die Software im Standardmodus neu zu starten.

## Konfigurieren der Analyseeinstellungen

Die Steuerungssoftware bietet die folgenden Optionen für die Datenübertragung und die nachfolgende Analyse:

- ▶ **BaseSpace**: Die Daten werden zur Analyse auf BaseSpace an Illumina BaseSpace gesendet.
- ▶ **BaseSpace Onsite**: Die Daten werden an den BaseSpace Onsite LT-Server gesendet und auf dem Server analysiert.
- ▶ **Local Run Manager**: Die Daten werden zur Analyse mit einem Local Run Manager-Modul an einen angegebenen Speicherort für den Ausgabeordner gesendet.
- ▶ **Standalone** (Eigenständig): Die Daten werden für die spätere Analyse im angegebenen Ausgabeordner gespeichert.

## Auswählen von BaseSpace

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Configuration** (Systemkonfiguration).
- 2 Wählen Sie **Analysis Configuration** (Analysekonfiguration).
- 3 Wählen Sie **BaseSpace**.
- 4 **[Optional]** Legen Sie Standardanmeldedaten für BaseSpace fest.
  - a Geben Sie unter **User name** (Benutzername) und **Password** (Kennwort) die entsprechenden Informationen ein.
  - b Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Save the credentials as the default** (Anmeldedaten als Standard speichern).
  - c Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Bypass Analysis Method login screen** (Anmeldebildschirm für Analyseverfahren überspringen).
- 5 Geben Sie im Feld „Server Name“ (Servername) den vollständigen Dateipfad zu Ihrem BaseSpace-Server ein. Ersetzen Sie für den EU-Server den Namen des US-Servers durch `https://api.euc1.sh.basespace.illumina.com`.  
Der Standard-US-Server ist `https://api.basespace.illumina.com`.

- 6 **[Optional]** Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Output Folder** (Ausgabeordner) und wählen Sie **Browse** (Durchsuchen), um zum bevorzugten Speicherort für den Ausgabeordner zu navigieren.  
Bei dieser Einstellung wird eine Kopie der Base-Call-Dateien (BCL) am angegebenen Speicherort gespeichert.
- 7 **[Optional]** Wählen Sie **Send instrument health information to Illumina** (Gerätestatusdaten an Illumina senden), um den Überwachungsdienst Illumina Proactive zu aktivieren. Je nach verwendeter MiniSeq Control Software-Version kann der Name dieser Einstellung in der Benutzeroberfläche der Software von dem in diesem Handbuch abweichen.  
Nach Aktivierung dieser Einstellung werden Performance-Daten des Geräts an Illumina gesendet. Diese Daten erleichtern Illumina die Fehlerbehebung und das Erkennen möglicher Ausfälle. Sie dienen der proaktiven Wartung und der Maximierung der Geräteverfügbarkeit. Weitere Informationen zu den Vorteilen dieses Dienstes finden Sie im *technischen Hinweis zu Illumina Proactive (Dokument-Nr. 1000000052503)*.  
Dieser Dienst:
  - ▶ Sendet keine Sequenzierungsdaten.
  - ▶ Das Gerät muss mit einem Netzwerk mit Internetzugang verbunden sein.
  - ▶ Ist standardmäßig aktiviert. Für die Abmeldung bei diesem Dienst deaktivieren Sie die Einstellung **Send instrument health information to Illumina** (Gerätestatusdaten an Illumina senden).
- 8 Wählen Sie **Save** (Speichern).

## Auswählen von BaseSpace Onsite

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Configuration** (Systemkonfiguration).
- 2 Wählen Sie **Analysis Configuration** (Analysekonfiguration).
- 3 Wählen Sie **BaseSpace Onsite**.
- 4 **[Optional]** Legen Sie Standardanmeldedaten für BaseSpace Onsite fest.
  - a Geben Sie unter **User name** (Benutzername) und **Password** (Kennwort) die entsprechenden Informationen ein.
  - b Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Save the credentials as the default** (Anmeldedaten als Standard speichern).
  - c Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Bypass Analysis Method login screen** (Anmeldebildschirm für Analysemethode überspringen).
- 5 Geben Sie im Feld „Server Name“ (Servername) den vollständigen Dateipfad zu Ihrem BaseSpace Onsite-Server ein.
- 6 **[Optional]** Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Output Folder** (Ausgabeordner) und wählen Sie **Browse** (Durchsuchen), um zum bevorzugten Speicherort für den Ausgabeordner zu navigieren.  
Bei dieser Einstellung wird eine Kopie der Base-Call-Dateien (BCL) am angegebenen Speicherort gespeichert.
- 7 **[Optional]** Wählen Sie **Send instrument health information to Illumina** (Gerätestatusdaten an Illumina senden), um den Überwachungsdienst Illumina Proactive zu aktivieren. Je nach verwendeter MiniSeq Control Software-Version kann der Name dieser Einstellung in der Benutzeroberfläche der Software von dem in diesem Handbuch abweichen.

Nach Aktivierung dieser Einstellung werden Performance-Daten des Geräts an Illumina gesendet. Diese Daten erleichtern Illumina die Fehlerbehebung und das Erkennen möglicher Ausfälle. Sie dienen der proaktiven Wartung und der Maximierung der Geräteverfügbarkeit. Weitere Informationen zu den Vorteilen dieses Dienstes finden Sie im *technischen Hinweis zu Illumina Proactive (Dokument-Nr. 1000000052503)*.

Dieser Dienst:

- ▶ Sendet keine Sequenzierungsdaten.
- ▶ Das Gerät muss mit einem Netzwerk mit Internetzugang verbunden sein.
- ▶ Ist standardmäßig aktiviert. Für die Abmeldung bei diesem Dienst deaktivieren Sie die Einstellung **Send instrument health information to Illumina** (Gerätstatusdaten an Illumina senden).

8 Wählen Sie **Save** (Speichern).

## Auswählen des Local Run Manager

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Configuration** (Systemkonfiguration).
- 2 Wählen Sie **Analysis Configuration** (Analysekonfiguration).
- 3 Wählen Sie **Local Run Manager**.
- 4 **[Optional]** Legen Sie Standardanmeldedaten für Local Run Manager fest.
  - a Geben Sie unter **User name** (Benutzername) und **Password** (Kennwort) die entsprechenden Informationen ein.
  - b Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Save credentials as the default** (Anmeldedaten als Standard speichern).
  - c Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Bypass Analysis Method login screen** (Anmeldebildschirm für Analysemethode überspringen).
- 5 **[Optional]** Wählen Sie **Use Run Monitoring** (Laufüberwachung verwenden), um den Inhalt mithilfe von Darstellungstools auf BaseSpace zu überwachen. Hierfür sind eine Internetverbindung und eine Anmeldung bei BaseSpace erforderlich.
- 6 **[Optional]** Legen Sie Standardanmeldedaten für BaseSpace fest.
  - a Geben Sie unter **User name** (Benutzername) und **Password** (Kennwort) die entsprechenden Informationen ein.
  - b Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Save credentials as the default** (Anmeldedaten als Standard speichern).
- 7 Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zum Speicherort des bevorzugten Ausgabeordners.
- 8 Erstellen Sie im Fenster „Contents“ (Inhalt) des Speicherorts für den Ausgabeordner einen Ordner mit dem Namen „Runs“ (Läufe).



### HINWEIS

Local Run Manager unterstützt keine zugeordneten Laufwerke.

- 9 **[Optional]** Wählen Sie **Send instrument health information to Illumina** (Gerätstatusdaten an Illumina senden), um den Überwachungsdienst Illumina Proactive zu aktivieren. Je nach verwendeter MiniSeq Control Software-Version kann der Name dieser Einstellung in der Benutzeroberfläche der Software von dem in diesem Handbuch abweichen.

Nach Aktivierung dieser Einstellung werden Performance-Daten des Geräts an Illumina gesendet. Diese Daten erleichtern Illumina die Fehlerbehebung und das Erkennen möglicher Ausfälle. Sie dienen der proaktiven Wartung und der Maximierung der Geräteverfügbarkeit. Weitere Informationen zu den Vorteilen dieses Dienstes finden Sie im *technischen Hinweis zu Illumina Proactive (Dokument-Nr. 1000000052503)*.

Dieser Dienst:

- ▶ Sendet keine Sequenzierungsdaten.
- ▶ Das Gerät muss mit einem Netzwerk mit Internetzugang verbunden sein.
- ▶ Ist standardmäßig aktiviert. Für die Abmeldung bei diesem Dienst deaktivieren Sie die Einstellung **Send instrument health information to Illumina** (Gerätestatusdaten an Illumina senden).

10 Wählen Sie **Save** (Speichern).

## Auswählen von „Standalone“ (Eigenständig)

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Configuration** (Systemkonfiguration).
- 2 Wählen Sie **Analysis Configuration** (Analysekonfiguration).
- 3 Wählen Sie **Standalone** (Eigenständig).
- 4 **[Optional]** Wählen Sie **Use Run Monitoring** (Laufüberwachung verwenden), um den Lauf mithilfe von Darstellungstools auf BaseSpace zu überwachen. Hierfür sind eine Internetverbindung und eine Anmeldung bei BaseSpace erforderlich.
- 5 **[Optional]** Legen Sie Standardanmeldedaten für BaseSpace fest.
  - a Geben Sie unter **User name** (Benutzername) und **Password** (Kennwort) die entsprechenden Informationen ein.
  - b Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Save credentials as the default** (Anmeldedaten als Standard speichern).
- 6 Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zum Speicherort des bevorzugten Ausgabeordners.
- 7 **[Optional]** Wählen Sie **Send instrument health information to Illumina** (Gerätestatusdaten an Illumina senden), um den Überwachungsdienst Illumina Proactive zu aktivieren. Je nach verwendeter MiniSeq Control Software-Version kann der Name dieser Einstellung in der Benutzeroberfläche der Software von dem in diesem Handbuch abweichen.
 

Nach Aktivierung dieser Einstellung werden Performance-Daten des Geräts an Illumina gesendet. Diese Daten erleichtern Illumina die Fehlerbehebung und das Erkennen möglicher Ausfälle. Sie dienen der proaktiven Wartung und der Maximierung der Geräteverfügbarkeit. Weitere Informationen zu den Vorteilen dieses Dienstes finden Sie im *technischen Hinweis zu Illumina Proactive (Dokument-Nr. 1000000052503)*.

Dieser Dienst:

  - ▶ Sendet keine Sequenzierungsdaten.
  - ▶ Das Gerät muss mit einem Netzwerk mit Internetzugang verbunden sein.
  - ▶ Ist standardmäßig aktiviert. Für die Abmeldung bei diesem Dienst deaktivieren Sie die Einstellung **Send instrument health information to Illumina** (Gerätestatusdaten an Illumina senden).
- 8 Wählen Sie **Save** (Speichern).

## Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die folgenden Verbrauchsmaterialien und Geräte werden für die Sequenzierung und die Systemwartung verwendet.

### Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien für Sequenzierungsläufe

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
1 N NaOH (Natriumhydroxid)	Allgemeiner Laborlieferant	Bibliotheksdenaturierung, verdünnt auf 0,1 N
200 mM Tris-HCl, pH7	Allgemeiner Laborlieferant	Bibliotheksneutralisation nach der Denaturierung
Isopropylalkoholtupfer, 70 % oder Ethanol, 70 %	VWR, Katalog-Nr. 95041-714 (oder vergleichbar) Allgemeiner Laborlieferant	Reinigung der Fließzelle und allgemeine Verwendung
Einweg-Handschuhe, ungepudert	Allgemeiner Laborlieferant	Allgemeine Verwendung
Labortücher, fusselfrei	VWR, Katalog-Nr. 21905-026 (oder vergleichbar)	Reinigung der Fließzelle

### Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien für die Gerätewartung

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
NaOCl, 5 % (Natriumhypochlorit)	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. 239305 (oder vergleichbares Produkt in Laborqualität)	Durchführen eines manuellen Nachwaschlaufs; verdünnt auf 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. P7949	Durchführen eines manuellen Gerätewaschlaufs; verdünnt auf 0,05 %
Wasser, Laborqualität	Allgemeiner Laborlieferant	Durchführen eines manuellen Gerätewaschlaufs

### Richtlinien für Wasser in Laborqualität

Bei Geräteverfahren sollte immer deionisiertes Wasser bzw. Wasser in Laborqualität verwendet werden. Verwenden Sie niemals Leitungswasser. Verwenden Sie nur die folgenden Wasserarten oder -äquivalente:

- ▶ Deionisiertes Wasser
- ▶ Illumina PW1
- ▶ 18-Megohm-(M $\Omega$ )-Wasser
- ▶ Milli-Q-Wasser
- ▶ Super-Q-Wasser
- ▶ Wasser in Molekularbiologie-Qualität

## Vom Benutzer bereitzustellende Ausstattung

Element	Quelle
Gefrierschrank, -25 °C bis -15 °C, frostfrei	Allgemeiner Laborlieferant
Eiskübel	Allgemeiner Laborlieferant
Kühlschrank, 2 °C bis 8 °C	Allgemeiner Laborlieferant



# Kapitel 3 Sequenzierung

Einleitung .....	19
Sequenzierungsworkflow .....	20
Vorbereiten der Verbrauchsmaterialien .....	22
Vorbereiten von Bibliotheken für die Sequenzierung .....	23
Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs .....	24
Überwachen des Lauffortschritts .....	32
Automatischer Nachwaschlauf .....	34
Herausnehmen des gebrauchten Behälters in Position 9 .....	34

## Einleitung

Um auf dem MiniSeq-System einen Sequenzierungslauf durchzuführen, bereiten Sie die Verbrauchsmaterialien für den Lauf vor und folgen Sie dann den Anweisungen der Software zur Konfiguration des Sequenzierungslaufs.

## Workflow-Überblick

### Clusterbildung

Während der Clusterbildung werden einzelne DNA-Moleküle an der Oberfläche der Fließzelle gebunden und dann amplifiziert, um Cluster zu bilden.

### Sequenzierung

Cluster werden mithilfe einer Zweikanal-Sequenzierungsschemie und Filterkombinationen aufgenommen, die jedem der Fluoreszenz-Kettenterminatoren entsprechen. Nachdem die Bildgebung einer Platte auf der Fließzelle abgeschlossen ist, wird die nächste Platte aufgenommen. Dieser Vorgang wird für jeden Sequenzierungszyklus wiederholt. Im Anschluss an die Bildanalyse führt die Software das Base-Calling, das Filtern und die Qualitätsbewertung durch.

### Analyse

Während der Durchführung des Laufs überträgt die Steuerungssoftware automatisch Base-Call-Dateien (BCL) zwecks Datenanalyse an den angegebenen Ausgabespeicherort. Je nach Anwendung und der für das System ausgewählten Analysekonfiguration stehen mehrere Analysemethoden zur Verfügung. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Konfigurieren der Analyseeinstellungen auf Seite 12*.

## Dauer eines Sequenzierungslaufs

Die Dauer eines Sequenzierungslaufs hängt von der Anzahl der durchgeführten Zyklen ab. Die maximale Lauflänge ist ein Paired-End-Lauf mit 150 Zyklen zuzüglich bis zu zwei Index-Reads mit je acht Zyklen.

Die erwartete Laufdauer und andere Systemspezifikationen finden Sie auf der Seite [„Specifications“ \(Spezifikationen\) für das MiniSeq-System](#) auf der Illumina-Website.

## Anzahl der Zyklen in einem Read

Bei einem Sequenzierungslauf ist die Anzahl der in einem Read ausgeführten Zyklen um einen Zyklus höher als die Anzahl der analysierten Zyklen. Zur Durchführung eines Paired-End-Laufs mit 150 Zyklen konfigurieren

Sie z. B. den Lauf für 151 Zyklen pro Read ( $2 \times 151$ ), sodass sich eine Gesamtanzahl von 302 Zyklen ergibt. Am Ende des Laufs werden  $2 \times 150$  Zyklen analysiert. Der zusätzliche Zyklus in jedem Read wird für Phasierungs- und Vorphasierungsberechnungen verwendet.

## Sequenzierungsworkflow

Die Laufkonfigurationsschritte hängen von der für den Lauf angegebenen Analysekonfiguration ab.

- ▶ **Standalone** (Eigenständig): Nach dem Vorbereiten und Laden der Verbrauchsmaterialien werden alle Laufparameter über die Benutzeroberfläche der MiniSeq Control Software angegeben.
- ▶ **BaseSpace, BaseSpace Onsite oder Local Run Manager**: Bevor Sie den Lauf auf dem Gerät konfigurieren, vergeben Sie einen Laufnamen und geben Sie die Laufparameter auf der Registerkarte „BaseSpace Prep“ (BaseSpace-Vorbereitung) oder mithilfe von Local Run Manager an. Wählen Sie nach dem Vorbereiten der Verbrauchsmaterialien den Laufnamen in der MiniSeq Control Software und laden Sie anschließend die Verbrauchsmaterialien für den Lauf.

### Workflow (Eigenständige Konfiguration)



Bereiten Sie eine neue Reagenzienkartusche vor: auftauen und überprüfen.  
Bereiten Sie eine neue Fließzelle vor: auf Raumtemperatur bringen und dann auspacken.



Denaturieren und verdünnen Sie die Bibliotheken. Weitere Informationen hierzu finden Sie im *Handbuch zum Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken für das MiniSeq-System* (Dokument-Nr. 1000000002697).



Geben Sie die Bibliothekslösung in Behälter Nr. 16 der Reagenzienkartusche.



Wählen Sie in der Benutzeroberfläche der Software **Sequence** (Sequenzieren) aus.



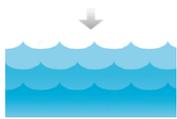
Laden Sie die Fließzelle und die Reagenzienkartusche.  
Leeren Sie die Flasche für verbrauchte Reagenzien und setzen Sie sie wieder ein.



Geben Sie auf dem Laufkonfigurationsbildschirm die Laufparameter an.  
Wählen Sie nach Abschluss des Selbsttests **Start** (Starten).



Überwachen Sie den Lauf auf dem Gerätebildschirm über BaseSpace, wenn die Überwachung aktiviert ist, oder über einen Netzwerkcomputer unter Verwendung des Sequenzierungsanalyse-Viewers. Die Daten werden in den angegebenen Ausgabeordner übertragen.

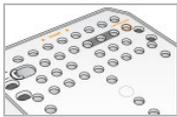


Nach Abschluss der Sequenzierung beginnt automatisch ein Gerätewaschlauf.

## Workflow (BaseSpace- oder Local Run Manager-Konfiguration)



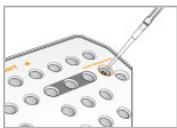
Geben Sie die Laufparameter auf BaseSpace, BaseSpace Onsite oder Local Run Manager an.



Bereiten Sie eine neue Reagenzienkartusche vor: auftauen und überprüfen.  
Bereiten Sie eine neue Fließzelle vor: auf Raumtemperatur bringen, auspacken und inspizieren.



Denaturieren und verdünnen Sie die Bibliotheken. Weitere Informationen hierzu finden Sie im *Handbuch zum Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken für das MiniSeq-System (Dokument-Nr. 1000000002697)*.



Geben Sie die Bibliothekslösung in Behälter Nr. 16 der Reagenzienkartusche.



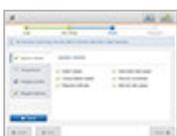
Wählen Sie in der Benutzeroberfläche der Software **Sequence** (Sequenzieren), um mit den Laufkonfigurationsschritten zu beginnen.



Wählen Sie den Laufnamen aus, der auf BaseSpace, BaseSpace Onsite oder Local Run Manager angegeben wurde.



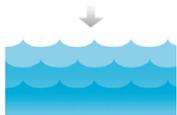
Laden Sie die Fließzelle.  
Laden Sie die Reagenzienkartusche.  
Leeren Sie die Flasche für verbrauchte Reagenzien und setzen Sie sie wieder ein.



Überprüfen Sie auf dem Laufkonfigurationsbildschirm die Laufparameter.  
Wählen Sie nach Abschluss des Selbsttests **Start** (Starten).



Überwachen Sie den Lauf auf dem Gerätebildschirm über BaseSpace oder über einen Netzwerkcomputer unter Verwendung des Sequenzierungsanalyse-Viewers. Die Daten werden an BaseSpace, BaseSpace Onsite bzw. den angegebenen Ausgabeordner übertragen.



Nach Abschluss der Sequenzierung beginnt automatisch ein Gerätewaschlauf.

## Vorbereiten der Verbrauchsmaterialien

### Vorbereiten der Reagenzienkartusche

- 1 Nehmen Sie die Reagenzienkartusche aus dem -25 °C bis -15 °C kalten Lagerort heraus.
- 2 Tauen Sie die Reagenzien in einem Wasserbad gemäß den Angaben in der folgenden Tabelle auf. Tauchen Sie die Kartusche nicht in Wasser. Wenn die Reagenzien aufgetaut sind, trocknen Sie zuerst die Basis der Kartusche, bevor Sie fortfahren.

Methode	Auftauzeit	Stabilitätsgrenze
Wasserbad von 37 °C	35 Minuten	Bis zu 2 Stunden
Wasserbad mit Raumtemperatur (19 °C bis 25 °C)	90 Minuten	Bis zu 24 Stunden

Wenn Sie in einem Wasserbad mehrere Kartuschen auftauen, verlängert sich die Auftauzeit. Alternativ können Sie die Reagenzien mit folgenden Methoden auftauen.

Methode	Auftauzeit	Stabilitätsgrenze
Bei Raumtemperatur (19 °C bis 25 °C)	5 Stunden	Bis zu 24 Stunden
Gekühlt bei 2 °C bis 8 °C	18 Stunden	Bis zu 72 Stunden

- 3 Invertieren Sie die Kartuschen fünf Mal, um die Reagenzien zu mischen.
- 4 Inspizieren Sie die großen Behälter auf der Unterseite der Kartusche, um sicherzustellen, dass die Reagenzien aufgetaut und die Behälter frei von Eiskristallen sind.
- 5 Klopfen Sie leicht auf den Tisch, um die Anzahl der Luftblasen zu verringern.

### Vorbereiten der Fließzelle

- 1 Nehmen Sie ein neues Fließzellenpaket aus dem Lagerort mit einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C.
- 2 Legen Sie das verschlossene Fließzellenpaket bei Raumtemperatur für 30 Minuten beiseite.



#### HINWEIS

Vermeiden Sie ein mehrmaliges Abkühlen und Erwärmen der Fließzelle.

- 3 Nehmen Sie den Fließzellenbehälter aus der Folienverpackung.
- 4 Ziehen Sie ein neues Paar ungepuderte Handschuhe an.
- 5 Greifen Sie die Fließzelle an der Kunststoffkartusche und nehmen Sie sie aus dem Behälter.

**Abbildung 9** Entfernen der Fließzelle



- 6 Reinigen Sie die Glasoberfläche der Fließzelle mit einem fusselfreien Alkoholtupfer.
- 7 Trocknen Sie sie anschließend mit einem fusselfreien Reinigungstuch für Objektive ab. Gehen Sie um die schwarze Fließzellendichtung herum behutsam vor.
- 8 Prüfen Sie die Fließzellenanschlüsse auf etwaige Verstopfungen. Stellen Sie sicher, dass die Dichtung gut sitzt.

## Vorbereiten von Bibliotheken für die Sequenzierung

### Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken

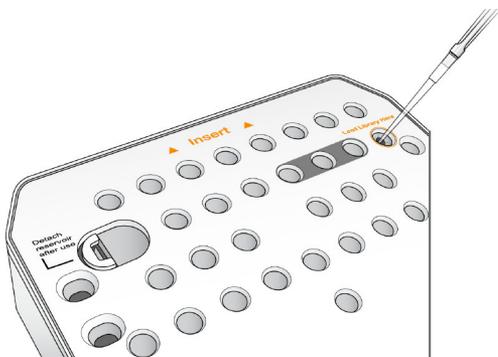
Bevor Sie die Bibliotheken in die Reagenzienkartusche laden, müssen Sie sie denaturieren und verdünnen und optional eine PhiX-Kontrolle hinzugeben. Weitere Informationen finden Sie im *Handbuch zum Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken für das MiniSeq-System (Dokument-Nr. 100000002697)*.

Das Ladevolumen für das MiniSeq-System beträgt 500 µl bei einer Ladekonzentration von 1,8 pM. Die Ladekonzentration kann jedoch je nach Bibliotheksvorbereitungs- und Quantifizierungsmethode variieren.

### Laden der Bibliotheken in die Reagenzienkartusche

- 1 Reinigen Sie die Verschlussfolie, die den mit **Load Library Here** (Bibliothek hier laden) beschrifteten Behälter **Nr. 16** abdeckt, mit einem fusselfreien Tuch.
- 2 Durchstechen Sie die Folie mit einer sauberen 1-ml-Pipettenspitze.
- 3 Geben Sie 500 µl der vorbereiteten 1,8-pM-Bibliotheken in den Behälter **Nr. 16**. Achten Sie beim Zuführen der Bibliotheken darauf, die Verschlussfolie nicht zu berühren.

**Abbildung 10** Laden der Bibliotheken



## Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs

Die Schritte für die Laufkonfiguration sind je nach Systemkonfiguration unterschiedlich:

- ▶ **Eigenständige Konfiguration:** Sie werden aufgefordert, die Laufparameter im Laufkonfigurationsbildschirm der Steuerungssoftware festzulegen.
- ▶ **BaseSpace- oder Local Run Manager-Konfiguration:** Sie werden aufgefordert, sich anzumelden und in BaseSpace oder Local Run Manager aus einer Liste mit vordefinierten Läufen auszuwählen.

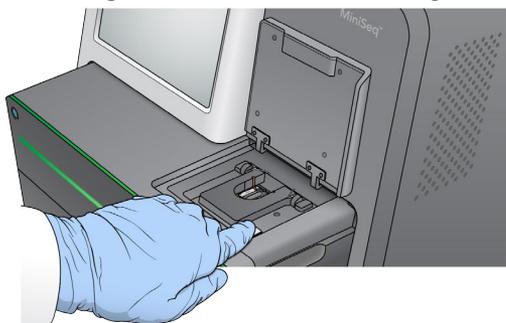
### Konfiguration eines Laufs (Eigenständige Konfiguration)

- 1 Wählen Sie im Startbildschirm die Option **Sequence** (Sequenzieren).  
Der Befehl „Sequence“ (Sequenzieren) gibt die Verbrauchsmaterialien aus dem vorherigen Lauf frei und öffnet eine Reihe von Bildschirmen für die Laufkonfiguration.

### Laden der Fließzelle

- 1 Öffnen Sie die Tür der Fließzellenkammer.
- 2 Drücken Sie den Freigabeknopf rechts vom Fließzellenriegel.

**Abbildung 11** Geöffneter Fließzellenriegel



- 3 Entfernen Sie ggf. die gebrauchte Fließzelle aus dem vorherigen Lauf.
- 4 Stellen Sie sicher, dass der Fließzellentisch sauber ist. Wenn Schmutzpartikel vorhanden sind, reinigen Sie den Fließzellentisch mit einem Alkoholtupfer.
- 5 Platzieren Sie die Fließzelle über die Ausrichtungsstifte auf dem Fließzellentisch.

**Abbildung 12** Platzieren der Fließzelle auf dem Tisch



- 6 Schließen Sie den Fließzellenriegel, um die Fließzelle zu sichern.

**Abbildung 13** Geschlossener Fließzellenriegel



- 7 Schließen Sie die Tür der Fließzellenkammer.

## Laden der Reagenzienkartusche

- 1 Öffnen Sie die Tür der Reagenzienkammer.
- 2 Entfernen Sie ggf. die gebrauchte Reagenzienkartusche.

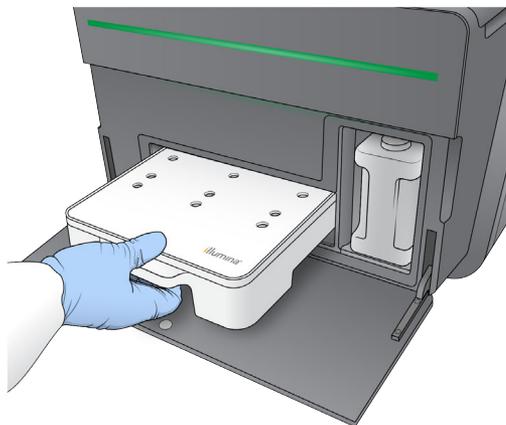


### HINWEIS

Um die sichere Entsorgung nicht verwendeter Reagenzien, die Formamid enthalten, zu erleichtern, lässt sich der Behälter in Position 9 herausnehmen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Herausnehmen des gebrauchten Behälters in Position 9 auf Seite 34.*

- 3 Schieben Sie die Reagenzienkartusche bis zum Anschlag in die Reagenzienkammer.

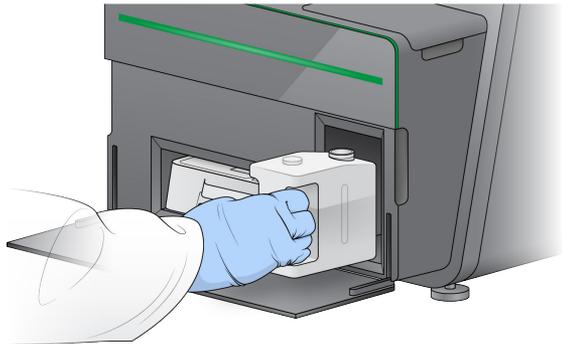
**Abbildung 14** Laden der Reagenzienkartusche



## Leeren der Flasche für verbrauchte Reagenzien

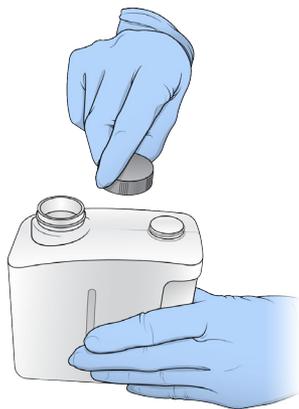
- 1 Entfernen Sie die Flasche für verbrauchte Reagenzien aus der Kammer.

**Abbildung 15** Entfernen der Flasche für verbrauchte Reagenzien



- 2 Verschieben Sie die Flaschenöffnung mit dem Schraubdeckel, um zu verhindern, dass beim Transportieren der Flasche Flüssigkeit verschüttet wird.

**Abbildung 16** Verschließen der Flasche für verbrauchte Reagenzien



- 3 Entsorgen Sie den Inhalt der Flasche gemäß den geltenden Vorschriften.



**WARNUNG**

Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

- 4 Schieben Sie die leere Flasche für verbrauchte Reagenzien ohne Schraubdeckel bis zum Anschlag in die Kammer.
- 5 Schließen Sie die Kammertür und wählen Sie **Next** (Weiter).

## Eingeben von Laufparametern

- 1 Geben Sie einen beliebigen Namen ein.
- 2 **[Optional]** Geben Sie eine beliebige Bibliotheks-ID ein.

- 3 Wählen Sie aus der Dropdown-Liste „Recipe“ (Rezeptur) eine Rezeptur aus. Es werden nur kompatible Rezepturen aufgelistet.
- 4 Wählen Sie einen Read-Typ aus: **Single Read** oder **Paired End**.
- 5 Geben Sie die Anzahl der Zyklen für jeden Read des Sequenzierungslaufs an:
  - ▶ **Read 1:** Geben Sie einen Wert von bis zu 151 Zyklen ein.
  - ▶ **Index 1:** Geben Sie die Anzahl der Zyklen ein, die für den Index 1 (i7) Primer erforderlich sind.
  - ▶ **Index 2:** Geben Sie die Anzahl der Zyklen ein, die für den Index 2 (i5) Primer erforderlich sind.
  - ▶ **Read 2:** Geben Sie einen Wert von bis zu 151 Zyklen ein. Dieser Wert ist in der Regel mit dem Wert von Read 1 identisch.

Die Steuerungssoftware prüft die Anzahl der angegebenen Zyklen anhand folgender Kriterien:

- ▶ Die Gesamtzahl der Zyklen überschreitet nicht die zulässige Maximalzahl der für den Lauf geladenen Reagenzienkartusche.
- ▶ Read 1 umfasst mehr Zyklen als die fünf Zyklen der Matrizenbildung.
- ▶ Die Anzahl der Index-Read-Zyklen ist nicht höher als die Anzahl der Read 1- und Read 2-Zyklen.



#### HINWEIS

Vergewissern Sie sich, dass Sie die korrekte Anzahl an Index-Read-Zyklen für die zu sequenzierenden Bibliotheken angeben. Weitere Informationen finden Sie in der Dokumentation zur Bibliotheksvorbereitung.

- 6 **[Optional]** Wenn Sie anwendungsspezifische Primer verwenden, aktivieren Sie das jeweilige Kontrollkästchen für die verwendeten Primer.
  - ▶ **Read 1:** Anwendungsspezifischer Primer für Read 1.
  - ▶ **Index 1:** Anwendungsspezifischer Primer für Index 1.
  - ▶ **Index 2:** Anwendungsspezifischer Primer für Index 2.
  - ▶ **Read 2:** Anwendungsspezifischer Primer für Read 2.
- 7 **[Optional]** Wählen Sie **Advanced Settings** (Erweiterte Einstellungen), um die Einstellungen für den aktuellen Lauf zu ändern.
  - ▶ **Purge consumables for this run** (Verbrauchsmaterialien für diesen Lauf entsorgen): Ändern Sie die Einstellung, um nach dem aktuellen Lauf Verbrauchsmaterialien automatisch zu entsorgen.
  - ▶ **Use run monitoring for this run** (Laufüberwachung für diesen Lauf verwenden): Ändern Sie diese Einstellung, um die Laufüberwachung in BaseSpace zu verwenden. Ist diese Option aktiviert, ist eine Internetverbindung und eine Anmeldung bei BaseSpace erforderlich.
  - ▶ **Recipe** (Rezeptur): Wählen Sie eine anwendungsspezifische Rezeptur für den Lauf aus.
  - ▶ **Output folder** (Speicherort des Ausgabeordners): Ändern Sie den Speicherort für den Ausgabeordner des aktuellen Laufs. Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zum gewünschten Speicherort des Ordners.
- 8 Wählen Sie **Next** (Weiter).



#### HINWEIS

Öffnen Sie nicht die Tür der Reagenzienkammer oder der Fließzellenkammer, während der automatische Selbsttest oder der Sequenzierungslauf durchgeführt wird.

## Überprüfen der automatischen Systemprüfung

- 1 Prüfen Sie die Ergebnisse des automatischen Selbsttests.
  - ▶ Um einen Test während seiner Durchführung zu stoppen, wählen Sie **Cancel** (Abbrechen).

- ▶ Bei allen Elementen, die den Test nicht bestehen, ist eine Aktion erforderlich, bevor Sie fortfahren können. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Fehler beim automatischen Selbsttest auf Seite 44*.
  - ▶ Um den Test wieder zu starten, wählen Sie **Retry** (Wiederholen). Die Prüfung wird beim ersten unvollständigen oder fehlgeschlagenen Test fortgesetzt.
- 2 Um den Lauf zu starten, wählen Sie eine der folgenden Optionen.
    - ▶ Wenn das System nicht für einen automatischen Start des Laufs nach erfolgreicher Durchführung des Selbsttests konfiguriert ist, wählen Sie **Start** (Starten).
    - ▶ Ist das System für den automatischen Start konfiguriert, wird der Sequenzierungslauf automatisch gestartet. Sie müssen nicht anwesend sein. Falls jedoch beim Selbsttest Fehler auftreten, wird der Lauf nicht automatisch gestartet.

## Konfigurieren eines Laufs (BaseSpace- oder Local Run Manager-Konfiguration)

- 1 Wählen Sie im Startbildschirm die Option **Sequence** (Sequenzieren).  
Der Befehl „Sequence“ (Sequenzieren) gibt die Verbrauchsmaterialien aus dem vorherigen Lauf frei und öffnet eine Reihe von Bildschirmen für die Laufkonfiguration.

## Anmelden bei BaseSpace oder Local Run Manager

- 1 Geben Sie Ihren Benutzernamen und das Kennwort für ein.
- 2 Wählen Sie **Next** (Weiter).

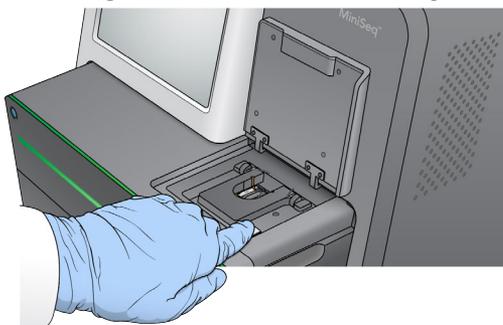
## Auswahl eines verfügbaren Laufs

- 1 Wählen Sie den Namen eines Laufs aus der Liste der verfügbaren Läufe aus.  
Verwenden Sie die Nach-oben- und Nach-unten-Pfeile, um durch die Liste zu blättern, oder geben Sie den Namen eines Laufs im Feld „Search“ (Suchen) ein.
- 2 Wählen Sie **Next** (Weiter).

## Laden der Fließzelle

- 1 Öffnen Sie die Tür der Fließzellenkammer.
- 2 Drücken Sie den Freigabeknopf rechts vom Fließzellenriegel.

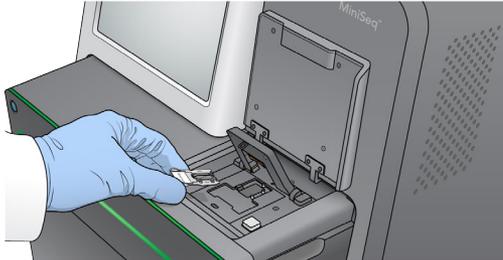
**Abbildung 17** Geöffneter Fließzellenriegel



- 3 Entfernen Sie ggf. die gebrauchte Fließzelle aus dem vorherigen Lauf.

- 4 Stellen Sie sicher, dass der Fließzellentisch sauber ist. Wenn Schmutzpartikel vorhanden sind, reinigen Sie den Fließzellentisch mit einem Alkoholtupfer.
- 5 Platzieren Sie die Fließzelle über die Ausrichtungsstifte auf dem Fließzellentisch.

**Abbildung 18** Platzieren der Fließzelle auf dem Tisch



- 6 Schließen Sie den Fließzellenriegel, um die Fließzelle zu sichern.

**Abbildung 19** Geschlossener Fließzellenriegel



- 7 Schließen Sie die Tür der Fließzellenkammer.

## Laden der Reagenzienkartusche

- 1 Öffnen Sie die Tür der Reagenzienkammer.
- 2 Entfernen Sie ggf. die gebrauchte Reagenzienkartusche.

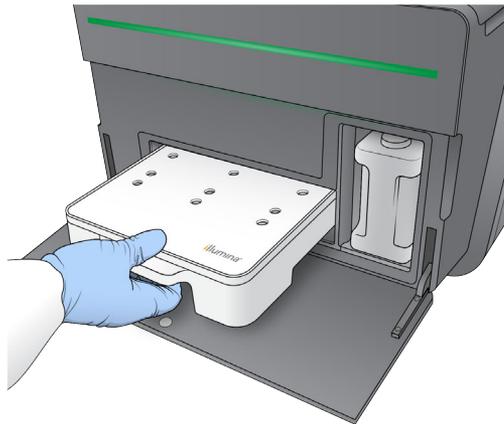


### **HINWEIS**

Um die sichere Entsorgung nicht verwendeter Reagenzien, die Formamid enthalten, zu erleichtern, lässt sich der Behälter in Position 9 herausnehmen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Herausnehmen des gebrauchten Behälters in Position 9 auf Seite 34.*

- 3 Schieben Sie die Reagenzienkartusche bis zum Anschlag in die Reagenzienkammer.

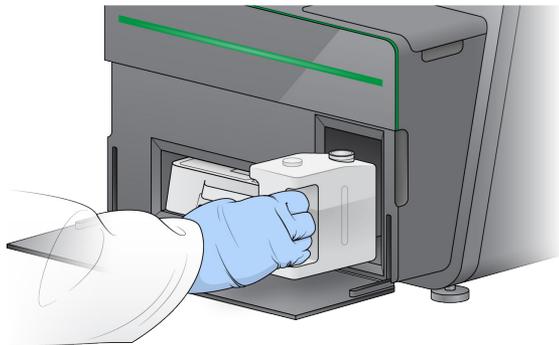
**Abbildung 20** Laden der Reagenzienkartusche



## Leeren der Flasche für verbrauchte Reagenzien

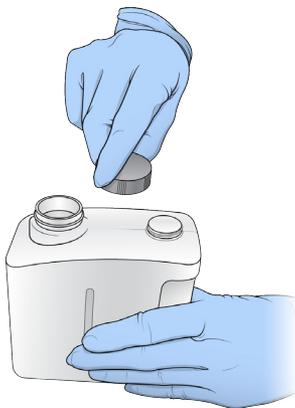
- 1 Entfernen Sie die Flasche für verbrauchte Reagenzien aus der Kammer.

**Abbildung 21** Entfernen der Flasche für verbrauchte Reagenzien



- 2 Verschließen Sie die Flaschenöffnung mit dem Schraubdeckel, um zu verhindern, dass beim Transportieren der Flasche Flüssigkeit verschüttet wird.

**Abbildung 22** Verschließen der Flasche für verbrauchte Reagenzien



- 3 Entsorgen Sie den Inhalt der Flasche gemäß den geltenden Vorschriften.

**WARNUNG**

Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

- 4 Schieben Sie die leere Flasche für verbrauchte Reagenzien ohne Schraubdeckel bis zum Anschlag in die Kammer.
- 5 Schließen Sie die Kammertür und wählen Sie **Next** (Weiter).

## Prüfen der Laufparameter

- 1 Prüfen Sie die Laufparameter.

Die Steuerungssoftware prüft die Anzahl der angegebenen Zyklen anhand folgender Kriterien:

- ▶ Die Gesamtzahl der Zyklen überschreitet nicht die zulässige Maximalzahl der für den Lauf geladenen Reagenzienkartusche.
- ▶ Read 1 umfasst mehr Zyklen als die fünf Zyklen der Matrizenbildung.
- ▶ Die Anzahl der Index-Read-Zyklen ist nicht höher als die Anzahl der Read 1- und Read 2-Zyklen.

**HINWEIS**

Vergewissern Sie sich, dass Sie die korrekte Anzahl an Index-Read-Zyklen für die zu sequenzierenden Bibliotheken angeben. Weitere Informationen finden Sie in der Dokumentation zur Bibliotheksvorbereitung.

- 2 **[Optional]** Wählen Sie **Edit** (Bearbeiten), um die Laufparameter zu ändern. Wenn Sie fertig sind, wählen Sie **Save** (Speichern).
  - ▶ **Purge consumables for this run** (Verbrauchsmaterialien für diesen Lauf entsorgen): Ändern Sie die Einstellung, um nach dem aktuellen Lauf Verbrauchsmaterialien automatisch zu entsorgen.
  - ▶ **Run parameters** (Laufparameter): Ändern Sie den Read-Typ oder die Anzahl der Zyklen pro Read.
  - ▶ **Custom primers** (Anwendungsspezifische Primer): Ändern Sie die Einstellungen für anwendungsspezifische Primer.
- 3 Wählen Sie **Next** (Weiter).

**HINWEIS**

Öffnen Sie nicht die Tür der Reagenzienkammer oder der Fließzellenkammer, während der automatische Selbsttest oder der Sequenzierunslauf durchgeführt wird.

## Überprüfen der automatischen Systemprüfung

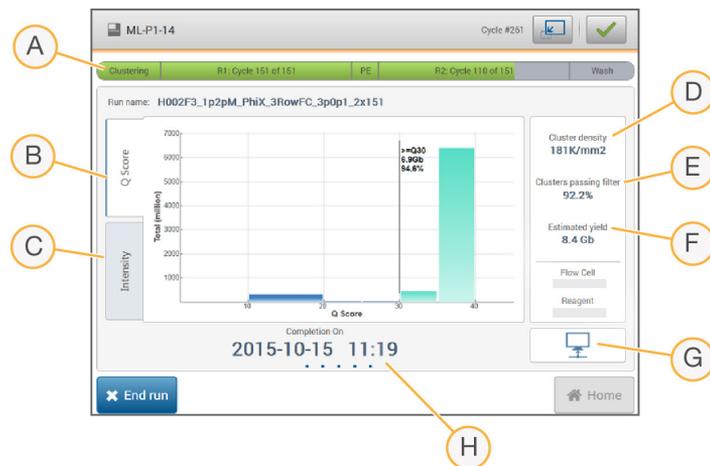
- 1 Prüfen Sie die Ergebnisse des automatischen Selbsttests.
  - ▶ Um einen Test während seiner Durchführung zu stoppen, wählen Sie **Cancel** (Abbrechen).
  - ▶ Bei allen Elementen, die den Test nicht bestehen, ist eine Aktion erforderlich, bevor Sie fortfahren können. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Fehler beim automatischen Selbsttest auf Seite 44*.
  - ▶ Um den Test wieder zu starten, wählen Sie **Retry** (Wiederholen). Die Prüfung wird beim ersten unvollständigen oder fehlgeschlagenen Test fortgesetzt.
- 2 Um den Lauf zu starten, wählen Sie eine der folgenden Optionen.

- ▶ Wenn das System nicht für einen automatischen Start des Laufs nach erfolgreicher Durchführung des Selbsttests konfiguriert ist, wählen Sie **Start** (Starten).
- ▶ Ist das System für den automatischen Start konfiguriert, wird der Sequenzierungslauf automatisch gestartet. Sie müssen nicht anwesend sein. Falls jedoch beim Selbsttest Fehler auftreten, wird der Lauf nicht automatisch gestartet.

## Überwachen des Lauffortschritts

- 1 Sie können den Lauffortschritt, Intensitäten und Qualitäts-Scores überwachen, während auf dem Bildschirm Kennzahlen aufgeführt werden.

Abbildung 23 Fortschritt und Kennzahlen eines Sequenzierungslaufs



- A **Run progress** (Lauffortschritt): Zeigt den aktuellen Schritt und die Anzahl der durchgeführten Zyklen für jeden Read-Vorgang an. Die Fortschrittsanzeige steht nicht im Verhältnis zur Laufgeschwindigkeit der einzelnen Schritte.
- B **Q-Score**: Zeigt die Verteilung der Qualitäts-Scores (Q-Scores) an. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter [Qualitätsbewertung auf Seite 58](#).
- C **Intensity** (Intensität): Zeigt den Wert der Clusterintensitäten von 90 % der Daten für jede Platte an. Die Basen werden durch die Plot-Farben gekennzeichnet: A ist Rot, C ist Grün, G ist Blau und T ist Schwarz.
- D **Cluster Density (K/mm<sup>2</sup>)** (Clusterdichte): Zeigt die Anzahl an Clustern, die für den Lauf erkannt wurden.
- E **Clusters Passing Filter (%)** (Cluster nach Filterung): Zeigt den Prozentsatz der Cluster nach Filterung an. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter [Cluster nach Filterung auf Seite 58](#).
- F **Estimated Yield (Gb)** (Geschätzte Menge): Zeigt die beabsichtigte Anzahl der Basen für den geplanten Lauf an.
- G **Data transfer status** (Status der Datenübertragung): Zeigt basierend auf der Konfiguration der Analyse den Status der Datenübertragung an.
- H **Time to completion** (Laufdauer): Zeigt Datum und Uhrzeit (JJJJ-MM-TT hh:mm) des Laufendes an.



### HINWEIS

Nachdem Sie „Home“ (Startseite) ausgewählt haben, können Sie nicht mehr zur Anzeige der Laufkennzahlen zurückkehren. Die Laufkennzahlen sind allerdings auf BaseSpace vorhanden und über einen Netzwerkcomputer, der den Sequenzierungsanalyse-Viewer verwendet, oder über einen Netzwerkcomputer, der Local Run Manager verwendet, zugänglich.

## Zyklen für Laufkennzahlen

Laufkennzahlen erscheinen zu verschiedenen Zeitpunkten während eines Laufs.

- ▶ Während der Schritte für die Clusterbildung werden keine Kennzahlen angezeigt.
- ▶ Die ersten fünf Zyklen sind der Matrizenbildung vorbehalten.
- ▶ In Zyklus 6 sind die Roh-Clusterdichte und die Intensitäten von Zyklus 1 verfügbar.
- ▶ Nach Zyklus 25 sind Cluster nach Filterung, Menge und Qualitäts-Scores verfügbar.

## Sequenzierungsanalyse-Viewer

Die Sequenzierungsanalyse-Viewer-Software zeigt die Sequenzierungskennzahlen, die während des Sequenzierungslaufs generiert werden. Die Kennzahlen werden in Form von Schaubildern, Diagrammen und Tabellen dargestellt und basieren auf den Daten, die von der Echtzeitanalyse generiert und in InterOp-Dateien geschrieben wurden. Die Kennzahlen werden während des Laufs aktualisiert. Wählen Sie zu einem beliebigen Zeitpunkt während des Laufs **Refresh** (Aktualisieren), um aktualisierte Kennzahlen zu erhalten. Weitere Informationen finden Sie im *Sequencing Analysis Viewer User Guide (Teile-Nr. 15020619)*.

Der Sequenzierungsanalyse-Viewer ist eine Komponente der auf dem Gerätecomputer installierten Software. Zur Remote-Überwachung der Laufkennzahlen können Sie den Sequenzierungsanalyse-Viewer auch auf einem unabhängigen Computer mit Zugriff auf dasselbe Netzwerk installieren, mit dem das Gerät verbunden ist.

## Status der Datenübertragung

Je nach ausgewählter Konfiguration für die Analyse wird während des Laufs ein Symbol auf dem Bildschirm angezeigt, das den Verbindungsstatus angibt.

Status	BaseSpace	BaseSpace Onsite	Local Run Manager	Eigenständiges Gerät
Verbunden				
Datenübertragung				
Nicht verbunden				
Deaktiviert				

Gegebenenfalls werden mehrere Symbole auf dem Bildschirm angezeigt. Bei der Übertragung der Laufdaten an BaseSpace und an einen zusätzlichen Speicherort des Ausgabeordners sind z. B. das BaseSpace-Symbol und das Symbol für eigenständige Geräte auf dem Bildschirm zu sehen.

## Laufkopierdienst

Die MiniSeq System Software Suite enthält einen Laufkopierdienst. Der Laufkopierdienst kopiert die von der RTA generierten Dateien in den angegebenen Ausgabeordner.

Falls während des Laufs die Datenübertragung unterbrochen wird, werden die Daten vorübergehend auf dem Gerätecomputer gespeichert. Nach der Wiederherstellung der Verbindung während der Laufdurchführung wird die Datenübertragung automatisch fortgesetzt. Wenn die Verbindung nicht vor Abschluss des Laufs wiederhergestellt wird, übertragen Sie die Daten manuell an den bevorzugten Speicherort.

## Übertragung an BaseSpace

Die Laufdaten werden mit BaseSpace Broker an BaseSpace übertragen. Falls die Verbindung zu BaseSpace unterbrochen wird, versucht der Broker sieben Tage lang, die Daten hochzuladen. Wenn nach sieben Tagen die Verbindung nicht wiederhergestellt werden konnte, werden die Laufdaten gelöscht.

Wenn Sie einen zusätzlichen Speicherort für Laufdaten angeben, werden die Daten an diesen Speicherort gesendet, unabhängig vom Status von BaseSpace Broker.

## Automatischer Nachwaschlauf

Nach Abschluss des Sequenzierungslaufs wird ein automatischer Nachwaschlauf mit der Waschlösung und dem NaOCl in der Reagenzienkartusche initiiert.

Der automatische Nachwaschlauf dauert etwa 60 Minuten. Nach Abschluss des Waschlaufs wird die Schaltfläche Home (Startseite) wieder aktiviert. Während des Waschlaufs bleiben die Sequenzierungsergebnisse auf dem Bildschirm eingeblendet.

## Nach dem Waschlauf

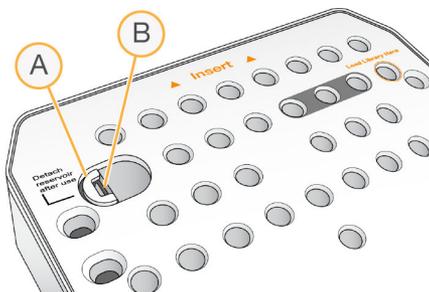
Nach dem Waschlauf bleiben die Sipper in der unteren Position, wodurch verhindert wird, dass Luft in das System eindringt. Belassen Sie die Kartusche bis zum nächsten Lauf in ihrer Position.

## Herausnehmen des gebrauchten Behälters in Position 9

Der Behälter in Position 9 der Reagenzienkartusche enthält Formamid. Bevor Sie die gebrauchte Reagenzienkartusche entsorgen, können Sie den Behälter in Position 9 herausnehmen und getrennt entsorgen.

- 1 Ziehen Sie Handschuhe an und drücken Sie den weißen abbrechbaren Bügel in Position 9 nach unten, um die drei Verbindungspunkte zu brechen.

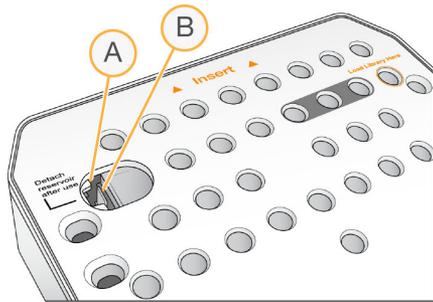
**Abbildung 24** Abbrechbarer Bügel in Position 9



- A Abbrechbarer Bügel ist noch intakt
- B Behälterklemme

- 2 Schieben Sie den abbrechbaren Bügel nach links in Richtung des Kartuschenrands, bis er unter die Kartuschenabdeckung gleitet.

**Abbildung 25** Abbrechbarer Bügel entfernt, Behälterklemme freigelegt



- A Abbrechbarer Bügel befindet sich unter der Kartuschenabdeckung
- B Behälterklemme

- 3 Drücken Sie die durchsichtige Kunststoffbehälterklemme nach unten und ziehen Sie sie nach rechts. Der Behälter löst sich aus der Position auf der Unterseite der Reagenzienkartusche.
- 4 Entsorgen Sie den Behälter gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften.



#### WARNUNG

Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).



# Kapitel 4 Wartung

Einleitung .....	37
Durchführen eines manuellen Gerätewaschlaufs .....	37
Software-Updates .....	40

## Einleitung

Zu den Wartungsverfahren gehören manuelle Gerätewaschläufe und Systemsoftware-Updates (wenn verfügbar). Sonstige regelmäßige Wartungen sind nicht erforderlich.

- ▶ **Gerätewaschläufe:** Die Geräte bleiben einsatzbereit, wenn Sie einen automatischen Nachwaschlauf nach jedem Sequenzierungslauf durchführen. Unter bestimmten Bedingungen ist jedoch ein manueller Gerätewaschlauf erforderlich. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Durchführen eines manuellen Gerätewaschlaufs* auf Seite 37.
- ▶ **Software-Updates:** Wenn eine neue Version der System Software Suite verfügbar ist, können Sie das Update automatisch über eine Verbindung mit BaseSpace oder manuell nach dem Herunterladen des Installationsprogramms von der Illumina-Website durchführen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Software-Updates* auf Seite 40.

## Präventive Wartung

Illumina empfiehlt, jährlich eine präventive Wartung durchführen zu lassen. Wenn Sie keinen Servicevertrag abgeschlossen haben, wenden Sie sich an den für Ihre Region zuständigen Kundenbetreuer oder an den technischen Support von Illumina, um einen Termin für eine kostenpflichtige präventive Wartung zu vereinbaren.

## Durchführen eines manuellen Gerätewaschlaufs

Zu den manuellen Gerätewaschlaufoptionen gehören der Schnellwaschlauf und der manuelle Nachwaschlauf.

Waschlauftypen	Beschreibung
Schnellwaschlauf Dauer: 20 Minuten	Ein Schnellwaschlauf ist alle sieben Tage erforderlich, wenn sich das Gerät im Leerlauf befindet, oder nach einem Ausschalten des Geräts. Beim Waschlauf wird das System mit einer vom Benutzer bereitgestellten Waschlösung aus Wasser in Laborqualität und Tween 20 gespült.
Manueller Nachwaschlauf Dauer: 90 Minuten	Ein manueller Nachwaschlauf ist erforderlich, wenn der automatische Nachwaschlauf nicht durchgeführt wurde. Dies ist z. B. der Fall, wenn ein Lauf vorzeitig beendet und die Fließzelle zwecks späterer Rehybridisierung gespeichert wurde. Beim Waschlauf wird das System mit einer vom Benutzer bereitgestellten Lösung aus 0,12 % Natriumhypochlorit und einer Waschlösung aus Wasser in Laborqualität und Tween 20 gespült.

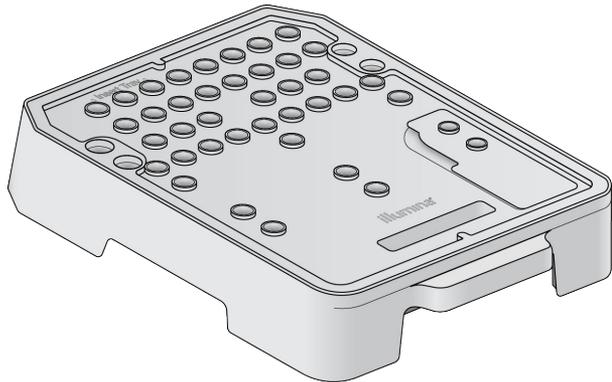


### HINWEIS

Verwenden Sie stets eine frische NaOCl-Lösung, die innerhalb der letzten **24 Stunden** vorbereitet wurde. Wenn Sie eine Menge von mehr als 1 ml vorbereiten, bewahren Sie die verbleibende Lösung bei 2 °C bis 8 °C auf und verwenden Sie sie innerhalb der nächsten 24 Stunden. Entsorgen Sie anderenfalls die restliche NaOCl-Lösung.

Zum Durchführen eines manuellen Gerätewaschlaufs werden die im Lieferumfang des Geräts enthaltene Waschlaufkartusche und Waschlauf-Fließzelle benötigt. Alternativ können Sie eine gebrauchte Fließzelle für den Waschlauf verwenden.

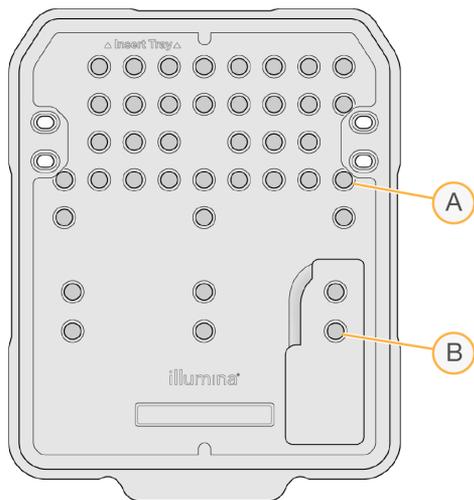
Abbildung 26 Waschlaufkartusche



## Vorbereiten eines manuellen Nachwaschlaufs

- 1 Mischen Sie folgende Volumina, um eine 0,12-%-NaOCl-Lösung zu erhalten.
  - ▶ 5 % NaOCl (31 µl)
  - ▶ Wasser in Laborqualität (1.269 µl)
- 2 Geben Sie 1,3 ml 0,12 % NaOCl in die Waschlaufkartusche.  
Der richtige Behälter entspricht Position **31** auf der vorgefüllten Reagenzienkartusche.

Abbildung 27 Positionen für NaOCl und die Waschlösung



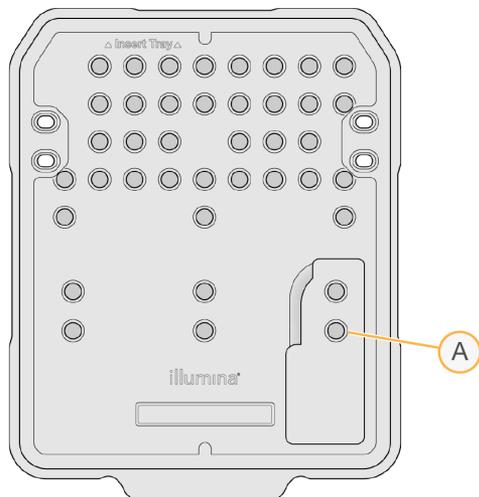
- A 0,12 % NaOCl
- B Waschlösung

- 3 Mischen Sie folgende Volumina, um eine 0,05-%-Tween-20-Waschlösung zu erhalten.
  - ▶ 100 % Tween 40 (20 µl)
  - ▶ Wasser in Laborqualität (80 ml)
- 4 Geben Sie 80 ml Waschlösung in die Waschlaufkartusche.  
Der richtige Behälter entspricht Position **40** auf der vorgefüllten Reagenzienkartusche.
- 5 Wählen Sie im Startbildschirm **Perform wash** (Waschlauf durchführen) und anschließend **Manual post-run wash** (Manueller Nachwaschlauf).

## Vorbereiten eines Schnellwaschlaufs

- 1 Mischen Sie folgende Volumina, um eine 0,05%-Tween-20-Waschlösung zu erhalten.
  - ▶ 100 % Tween 20 (20 µl)
  - ▶ Wasser in Laborqualität (40 ml)
- 2 Geben Sie 40 ml Waschlösung in die Waschlaufkartusche.  
Der richtige Behälter entspricht Position **40** auf der vorgefüllten Reagenzienkartusche.

**Abbildung 28** Position für Waschlösung



A Waschlösung

- 3 Wählen Sie im Startbildschirm **Perform wash** (Waschlauf durchführen) und anschließend **Quick Wash** (Schnellwaschlauf).

## Laden der Waschlaufließzelle und der Waschlaufkartusche

- 1 Laden Sie die Waschlaufließzelle. Schließen Sie die Fließzellenklemme und die Fließzellentür.



### HINWEIS

Alternativ können Sie eine gebrauchte Fließzelle einsetzen.

- 2 Entfernen Sie ggf. die gebrauchte Reagenzienkartusche des vorherigen Laufs.
- 3 Laden Sie die vorbereitete Waschlaufkartusche.

- Entfernen Sie die Flasche für verbrauchte Reagenzien und entsorgen Sie den Inhalt gemäß den geltenden Vorschriften.



#### WARNUNG

Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, Handschuhen und Laborkittel. Verbrauchte Reagenzien sind als chemische Abfälle zu behandeln. Entsorgen Sie sie daher gemäß den geltenden regionalen, nationalen und lokalen Gesetzen und Vorschriften. Zusätzliche umwelt-, gesundheits- und sicherheitsbezogene Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

- Schieben Sie die leere Flasche für verbrauchte Reagenzien bis zum Anschlag in die Kammer.
- Schließen Sie die Tür der Reagenzienkammer.
- Wählen Sie **Next** (Weiter).

## Starten des Waschlaufs

- Wählen Sie nach Abschluss des Selbsttests die Option **Start** (Starten).
- Wählen Sie nach Abschluss des Waschlaufs **Home** (Startseite).

## Nach dem Waschlauf

Nach dem Waschlauf bleiben die Sipper in der unteren Position, wodurch verhindert wird, dass Luft in das System eindringt. Belassen Sie die Kartusche bis zum nächsten Lauf in ihrer Position.

## Software-Updates

Software-Updates sind in einem Software-Paket, der sogenannten System Suite gebündelt, die aus der folgenden Software besteht:

- ▶ MiniSeq Control Software
- ▶ MiniSeq-Rezepturen
- ▶ RTA2
- ▶ Local Run Manager
- ▶ MiniSeq Service Software
- ▶ Sequenzierungsanalyse-Viewer
- ▶ BaseSpace Broker

Versionshinweise zur Software finden Sie auf der Supportseite für das MiniSeq-System auf der Illumina-Website.

Sie können Software-Updates automatisch über eine Internetverbindung installieren oder manuell über ein Netzwerk oder einen USB-Speicherort.

- ▶ **Automatische Updates:** Wenn Geräte mit einem Netzwerk mit Internetzugang verbunden sind, wird bei Verfügbarkeit eines Software-Updates ein entsprechendes Symbol  auf der Schaltfläche „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) im Startbildschirm angezeigt.

- ▶ **Manuelle Updates:** Laden Sie das System Suite-Installationsprogramm von der [Supportseite für das MiniSeq-System](#) auf der Illumina-Website herunter.



#### HINWEIS

Wenn Sie ein Update während des Installationsvorgangs abbrechen, wird der Installationsvorgang an der aktuellen Stelle gestoppt. Die bis zum Zeitpunkt des Abbruchs durchgeführten Änderungen werden nicht deinstalliert oder rückgängig gemacht.

## Automatisches Software-Update

- 1 Wählen Sie **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
- 2 Wählen Sie **Software Update** (Software-Update).
- 3 Wählen Sie **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Update installieren, das bereits von BaseSpace heruntergeladen wurde).
- 4 Wählen Sie **Update** (Aktualisieren), um den Aktualisierungsvorgang zu starten. Ein Dialogfeld zum Bestätigen des Befehls wird geöffnet.
- 5 Befolgen Sie die Anweisungen des Installationsassistenten:
  - a Akzeptieren Sie die Lizenzvereinbarung.
  - b Lesen Sie die Liste der Software, die in diesem Update enthalten ist.

Nach Abschluss des Software-Updates wird die Steuerungssoftware automatisch neu gestartet.



#### HINWEIS

Wenn das Update ein Firmware-Update enthält, ist nach Abschluss des Firmware-Updates ein automatischer Neustart des Systems erforderlich.

## Manuelles Software-Update

- 1 Laden Sie das Installationsprogramm für die System Suite von der Illumina-Website herunter und speichern Sie es an einem Netzwerkspeicherort. Alternativ können Sie die Softwareinstallationsdatei auf einem USB-Laufwerk speichern.
- 2 Wählen Sie **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
- 3 Wählen Sie **Software Update** (Software-Update).
- 4 Wählen Sie **Manually install the update from the following location** (Update manuell von folgendem Speicherort installieren).
- 5 Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen), um zum Speicherort der Softwareinstallationsdatei zu navigieren, und wählen Sie anschließend **Update** (Aktualisieren).
- 6 Befolgen Sie die Anweisungen des Installationsassistenten:
  - a Akzeptieren Sie die Lizenzvereinbarung.
  - b Lesen Sie die Liste der Software, die in diesem Update enthalten ist.

Nach Abschluss des Software-Updates wird die Steuerungssoftware automatisch neu gestartet.



#### HINWEIS

Wenn das Update ein Firmware-Update enthält, ist nach Abschluss des Firmware-Updates ein automatischer Neustart des Systems erforderlich.



# Anhang A Fehlerbehebung

Dateien für die Fehlerbehebung .....	43
Fehler beim automatischen Selbsttest .....	44
RTA-Fehler .....	46
Workflow für die Rehybridisierung .....	46
Systemprüfung .....	48
Netzwerkkonfigurationseinstellungen .....	51
Anwendungsspezifische Genome .....	52
Ausschalten des Geräts .....	52

## Dateien für die Fehlerbehebung

Schlüsseldatei	Ordner	Beschreibung
Laufinformationsdatei (RunInfo.xml)	Stammordner	Enthält die folgenden Informationen: <ul style="list-style-type: none"><li>• Laufname</li><li>• Anzahl der Zyklen im Lauf</li><li>• Anzahl der Zyklen in jedem Read</li><li>• Angabe, ob der Read indiziert ist</li><li>• Anzahl der Bildstreifen und Platten auf der Fließzelle</li></ul>
Laufparameterdatei (RunParameters.xml)	Stammordner	Enthält Informationen zu den Laufparametern und Laufkomponenten. Hierzu gehören RFID, Seriennummer, Chargennummer und Ablaufdatum.
RTA-Konfigurationsdatei (RTAConfiguration.xml)	Data\Intensities	Enthält die RTA-Konfigurationseinstellungen für den Lauf. Die Datei RTAConfiguration.xml wird am Anfang des Laufs generiert.
InterOp-Dateien (*.bin)	InterOp	Binäre Berichtsdateien, die im Sequenzierungsanalyse-Viewer verwendet werden. InterOp-Dateien werden während des Laufs aktualisiert.
Protokolldateien	Logs	Protokolldateien beschreiben jeden vom Gerät für jeden Zyklus durchgeführten Schritt und listen die Software- und Firmware-Versionen auf, die beim Lauf verwendet wurden. Die Datei mit dem Namen [Gerätename]_CurrentHardware.csv listet die Seriennummern der Gerätekomponenten auf.
Fehlerprotokolldateien (*ErrorLog*.txt)	RTALogs	In diesen Dateien werden RTA-Fehler protokolliert. Die Fehlerprotokolldateien werden aktualisiert, sobald ein Fehler festgestellt wird.
Globale Protokolldateien (*GlobalLog*.tsv)	RTALogs	In diesen Dateien werden alle RTA-Ereignisse protokolliert. Die globalen Protokolldateien werden während des Laufs aktualisiert.
Lane-Protokolldateien (*LaneLog*.txt)	RTALogs	In diesen Dateien werden alle RTA-Verarbeitungsereignisse protokolliert. Die Lane-Protokolldateien werden während des Laufs aktualisiert.

## Ressourcen für die Fehlerbehebung

Falls Sie technische Fragen haben, besuchen Sie die Supportseiten für das MiniSeq-System auf der Illumina-Website. Die Supportseiten bieten Zugriff auf Dokumentation, Downloads und häufig gestellte Fragen.

Melden Sie sich bei Ihrem MyIllumina-Konto an, um Zugang zu den Support-Bulletins zu erhalten.

Wenden Sie sich hinsichtlich Problemen mit der Laufqualität oder der Leistung an den technischen Support von Illumina. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Technische Unterstützung auf Seite 64*.

Es wird empfohlen, einen Link zur Lauf-Zusammenfassung in BaseSpace für den technischen Support von Illumina freizugeben, um die Fehlerbehebung zu erleichtern.

## Prozess-Status

Die MiniSeq Control Software listet den Status von mindestens drei Läufen im Temp-Ordner des Systems auf. Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **Process status** (Prozess-Status).

Das System listet für jeden Laufnamen den Status der folgenden Komponenten auf:

- ▶ **Echtzeitanalyse (RTA)**: Basierend auf der Verarbeitung von BCL-Dateien
- ▶ **Local Run Manager**: Wenn Local Run Manager für den Lauf verwendet wurde
- ▶ **File Copy** (Dateien kopieren): Basierend auf der Dateiübertragung mit dem Laufkopierdienst
- ▶ **BaseSpace**: Wenn BaseSpace für den Lauf verwendet wurde

## Ordner „Sequencing Archive“ (Sequenzierungsarchiv)

Bei jedem Lauf auf dem Gerät speichert die MiniSeq Control Software Dateien zur Lauf-Zusammenfassung in folgendem Ordner auf dem Gerätecomputer: D:\Illumina\MiniSeq Sequencing Archive.

In diesem Ordner wird bei jedem auf dem Gerät durchgeführten Lauf ein Unterordner mit den folgenden Dateien erstellt:

- ▶ **RunCompletionStatus.xml**: Enthält den Status nach Abschluss des Laufs, den Laufordnernamen, die Anzahl der geplanten und durchgeführten Zyklen, die Clusterdichte, die Cluster nach Filterung und die geschätzte Menge für den Lauf.
- ▶ **RunParameters.xml**: Enthält Informationen zu den Laufparametern und Laufkomponenten. Hierzu gehören RFID, Seriennummer, Chargennummer und Ablaufdatum.

## Fehler beim automatischen Selbsttest

Falls während des automatischen Selbsttests Fehler auftreten, können Sie die folgenden empfohlenen Aktionen verwenden, um den Fehler zu beheben.

Wenn ein Selbsttest fehlschlägt, wird die RFID der Reagenzienkartusche nicht gesperrt und kann für einen nachfolgenden Lauf verwendet werden. Die RFID wird jedoch gesperrt, sobald die Verschlussfolien durchstoßen wurden.

Systemprüfungen	Empfohlene Aktion
Doors closed (Türen geschlossen)	Stellen Sie sicher, dass die Kammertüren geschlossen sind.
Consumables loaded (Verbrauchsmaterialien geladen)	Die Verbrauchsmaterialiensensoren funktionieren nicht. Stellen Sie sicher, dass alle Verbrauchsmaterialien ordnungsgemäß geladen sind. Wählen Sie in den Laufkonfigurationsbildschirmen die Option <b>Back</b> (Zurück), um zum Ladeschritt zurückzukehren, und wiederholen Sie die Laufkonfiguration.
Required software (Erforderliche Software)	Wichtige Software-Komponenten fehlen. Führen Sie manuell ein Software-Update durch, damit alle Software-Komponenten installiert werden.
Instrument disk space (Speicherplatz auf dem Gerät)	Auf der Festplatte des Geräts ist nicht genügend Speicherplatz für die Durchführung eines Laufs verfügbar. Löschen Sie die Laufdaten von der Festplatte des Geräts.

Systemprüfungen	Empfohlene Aktion
Network connection (Netzwerkverbindung)	Die Verbindung zum angegebenen Speicherort des Ausgabeordners wurde getrennt. Der Test hat zwar die Bezeichnung „Network Connection (Netzwerkverbindung)“, er prüft jedoch die Verbindung zu allen für den Ausgabeordner angegebenen Speicherorten: auf einem Server, einer externen Festplatte oder der lokalen Festplatte. Prüfen Sie den Status der Verbindung zum angegebenen Speicherort des Ausgabeordners.
Network disk space (Netzwerkspeicherplatz)	Auf dem angegebenen Speicherort des Ausgabeordners steht kein Speicherplatz mehr zur Verfügung. Der Test hat zwar die Bezeichnung „Network Disk Space (Netzwerkspeicherplatz)“, er prüft jedoch alle für den Ausgabeordner angegebenen Speicherorte: auf einem Server, einer externen Festplatte oder der lokalen Festplatte. Machen Sie Speicherplatz am angegebenen Speicherort des Ausgabeordners frei.
Temperatur	Empfohlene Aktion
Temperature ramp (Temperaturanstieg)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Temperature sensors (Temperatursensoren)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Fans (Lüfter)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Bildgebungssystem	Empfohlene Aktion
Imaging limits (Bildgebungsbeschränkungen)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Z Step-and-Settle (z-Tisch – Schritt und Positionseinnahme)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Bit error rate (Bit-Fehlerrate)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Flow cell registration (Fließzellenregistrierung)	Möglicherweise ist die Fließzelle nicht korrekt positioniert. <ul style="list-style-type: none"> <li>Wählen Sie in den Laufkonfigurationsbildschirmen die Option <b>Back</b> (Zurück), um zum Fließzellenschritt zurückzukehren.</li> <li>Nehmen Sie die Fließzelle heraus und setzen Sie sie erneut ein, um sicherzustellen, dass sie korrekt positioniert ist.</li> </ul>
Reagenzienzugabe	Empfohlene Aktion
Valve response (Ventilreaktionszeit)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Pump (Pumpe)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.

## Speicherplatz auf der Festplatte

Die Festplatte des Gerätecomputers bietet, basierend auf den Daten eines Laufs mit den folgenden Laufparametern, Speicherplatz für etwa 45 Läufe:

- ▶ Ein Paired-End-Lauf mit 150 Zyklen benötigt etwa 5 bis 6 GB an Speicherplatz.
- ▶ Bei Verwendung des Local Run Manager-Analysemoduls für die Resequenzierung sind 10 GB zusätzlich erforderlich.

Bei jedem Lauf erstellt die Software einen temporären Laufordner. Die im temporären Laufordner gespeicherten Dateien werden in den Ausgabeordner kopiert. Wenn Sie für den Ausgabeordner einen Speicherort auf der Festplatte des Gerätecomputers festlegen, werden zwei Kopien des Laufs auf der Festplatte gespeichert. Die Software speichert die temporären Laufordner der letzten drei Läufe.

Wenn Sie die Analyse mit der Local Run Manager-Software durchführen, werden die temporär gespeicherten Dateien nicht automatisch gelöscht. Sie müssen die Aufbewahrungsvorschriften im Bildschirm „System Settings“ (Systemeinstellungen) von Local Run Manager manuell auswählen.

Temporäre Dateien können den freien Speicherplatz der Festplatte füllen. Es wird empfohlen, einen Netzwerkspeicherort für die Laufdaten festzulegen und eine angemessene Aufbewahrungsvorschrift für Local Run Manager entsprechend der Anzahl der durchzuführenden Läufe auszuwählen.

## RTA-Fehler

Zum Beheben von Fehlern, die bei der Echtzeitanalyse aufgetreten sind, prüfen Sie zunächst das RTA-Fehlerprotokoll. Diese Datei wird im Ordner RTALogs gespeichert. Wenn der Lauf erfolgreich durchgeführt wurde, ist die Datei nicht vorhanden. Fügen Sie das Fehlerprotokoll bei, wenn Sie sich wegen Problemen an den technischen Support von Illumina wenden.

## Fehlerbehandlung

RTA2 erstellt Protokolldateien und speichert sie im Ordner „RTALogs“. Fehler werden im \*.tsv-Format in einer Fehlerdatei aufgezeichnet.

Wenn die Verarbeitung abgeschlossen ist, werden die folgenden Protokoll- und Fehlerdateien an das endgültige Ausgabebziel übertragen:

- ▶ \*GlobalLog\*.tsv enthält eine Zusammenfassung wichtiger Lauf-Ereignisse.
- ▶ \*LaneNLog\*.tsv listet die Verarbeitungsereignisse auf. Auf einer MiniSeq-Fließzelle ist N immer 1.
- ▶ \*Error\*.tsv protokolliert während des Laufs aufgetretene Fehler.
- ▶ \*WarningLog\*.tsv führt während des Laufs aufgetretene Warnungen auf.

## Workflow für die Rehybridisierung

Wenn die während der ersten Zyklen generierten Kennzahlen eine Intensität von unter 2.500 aufweisen, ist möglicherweise ein Rehybridisierungslauf erforderlich. Bestimmte Bibliotheken mit geringer Varianz können Intensitäten von unter 1.000 aufweisen. Dies ist normal und lässt sich nicht durch eine Rehybridisierung beheben.



### HINWEIS

Der Befehl zum Beenden eines Laufs ist endgültig. Der Lauf kann nicht wieder aufgenommen werden, die Verbrauchsmaterialien des Laufs können nicht wiederverwendet werden und die Sequenzierungsdaten des Laufs werden nicht gespeichert.

Wenn Sie einen Lauf beenden und die Fließzelle speichern, führt die Software die folgenden Schritte durch, bevor der Lauf beendet wird:

- ▶ Versetzt die Fließzelle in einen sicheren Zustand.
- ▶ Entsperrt die Fließzellen-RFID für einen nachfolgenden Lauf.
- ▶ Weist der Fließzelle ein Ablaufdatum für die Rehybridisierung zu.
- ▶ Erstellt die Laufprotokolle für abgeschlossene Zyklen. Eine Verzögerung ist normal.
- ▶ Übergeht den automatischen Nachwaschlauf.

Wenn Sie einen Rehybridisierungslauf starten, führt die Software die folgenden Schritte durch, um den Lauf durchzuführen:

- ▶ Erstellt einen Laufordner basierend auf einem eindeutigen Namen des Laufs.

- ▶ Prüft, ob das Datum der Fließzellenrehybridisierung abgelaufen ist.
- ▶ Füllt die Reagenzien vor. Eine Verzögerung ist normal.
- ▶ Überspringt den Clustering-Schritt.
- ▶ Entfernt den vorherigen Read 1-Primer.
- ▶ Hybridisiert einen frischen Read 1-Primer.
- ▶ Fährt bei Read 1 fort und führt den Lauf gemäß den angegebenen Laufparametern durch.

## Zeitpunkte für das Beenden eines Laufs für die Rehybridisierung

Eine spätere Rehybridisierung ist nur beim Beenden eines Laufs zu den folgenden Zeitpunkten möglich:

- ▶ **Nach Zyklus 5:** Intensitäten werden nach der Matrizenregistrierung angezeigt, sodass die ersten fünf Sequenzierungszyklen durchgeführt werden müssen. Auch wenn ein Lauf nach Zyklus 1 sicher beendet werden kann, wird das Beenden des Laufs nach Zyklus 5 empfohlen. Beenden Sie einen Lauf nicht während der Clusterbildung.
- ▶ **Read 1 oder Index 1 Read:** Beenden Sie den Lauf, *bevor* die Paired-End-Resynthese beginnt. Die Fließzelle kann nicht für eine spätere Rehybridisierung gespeichert werden, wenn bereits die Paired-End-Resynthese gestartet wurde.

## Erforderliche Verbrauchsmaterialien

Zum Durchführen eines Rehybridisierungslaufs ist eine neue MiniSeq-Reagenzienkartusche erforderlich, unabhängig davon, wann der Lauf angehalten wurde.

## Beenden des aktuellen Laufs

- 1 Wählen Sie **End Run** (Lauf beenden). Wenn Sie zum Bestätigen des Befehls aufgefordert werden, wählen Sie **Yes** (Ja).
- 2 Wenn Sie zum Speichern der Fließzelle aufgefordert werden, wählen Sie **Yes** (Ja). Achten Sie auf das Ablaufdatum für die Rehybridisierung.
- 3 Entfernen Sie die gespeicherte Fließzelle und lagern Sie sie bei 2 °C bis 8 °C, bis Sie den Rehybridisierungslauf konfigurieren können.



### HINWEIS

Sie können die Fließzelle bis zu sieben Tage bei 2 °C bis 8 °C im verschlossenen Fließzellenbehälter aufbewahren. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollten Sie die gespeicherte Fließzelle innerhalb von drei Tagen rehybridisieren.

## Durchführen eines manuellen Waschlaufts

- 1 Wählen Sie im Startbildschirm **Perform Wash** (Waschlauf durchführen).
- 2 Wählen Sie im Bildschirm „Wash Selection“ (Waschlaufauswahl) die Option **Manual Post-Run Wash** (Manueller Nachwaschlauf). Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Durchführen eines manuellen Gerätewaschlaufts* auf Seite 37.



### HINWEIS

Wenn die für den angehaltenen Lauf verwendete Reagenzienkartusche noch nicht entfernt wurde, kann diese für den manuellen Waschlauf verwendet werden. Andernfalls ist der manuelle Waschlauf mit der Waschlaufkartusche durchzuführen.

## Konfigurieren eines neuen Laufs auf der Registerkarte „BaseSpace Prep“ (BaseSpace-Vorbereitung)

- 1 Wenn das Gerät für BaseSpace oder BaseSpace Onsite konfiguriert ist, richten Sie den neuen Lauf auf der Registerkarte „BaseSpace Prep“ (BaseSpace-Vorbereitung) unter Verwendung derselben Parameter wie für den ursprünglichen Lauf ein.



### TIPP

Klicken Sie auf die Registerkarte „Pools“ und wählen Sie die entsprechende Pool-ID aus, um die Einstellungen des vorherigen Laufs zu übernehmen. Geben Sie anschließend dem neuen Lauf einen eindeutigen Namen.

## Konfigurieren eines Laufs auf dem Gerät

- 1 Bereiten Sie eine neue Reagenzienkartusche vor.
- 2 Wenn die gespeicherte Fließzelle aufbewahrt wurde, lassen Sie sie vor dem Gebrauch Raumtemperatur erreichen (15–30 Minuten).
- 3 Reinigen und laden Sie die gespeicherte Fließzelle.  
Das System liest die Fließzellen-RFID als gespeicherte Fließzelle und prüft, ob das Rehybridisierungsdatum gültig ist.
- 4 Entfernen Sie die Flasche für verbrauchte Reagenzien und entsorgen Sie den Inhalt ordnungsgemäß. Setzen Sie dann die leere Flasche wieder ein.
- 5 Setzen Sie die neue Reagenzienkartusche ein.
- 6 Wählen Sie im Laufkonfigurationsbildschirm eine der folgenden Konfigurationsoptionen aus:
  - ▶ **BaseSpace, BaseSpace Onsite oder Local Run Manager:** Wählen Sie den Lauf aus und prüfen Sie die Laufparameter.
  - ▶ **Standalone (Eigenständig):** Geben Sie den Namen des Laufs ein und legen Sie dieselben Parameter wie für den ursprünglichen Lauf fest.
- 7 Wählen Sie **Next** (Weiter), um mit dem Selbsttest fortzufahren und den Lauf zu starten.

## Systemprüfung

Eine Systemprüfung ist für den normalen Betrieb oder die Gerätewartung nicht erforderlich. Die Mitarbeiter des technischen Supports von Illumina bitten Sie jedoch möglicherweise zu Fehlerbehebungs Zwecken, eine Systemprüfung durchzuführen.

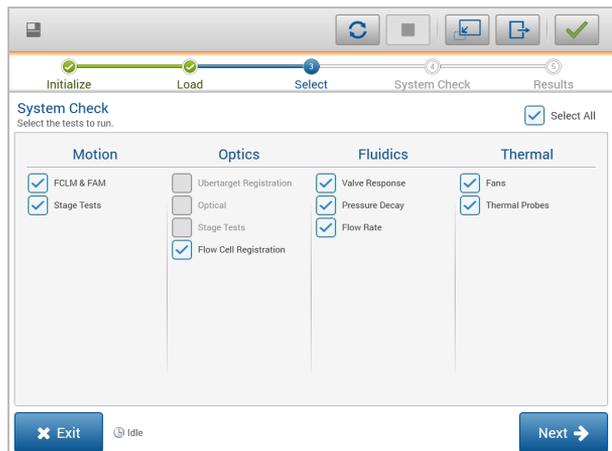


### HINWEIS

Falls ein Gerätewaschlauf fällig ist, führen Sie zuerst den Waschlauf durch, bevor Sie die Systemprüfung starten.

Beim Starten der Systemprüfung wird die Steuerungssoftware automatisch beendet und die MiniSeq Service Software wird gestartet. Die Servicesoftware wird gestartet und der Bildschirm „Load“ (Laden) wird geöffnet. Er enthält eine erweiterte Ladeoption.

Abbildung 29 Verfügbare Systemprüfungen

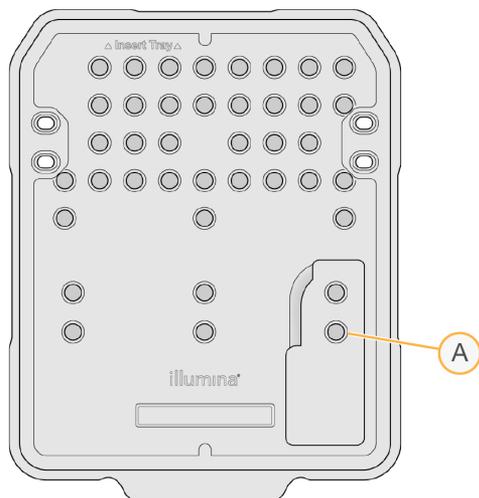


Nach dem Laden der Verbrauchsmaterialien wird der Bildschirm „Select“ (Auswählen) geöffnet. In diesem Bildschirm sind die verfügbaren Systemprüfungen aufgeführt. Inaktive Kontrollkästchen im Bildschirm „Select“ (Auswahl) geben an, dass für die Durchführung der entsprechenden Tests die Unterstützung eines Illumina-Mitarbeiters benötigt wird.

## Durchführen einer Systemprüfung

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Check** (Systemprüfung). Wenn Sie aufgefordert werden, die Steuerungssoftware zu schließen, wählen Sie **Yes** (Ja).
- 2 Geben Sie 40 ml deionisiertes Wasser in die Waschlaukkartusche. Der richtige Behälter entspricht Position **40** auf der vorgefüllten Reagenzienkartusche.

Abbildung 30 Position für Waschlösung



A Waschlösung

- 3 Laden Sie die Verbrauchsmaterialien wie folgt:

- a Wenn sich noch keine gebrauchte Fließzelle im Gerät befindet, setzen Sie eine gebrauchte Fließzelle ein.
  - b Leeren Sie die Flasche für verbrauchte Reagenzien und setzen Sie sie wieder in das Gerät ein.
  - c Setzen Sie die Waschlaukartusche ein.
- 4 Wählen Sie **Load** (Laden).  
Die Fließzelle und die Waschlaukartusche werden in Position gebracht.
  - 5 Wählen Sie **Next** (Weiter). Die Systemprüfung wird gestartet.
  - 6 **[Optional]** Wählen Sie nach Abschluss der Systemprüfung **View** (Anzeigen) neben dem entsprechenden Namen, um die jedem Test zugeordneten Werte anzuzeigen.
  - 7 Wählen Sie **Next** (Weiter).  
Der Systemprüfungsbericht wird geöffnet.
  - 8 Wählen Sie **Save** (Speichern), um den Bericht in einer verzippten Datei zu speichern. Wählen Sie einen Netzwerkspeicherort für die Datei aus.
  - 9 Wählen Sie **Exit** (Beenden), wenn Sie fertig sind.
  - 10 Wenn Sie aufgefordert werden, die Servicesoftware zu schließen und die Steuerungssoftware neu zu starten, wählen Sie **Yes** (Ja).  
Die Steuerungssoftware wird automatisch neu gestartet.

## Bewegungsprüfungen

Systemprüfung	Beschreibung
FCLM und FAM	Prüft den Ertrag und den Abstand des Fließzellenlademechanismus (Flow Cell Load Mechanism, FCLM) und des Fluidikautomatisierungsmoduls (Fluidics Automation Module, FAM), um sicherzustellen, dass die Module ordnungsgemäß funktionieren.
Stage Tests (Tisch-Prüfungen)	Prüft die Bewegungsgrenzen und die Leistung des xy- und des z-Tisches.

## Optik-Prüfung

Systemprüfung	Beschreibung
Flow Cell Registration (Fließzellenregistrierung)	Misst die Fließzellen-Neigung auf einer optischen Ebene, testet die Funktionalität von Kamera und Bildmodul und prüft, ob die Fließzelle in der korrekten Bildgebungsposition registriert ist.

## Fluidikprüfungen

Systemprüfung	Beschreibung
Valve Response (Ventilreaktionszeit)	Prüft die Genauigkeit der Ventil- und Pumpenbewegungen und testet den Bewegungsbereich der Pumpenspritze.
Pressure Decay (Druckdämpfung)	Prüft die Leckrate eines versiegelten Fluidiksystems, um nachzuweisen, dass die Fließzelle ordnungsgemäß in der Sequenzierungsposition eingesetzt ist.
Flow Rate (Fließrate)	Prüft die Funktion der Blasensensoren, die zum Ermitteln von Luft in den Reagenzienleitungen verwendet werden. Misst die Fließraten, um Verschlüsse oder Lecks auszuschließen.

## Thermische Prüfungen

Systemprüfung	Beschreibung
Fans (Lüfter)	Prüft die Geschwindigkeit der Systemlüfter in Pulse pro Minute (PPM), um sicherzustellen, dass die Lüfter funktionieren. Lüfter, die nicht funktionieren, geben einen negativen Wert zurück.
Thermal Probes (Wärmefühler)	Prüfen die durchschnittliche Temperatur jedes Wärmesensors. Wärmesensoren, die nicht funktionieren, geben einen negativen Wert zurück.

## Netzwerkconfigurationseinstellungen

Netzwerkeinstellungen werden während der Installation konfiguriert. Falls eine Neukonfiguration des Systems erforderlich ist, können Sie die Einstellungen im Bildschirm „Network Configuration“ (Netzwerkconfiguration) ändern oder zurücksetzen. Zu den Configurationseinstellungen gehören die IP-Adresse, die Adresse des DNS-Servers und der Domänenname.

### Einrichten der Netzwerkconfiguration

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Configuration** (Systemkonfiguration).
- 2 Wählen Sie **Network Configuration** (Netzwerkconfiguration).
- 3 Wählen Sie die Option **Obtain an IP address automatically** (IP-Adresse automatisch abrufen), um die IP-Adresse über den DHCP-Server abzurufen.



#### HINWEIS

Dynamic Host Configuration Protocol (DHCP) ist ein Standard-Netzwerkprotokoll, das auf IP-Netzwerken verwendet wird, um Netzwerkkonfigurationsparameter dynamisch zu verteilen.

Alternativ können Sie die Option **Use the following IP address** (Folgende IP-Adresse verwenden) wählen, um das Gerät manuell mit einem anderen Server zu verbinden. Führen Sie hierzu die folgenden Schritte aus. Fragen Sie Ihren Netzwerkadministrator nach den entsprechenden Adressen Ihres Unternehmens.

- ▶ Geben Sie die IP-Adresse ein. Eine IP-Adresse ist eine Reihe von vier Zahlen, die jeweils durch einen Punkt getrennt sind, z. B. 168.62.20.37.
  - ▶ Geben Sie die Subnetzmaske ein, die eine Untergruppe des IP-Netzes ist.
  - ▶ Geben Sie das Standard-Gateway ein, bei dem es sich um den Router im Netzwerk handelt, der die Verbindung mit dem Internet herstellt.
- 4 Wählen Sie **Obtain a DNS server address automatically** (DNS-Server-Adresse automatisch beziehen), um das Gerät mit dem DNS-Server zu verbinden, dem diese IP-Adresse zugeordnet ist. Alternativ können Sie die Option **Use the following DNS server addresses** (Folgende DNS-Server-Adressen verwenden) wählen, um das Gerät manuell mit dem DNS-Server zu verbinden. Führen Sie hierzu die folgenden Schritte aus.
    - ▶ Geben Sie die bevorzugte DNS-Adresse ein. Die DNS-Adresse ist der Name des Servers, der zum Übersetzen von Domännennamen in IP-Adressen verwendet wird.
    - ▶ Geben Sie die alternative DNS-Adresse ein. Die alternative Adresse wird verwendet, wenn der bevorzugte DNS-Server einen bestimmten Domännennamen nicht in eine IP-Adresse übersetzen kann.
  - 5 Wählen Sie **Save** (Speichern).

## Konfigurieren der Computerdomäne



### HINWEIS

Der Name des Gerätecomputers wird dem Gerätecomputer bei seiner Herstellung zugeordnet. Änderungen dieses Computernamens können die Konnektivität beeinträchtigen und erfordern einen Netzwerkadministrator.

- 1 Verbinden Sie den Gerätecomputer wie im Folgenden beschrieben mit einer Domäne oder Arbeitsgruppe.
  - ▶ **Bei Geräten, die mit dem Internet verbunden sind:** Aktivieren Sie die Option **Member of domain** (Mitglied der Domäne) und geben Sie den Namen der Domäne ein, die der Internetverbindung Ihrer Einrichtung zugewiesen ist.



### HINWEIS

Zur Änderung der Domäne werden der Benutzername und das Kennwort eines Administrators benötigt.

- ▶ **Bei Geräten ohne Internetzugang:** Wählen Sie **Member of work group** (Mitglied der Arbeitsgruppe) und geben Sie den Namen einer Arbeitsgruppe an. Der Name der Arbeitsgruppe ist unternehmensspezifisch.
- 2 Wählen Sie **Save** (Speichern).

## Anwendungsspezifische Genome

Sie können Ihre eigene Referenz im FASTA-Format auf den Gerätecomputer hochladen. Sie können mehrere FASTA-Dateien einzeln **oder** eine einzige Multi-FASTA-Datei (empfohlen) hochladen. Die Kombination beider Methoden ist jedoch nicht möglich.

Prüfen Sie, ob folgende Anforderungen erfüllt werden, um Fehler zu beheben, die bei Verwendung einer anwendungsspezifischen Genomdatei auftreten:

- 1 Stellen Sie sicher, dass die Datei die Dateierweiterung \*.fa oder \*.fasta hat und im dafür vorgesehenen Ordner für Referenzen gespeichert wurde.
- 2 Vergewissern Sie sich, dass der Name des Chromosoms nicht eines der folgenden Zeichen enthält:  
# - ? ( ) [ ] / \ = + < > : ; " ' , \* ^ | &  
Verwenden Sie für Chromosomennamen nur alphanumerische Zeichen, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

## Ausschalten des Geräts

Unter normalen Bedingungen gibt es keinen Grund, das Gerät auszuschalten.

- 1 Wählen Sie **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
- 2 Wählen Sie **Shutdown options** (Ausschaltoptionen).
- 3 Wählen Sie **Shut down** (Ausschalten).  
Mit diesem Befehl wird die Software sicher heruntergefahren und das Gerät ausgeschaltet. Warten Sie mindestens 60 Sekunden, bevor Sie das Gerät erneut einschalten. Vor dem nächsten Sequenzierungslauf ist die Durchführung eines Waschlafs erforderlich.



### **VORSICHT**

Bewegen Sie das Gerät *nicht* an einen anderen Standort. Ein unsachgemäßes Bewegen des Geräts kann zur Beeinträchtigung der Ausrichtung der optischen Elemente und der Datenintegrität führen. Falls Sie den Standort des Geräts ändern müssen, wenden Sie sich an Ihren Illumina-Vertreter.



# Anhang B Echtzeitanalyse

Überblick über die Echtzeitanalyse .....	55
Eingabe- und Ausgabedateien .....	55
Echtzeitanalyse-Workflow .....	56

## Überblick über die Echtzeitanalyse

Die Echtzeitanalyse ist eine auf dem Computer des Geräts ausgeführte Software. Sie extrahiert für das Base-Calling Intensitäten aus Bildern und weist dann dem Base-Call einen Qualitäts-Score zu.

Das MiniSeq-System nutzt eine Implementierung der Echtzeitanalyse-Software namens RTA2. Die Systemsteuerungssoftware und RTA2 kommunizieren über ein HTTP-Webinterface und gemeinsame Speicherbereiche. Wenn RTA2 beendet wird, wird die Verarbeitung nicht wieder aufgenommen und die Laufdaten werden nicht gespeichert.

## Eingabe- und Ausgabedateien

### Eingabedateien

Die Echtzeitanalyse-Software benötigt für die Verarbeitung Folgendes:

- ▶ Die im lokalen Speicher des Systems gespeicherten Plattenbilder.
- ▶ RunInfo.xml, die zu Beginn des Laufs automatisch generiert wird, und den Laufnamen, die Anzahl der Zyklen, die Angabe, ob ein Read indiziert ist, sowie die Anzahl der Platten auf der Fließzelle enthält.

Die Echtzeitanalyse-Software erhält von der Steuerungssoftware Befehle bezüglich des Speicherorts von RunInfo.xml und ob ein optionaler Ausgabeordner angegeben wird.

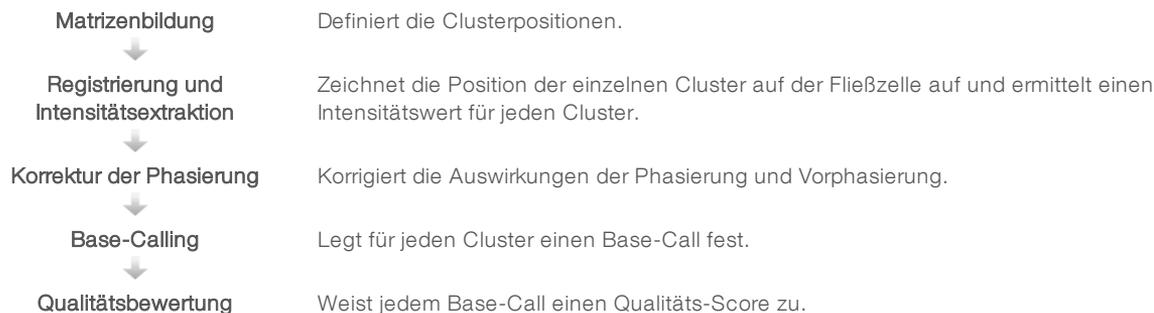
### Ausgabedateien

Bilder von jedem Kanal werden gespeichert und im Hauptspeicher als Platten übergeben. Platten sind kleine Bildgebungsbereiche auf der Fließzelle, die von der Kamera als das Bildfeld betrachtet werden. Die Software generiert von diesen Bildern die Primäranalyse-Ausgabe, die mehrere hinsichtlich ihrer Qualität ausgewertete Base-Call-Dateien und Filter-Dateien umfasst. Ausgabedateien werden für die nachgeschaltete Analyse mit Analysemodulen von Local Run Manager bzw. auf BaseSpace verwendet.

Dateityp	Beschreibung
Base-Call-Dateien	Jede analysierte Platte wird in eine zusammengefasste Base-Call-Datei (*.bcl) für jede Lane und für jeden Zyklus aufgenommen. Die zusammengefasste Base-Call-Datei enthält den Base-Call und den zugeordneten Qualitäts-Score für jeden Cluster in dieser Lane.
Filterdateien	Jede Platte liefert Filterinformationen, die pro Lane in einer Filterdatei (*.filter) zusammengefasst werden. Die Filterdatei gibt an, ob ein Cluster die Filter passiert.
Clusterpositionsdateien	Clusterpositionsdateien (*.locs) enthalten die X- und Y-Koordinaten aller Cluster einer Platte. Während der Matrizenbildung wird eine Clusterpositionsdatei für jede Lane generiert.
Base-Call-Indexdateien	Eine Base-Call-Indexdatei (*.bci) wird für jede Lane erzeugt, um die ursprünglichen Platteninformationen beizubehalten. Die Indexdatei enthält ein Wertepaar für jede Platte: die Plattennummer und die Anzahl der Cluster für die Platte.

RTA2 liefert Echtzeitkennzahlen zur Laufqualität, die in InterOp-Dateien gespeichert werden. InterOp-Dateien sind binäre Ausgabedateien mit Kennzahlen zu Platten, Zyklen und zur Read-Ebene. Sie werden benötigt, um Echtzeitkennzahlen in der Sequenzierungsanalyse-Viewer-Software ansehen zu können.

## Echtzeitanalyse-Workflow



## Matrizenbildung

Der erste Schritt im RTA-Workflow ist die Matrizenbildung. Hierbei werden die einzelnen Clusterpositionen in einer Platte anhand von X- und Y-Koordinaten definiert.

Für die Matrizenbildung werden die Bilddaten der ersten fünf Zyklen des Laufs benötigt. Nachdem der letzte Matrizenzyklus für die Platte aufgenommen wurde, wird die Matrize generiert.



### HINWEIS

Damit bei der Matrizenbildung Cluster erkannt werden, muss mindestens eine andere Base als G in den ersten **fünf** Zyklen vorhanden sein.

Die Matrize dient im nachfolgenden Schritt „Registrierung und Intensitätsextraktion“ als Referenz. Die Clusterpositionen für die gesamte Fließzelle werden in Clusterpositionsdateien (\*.locs) gespeichert. Für jede Lane wird eine Datei erstellt.

## Registrierung und Intensitätsextraktion

Die Registrierung und Intensitätsextraktion beginnen nach der Matrizenbildung.

- ▶ Bei der Registrierung werden Bilder, die bei jedem weiteren Zyklus der Bildgebung erzeugt werden, an der Matrize ausgerichtet.
- ▶ Die Intensitätsextraktion ermittelt für ein bestimmtes Bild einen Intensitätswert für jeden Cluster in der Matrize.

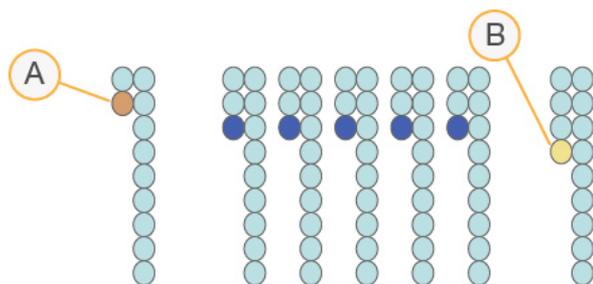
Wenn die Registrierung für ein Bild in einem Zyklus fehlschlägt, werden keine Intensitäten extrahiert und die Base-Calls aller Basen für diese Platte in diesem Zyklus lauten „N“. Prüfen Sie mithilfe der Sequenzierungsanalyse-Viewer-Software, ob die Registrierung von Platten und Zyklen fehlgeschlagen ist. Registrierungsfehler lassen sich leicht erkennen, da die entsprechenden Platten und Zyklen den Wert 0 in der Spalte P90 der Registerkarte „Imaging“ (Bildgebung) haben.

## Korrektur der Phasierung

Während der Sequenzierungsreaktion erweitert sich jeder DNA-Strang in einem Cluster um eine Base pro Zyklus. Die Phasierung und Vorphasierung finden statt, wenn eine Phasenverschiebung eines Strangs mit dem aktuellen Inkorporationszyklus eintritt.

- ▶ Eine Phasierung tritt ein, wenn eine Base zurückfällt.
- ▶ Eine Vorphasierung tritt ein, wenn eine Base vorausfällt.

Abbildung 31 Phasierung und Vorphasierung



- A Read mit einer phasierenden Base
- B Read mit einer vorphasierenden Base

RTA 2 korrigiert die Auswirkungen der Phasierung und der Vorphasierung, sodass bei jedem Zyklus des Laufs eine maximale Datenqualität erzielt wird.

## Base-Calling

Beim Base-Calling wird eine Base (A, C, G oder T) für jeden Cluster einer bestimmten Platte eines bestimmten Zyklus festgelegt. Das MiniSeq-System verwendet die Zweikanal-Sequenzierung, die nur zwei Bilder benötigt, um die Daten für vier DNA-Basen zu kodieren: ein Bild aus dem roten Kanal und ein Bild aus dem grünen Kanal.

Die von einem Bild extrahierten Intensitäten gegenüber einem anderen Bild ergeben vier verschiedene Populationen, die jeweils einem Nukleotid entsprechen. Der Base-Calling-Prozess bestimmt die Population, zu der jeder Cluster gehört.

Abbildung 32 Darstellung der Clusterintensitäten

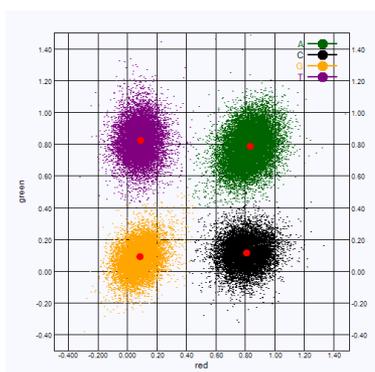


Tabelle 1 Base-Calls bei einer Zweikanal-Sequenzierung

Base	Roter Kanal	Grüner Kanal	Ergebnis
A	1 (ein)	1 (ein)	Cluster, die Intensitäten sowohl im roten als auch im grünen Kanal aufweisen.
C	1 (ein)	0 (aus)	Cluster, die Intensitäten nur im roten Kanal aufweisen.
G	0 (aus)	0 (aus)	Cluster, die keine Intensitäten bei einer bekannten Cluster-Position aufweisen.
T	0 (aus)	1 (ein)	Cluster, die Intensitäten nur im grünen Kanal aufweisen.

## Cluster nach Filterung

Während des Laufs filtert RTA2 Rohdaten, um Cluster zu entfernen, die dem Schwellenwert für Datenqualität nicht genügen.

Bei der Zweikanalanalyse verwendet RTA 2 ein populationsbasiertes System zum Feststellen der Reinheit eines Base-Calls. Cluster passieren Filter, wenn nicht mehr als ein Base-Call in den ersten 25 Zyklen einen inakzeptablen Reinheitswert aufweist. Für Cluster, die die Filter nicht passieren, erfolgt in den nachfolgenden Zyklen kein Base-Call.

## Hinweise zur Indizierung

Das Base-Calling-Verfahren für Index-Reads und für andere Reads ist unterschiedlich.

Index-Reads müssen mit mindestens einer anderen Base als G in den ersten zwei Zyklen beginnen. Wenn ein Index-Read mit zwei Base-Calls von G beginnt, wird keine Signalintensität generiert. Zur Sicherstellung der Demultiplexing-Leistung müssen jedoch Signale in den ersten zwei Zyklen vorhanden sein.

Um eine höhere Zuverlässigkeit beim Demultiplexing zu erzielen, wählen Sie Indexsequenzen, die für jeden Zyklus in mindestens einem Kanal, vorzugsweise aber in beiden Kanälen, Signale generieren. Wenn Sie Folgendes beachten, vermeiden Sie Indexkombinationen, die in jedem Zyklus nur G-Basen liefern.

- ▶ Roter Kanal – A oder C
- ▶ Grüner Kanal – A oder T

Dieses Base-Calling-Verfahren stellt sicher, dass bei der Analyse von Low-Plex-Proben genaue Ergebnisse erzielt werden.

## Qualitätsbewertung

Ein Qualitäts-Score oder Q-Score ist eine Prognose über die Wahrscheinlichkeit eines fehlerhaften Base-Calls. Je höher der Q-Score ist, desto höher ist die Qualität des Base-Calls und die Wahrscheinlichkeit, dass dieser korrekt ist.

Der Q-Score ist eine kompakte Möglichkeit, kleine Fehlerwahrscheinlichkeiten zu kommunizieren. Q(X) repräsentiert Qualitäts-Scores, wobei X für den Score steht. Die folgende Tabelle zeigt die Beziehung zwischen dem Qualitäts-Score und der Fehlerwahrscheinlichkeit.

Q-Score Q(X)	Fehlerwahrscheinlichkeit
Q40	0,0001 (1 von 10.000)
Q30	0,001 (1 von 1.000)
Q20	0,01 (1 von 100)
Q10	0,1 (1 in 10)



### HINWEIS

Die Qualitätsbewertung basiert auf einer geänderten Version des Phred-Algorithmus.

Die Qualitätsbewertung berechnet für jeden Base-Call mehrere Fehlerwahrscheinlichkeiten und ermittelt anhand der Prognosewerte den Q-Score aus einer Qualitätstabelle. Qualitätstabellen werden erstellt, um optimale Qualitätsprognosen für Läufe zu liefern, die auf spezifisch konfigurierten Sequenzierungsplattformen mit bestimmten Chemie-Versionen durchgeführt werden.

Nachdem der Q-Score ermittelt wurde, werden die Ergebnisse in Base-Call-Dateien gespeichert.

# Anhang C Ausgabedateien

Sequenzierungsausgabedateien .....	59
Ordnerstruktur der Sequenzierungsausgabedaten .....	59
Für die Analyse erforderliche Eingabedateien .....	60

## Sequenzierungsausgabedateien

Dateityp	Dateibeschreibung, Speicherort und Name
Base-Call-Dateien	Jede analysierte Platte wird in eine für jeden Zyklus zusammengefasste Base-Call-Datei aufgenommen. Die zusammengefasste Datei enthält den Base-Call und den kodierten Qualitäts-Score für jeden Cluster. Data\Intensities\BaseCalls\L001 [Zyklus].bcl.bgzf, wobei [Zyklus] die vierstellige Zyklusnummer ist. Die Base-Call-Dateien werden mit dem Block-gzip-Verfahren komprimiert.
Base-Call-Indexdatei	Eine binäre Indexdatei listet die ursprünglichen Platteninformationen anhand zweier Werte für jede Platte auf: die Plattennummer und die Anzahl der Cluster für die Platte. Base-Call-Indexdateien werden erstellt, sobald eine Base-Call-Datei erzeugt wird. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[Lane].bci
Clusterpositionsdateien	Für jede Platte werden die X- und Y-Koordinaten jedes Clusters in einer Clusterpositionsdatei zusammengefasst. Clusterpositionsdateien werden bei der Matrizenbildung generiert. Data\Intensities\L001 s_[Lane].locs
Filterdateien	Die Filterdatei gibt an, ob ein Cluster die Filter passiert hat. Die Filterinformationen werden in einer Filterdatei für jeden Read zusammengefasst. Filterdateien werden bei Zyklus 26 generiert und verwenden 25 Datenzyklen. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[Lane].filter
InterOp-Dateien	Binäre Berichtsdateien, die im Sequenzierungsanalyse-Viewer verwendet werden. InterOp-Dateien werden während des Laufs aktualisiert. InterOp-Ordner
RTA-Konfigurationsdatei	Die RTA-Konfigurationsdatei wird zu Beginn des Laufs generiert. Sie enthält die Einstellungen für den Lauf. [Stammordner], RTAConfiguration.xml
Laufinformationsdatei	Enthält den Namen des Laufs, die Anzahl der Zyklen in jedem Read, die Angabe, ob der Read ein Index-Read ist, sowie die Anzahl der Bildstreifen und Platten auf der Fließzelle. Die Laufinformationsdatei wird am Anfang des Laufs generiert. [Stammordner], RunInfo.xml

## Ordnerstruktur der Sequenzierungsausgabedaten

Die Steuerungssoftware generiert den Namen des Ausgabeordners automatisch.

- 📁 Configs
- 📁 Data
  - 📁 Intensities
    - 📁 BaseCalls
      - 📁 L001: Base-Call-Dateien, pro Zyklus zusammengefasst
      - 📁 L001: Eine zusammengefasste \*.locs-Datei
- 📁 Images

 Focus

 L001: Fokusbilder

 **InstrumentAnalyticsLogs**: Protokolldateien, in denen die Analyseschritte des Geräts beschrieben sind

 **InterOp**: Vom Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) verwendete Binärdateien

 **Logs**: Protokolldateien, in denen die Betriebsschritte beschrieben sind

 **Recipe**: Laufspezifische Rezepturdatei mit der Reagenzienkartuschen-ID als Name

 **RTALogs**: Protokolldateien, in denen die Schritte der Analyse beschrieben sind

 RTAComplete.xml

 RTAConfiguration.xml

 RunInfo.xml

 RunNotes.xml

 RunParameters.xml

## Für die Analyse erforderliche Eingabedateien

Local Run Manager benötigt die folgenden Dateien, die während des Sequenzierungslaufs generiert werden, um eine Analyse durchzuführen oder die Analyse erneut in die Warteschlange zu stellen. Einige Analysemodule benötigen zur Durchführung der Analyse zusätzliche Eingabedateien. Detaillierte Informationen hierzu finden Sie in der Workflow-Anleitung für das entsprechende Analysemodul.

Dateiname/-typ	Beschreibung
RTAComplete.txt	Eine Markerdatei, die angibt, dass die RTA-Verarbeitung abgeschlossen ist. Das Vorhandensein dieser Datei veranlasst Local Run Manager dazu, die Analyse in die Warteschlange zu stellen.
RunInfo.xml	Enthält Laufinformationen der höchsten Ebene, z. B. die Anzahl der Reads und Zyklen im Sequenzierungslauf und die Angabe, ob ein Read indiziert ist.
Base-Call-Dateien (*.bcl)	Der Base-Call und der kodierte Qualitäts-Score für jeden Cluster und jede Lane werden für jeden Zyklus in einer Datei zusammengefasst.
Filterdateien (*.filter)	Eine Filterdatei gibt an, ob ein Cluster die Filter passiert hat. Die Filterinformationen werden in einer Filterdatei für jeden Read zusammengefasst.
Clusterpositionsdateien (*.locs)	Die Clusterpositionsdateien für die einzelnen Platten enthalten die X- und Y-Koordinaten jedes Clusters.

# Index

## A

Analyse  
Ausgabedateien 59  
Software 5  
Analyse, primär  
Signalreinheit 58  
Analysekonfiguration 24  
Ausgabedateien 59  
Ausgabedateien, Sequenzierung 59  
Ausschalten des Geräts 52

## B

Base-Call-Dateien 59  
Base-Calling  
Indizierungshinweise 58  
Zweikanal 57  
BaseSpace 1  
Anmeldung 28  
Übertragungssymbole 33  
BaseSpace-Konfiguration 28  
BaseSpace Broker 34  
Benutzername und Kennwort 9  
Bildgebung, Zweikanal-Sequenzierung 57  
Bildgebungskammer 2

## C

Cluster nach Filterung 58  
Clusterspeicherort  
Dateien 59  
Matrizenbildung 56

## D

Datenübertragung  
Aktivitätssymbole 33  
BaseSpace Broker 34  
Laufkopierdienst 33  
dbSNP-Datenbank 8  
Demomodus 10  
Dokumentation 1, 64

## E

Echtzeitanalyse-Software 1, 5  
Ergebnisse 59

Eigenständige Konfiguration 26  
Ein/Aus-Taste 4, 9  
Empirische Phasierung 56  
Entsorgen von Verbrauchsmaterialien 10  
Erweiterte Ladeoption 10

## F

Fehler  
Wahrscheinlichkeit 58  
Fehler und Warnungen 5  
in Ausgabedateien 46  
Fehlerbehebung  
Festplattenspeicherplatz 45  
Kennzahlen mit geringer Intensitätenzahl 46  
Kontaktmöglichkeiten 43  
Laufspezifische Dateien 43  
Selbsttest 44  
Systemprüfung 48  
Festplattenspeicherplatz 45  
Filterdateien 59  
Fließzelle  
Rehybridisierung 46  
Typen 1  
Überblick 6  
Vorbereitung 22  
Fließzellenkammer 3  
Fließzellenklemme 3  
Formamid, Position 6 34

## G

Gerät  
Ein/Aus-Taste 4  
Konfigurationseinstellungen 51  
Starten 9  
Gerätewartung  
Verbrauchsmaterialien 16  
Gerätewaschlauf 37

## H

Hilfe, technische 64

## I

Indizierungshinweise 58  
Intensitäten 57

InterOp-Dateien 43, 59

## K

Kennzahlen

- Base-Calling 57
- Clusterdichtezyklen 33
- Intensitätszyklen 33

Kompatibilität

- Fließzelle, Reagenzienkartusche 5
- RFID-Tracking 5-6

Komponenten

- Bildgebungskammer 2
- Fließzellenkammer 3
- Reagenzienkammer 2
- Statusleiste 2

Konfigurationseinstellungen 51

Kundendienst 64

## L

Laufdauer 19

Laufkennzahlen 32

Laufkonfiguration, erweiterte Option 10

Laufkopierdienst 33

Laufparameter

- BaseSpace-Modus 28
- Eigenständiger Modus 26
- Parameter bearbeiten 28

Local Run Manager 5

locs-Dateien 59

## M

Matrizenbildung 56

miRbase-Datenbank 8

## N

Nach Filterung 58

Nachwaschlauf 34

Natriumhypochlorit, Waschlauf 38

Netzschalter 9

## O

Ordnungsspeicherort 26

## P

Phasierung, Vorphasierung 56

Phred-Algorithmus 58

Präventive Wartung 37

Primer-Rehybridisierung 46

Protokolldateien

- GlobalLog 46
- LaneNLog 46

## Q

Qualitäts-Scores 58

Qualitätstabellen 58

## R

Read-Länge 19-20

Reagenzien

- im Kit 5
- ordnungsgemäße Entsorgung 25, 29

Reagenzienkammer 2

Reagenzienkartusche

- Behälter Nr. 28 38
- Überblick 6
- Vorbereitung 22

Referenzgenome

- anwendungsspezifische Genome 52
- Dateiformat 8
- vorinstalliert 8

RefGene-Datenbank 8

Rehybridisierung, Read 1 46

Reinheitsfilter 58

RFID-Tracking 5

Richtlinien für Wasser in Laborqualität 16

RTA v2

- Beendigung 55
- Überblick 55

RTA2

- Fehlerbehandlung 46

RunInfo.xml 43, 59

## S

Schulungen 1

Selbsttest 27, 31

Selbsttestfehler 44

Sequenzierungsanalyse-Viewer 19

Sequenzierungsworkflow 56

## Software

- Analyse 5
- Automatisch aktualisieren 41
- Bildanalyse, Base-Calling 5
- Gerätesteuerung 5
- Initialisierung 9
- Konfigurationseinstellungen 51
- Laufdauer 19
- Manuelles Update 41
  - nach Updates suchen 11
- Statusalarme 5
- Statusleiste 2
- Steuerungssoftware 5
- Supportseiten 1
- Symbole
  - Fehler und Warnungen 5
  - Status 5
- Systembenutzername und -kennwort 9
- Systemprüfung 48

## T

- Technische Unterstützung 64

## U

- Überwachungsdienst Illumina Proactive 13-15
- Update der Software 40

## V

- Verbrauchsmaterialien 5
  - Fließzelle 6
  - Gerätewartung 16
  - Reagenzienkartusche 6
  - Sequenzierungsläufe 16
  - vom Benutzer bereitzustellende 16
  - Waschlauf-Verbrauchsmaterialien 37-38
  - Wasser in Laborqualität 16
- Verbrauchte Reagenzien
  - Entsorgung 25, 30, 39
- Verwalten des Geräts
  - Ausschalten 52
- Vom Benutzer bereitzustellende
  - Verbrauchsmaterialien 16
- Vorinstallierte Datenbanken 8

## W

- Wartung, präventive 37

## Waschlauf

- Automatisch 34
- Manueller Waschlauf 37
- Vom Benutzer bereitzustellende
  - Verbrauchsmaterialien 37
- Waschlaufkomponenten 37

## Workflow

- Analysekonfiguration 24
- BaseSpace-Anmeldung 28
- BaseSpace-Modus 28
- Eigenständiger Modus 26
- Erweiterte Ladeoption 10
- Indizierungshinweise 58
- Laufdauer 19
- Laufkennzahlen 32
- Natriumhypochlorit 38
- Reagenzienkartusche 22, 25, 29
- Selbsttest 27, 31
- Sequenzierung 56
- Überblick 20-21
- Verbrauchte Reagenzien 25, 30

## Z

- Zweikanal-Bildgebung 57
- Zyklen in einem Read 20

# Technische Unterstützung

Wenn Sie technische Unterstützung benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Illumina.

Website: [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
E-Mail: [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

## Telefonnummern des Illumina-Kundendienstes

Region	Gebührenfrei	Regional
Nordamerika	+1.800.809.4566	
Australien	+1.800.775.688	
Belgien	+32 80077160	+32 34002973
China	400.066.5835	
Dänemark	+45 80820183	+45 89871156
Deutschland	+49 8001014940	+49 8938035677
Finnland	+358 800918363	+358 974790110
Frankreich	+33 805102193	+33 170770446
Großbritannien	+44 8000126019	+44 2073057197
Hongkong	800960230	
Irland	+353 1800936608	+353 016950506
Italien	+39 800985513	+39 236003759
Japan	0800.111.5011	
Neuseeland	0800.451.650	
Niederlande	+31 8000222493	+31 207132960
Norwegen	+47 800 16836	+47 21939693
Österreich	+43 800006249	+43 19286540
Schweden	+46 850619671	+46 200883979
Schweiz	+41 565800000	+41 800200442
Singapur	+1.800.579.2745	
Spanien	+34 911899417	+34 800300143
Taiwan	00806651752	
Andere Länder	+44.1799.534000	

Sicherheitsdatenblätter (SDS, Safety Data Sheets) sind auf der Illumina-Website unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html) verfügbar.

Die Produktdokumentation steht auf der Illumina-Website im PDF-Format zum Herunterladen zur Verfügung. Gehen Sie zu [support.illumina.com](http://support.illumina.com), wählen Sie ein Produkt und wählen Sie anschließend **Documentation & Literature** (Dokumentation und Literatur).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Kalifornien 92122, USA

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)

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

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

**Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in Diagnoseverfahren.**

© 2018 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

**illumina**<sup>®</sup>