

NextSeq 1000 und 2000

Handbuch zum Sequenziersystem



Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. sowie deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit der Verwendung 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 AUFGEFÜHRTE ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN UND JEGLICHE FÜR DAS PRODUKT/DIE PRODUKTE GELTENDE GEWÄHRLEISTUNG ERLISCHT.

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

© 2020 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.

Versionshistorie

Dokument-Nr.	Datum	Beschreibung der Änderung
1000000109376 v03	November 2020	Katalognummern korrigiert. Informationen zum Hinzufügen neuer Benutzer ergänzt.
1000000109376 v02	Oktober 2020	NextSeq 1000/2000 P3 Reagents Kit hinzugefügt. DRAGEN Single Cell RNA-Workflow hinzugefügt. DRAGEN Enrichment-Workflow hinzugefügt. FASTQ-Komprimierungsoptionen hinzugefügt. Anweisungen zum Installieren von Updates für DRAGEN-Pipelines und -Lizenzen hinzugefügt. Anweisungen zum Importieren anwendungsspezifischer Referenzgenome hinzugefügt. Ladevolumen und -konzentrationen für Bibliothekstypen aktualisiert. Anweisungen zur Verdünnung von Bibliotheken aktualisiert. Anweisungen zur automatischen Leerung der Reagenzienkartusche hinzugefügt. Angaben zur Anzahl unterstützter Zyklen aktualisiert. Optionen zur Geräteanpassung aktualisiert. Anweisungen zur Geräteaufkonfiguration aktualisiert. Struktur der DRAGEN-Sequenzierungsausgabe aktualisiert. Informationen zu DRAGEN-Qualitätssicherungsberichten hinzugefügt. Informationen zum Entfernen anwendungsspezifischer Referenzgenome von der Festplatte hinzugefügt. Informationen zur Durchführung von Systemprüfungen hinzugefügt. Einstellungen für Probenblätter der Version 2 aktualisiert.

Dokument-Nr.	Datum	Beschreibung der Änderung
1000000109376 v01	Juni 2020	<p>Software-Beschreibungen zur NextSeq 1000/2000 Control Software aktualisiert.</p> <p>Unterscheidung zwischen den Modi Cloud, Hybrid, Local und Standalone im gesamten Handbuch verdeutlicht.</p> <p>Anweisungen zum Lagern und Auftauen von Kartuschen aktualisiert.</p> <p>Angaben zur Anzahl unterstützter Zyklen aktualisiert.</p> <p>Anweisungen zur Konfiguration der Sekundäranalyse aktualisiert.</p> <p>Katalognummern der Reagenzien-Kits aktualisiert.</p> <p>Diagramm zum Sequenzierungsprotokoll aktualisiert.</p> <p>Anweisungen zum Angeben eines Netzwerklaufwerks als Standardausgabeordner aktualisiert.</p> <p>Tabelle der unterstützten Bibliothekstypen aktualisiert.</p> <p>Anweisungen zum Importieren eines anwendungsspezifischen Referenzgenoms hinzugefügt.</p> <p>Anweisungen zur Laufkonfiguration mithilfe eines anwendungsspezifischen Index-Kits und eines anwendungsspezifischen Bibliotheksvorbereitungskits hinzugefügt.</p> <p>Anforderungen bezüglich Benutzerkonto und Kennwort aktualisiert.</p> <p>Ausführliche Informationen zur Ausgabeordnerstruktur von DRAGEN hinzugefügt.</p> <p>Anweisungen zum Entleeren verbrauchter Reagenzien aus Kartuschen präzisiert.</p> <p>Hintergrundinformationen zur Q-Tabelle hinzugefügt.</p> <p>Anweisungen zur Installation von Steuerungssoftware-Updates aktualisiert.</p> <p>Anweisungen zum erneuten Stellen eines Laufs in die Warteschlange hinzugefügt.</p> <p>Anweisungen zum Aktualisieren von DRAGEN-Pipelines und -Lizenzen hinzugefügt.</p>

Dokument-Nr.	Datum	Beschreibung der Änderung
1000000109376 v01	Juni 2020	Anweisungen zu Anpassungen am Gerät hinzugefügt. Abbildungen auf die neue Kennzeichnung aktualisiert. „Klappe“ im gesamten Handbuch durch „Blende“ ersetzt. Beschreibung der beiden Ethernet-Anschlüsse hinzugefügt.
1000000109376 v00	März 2020	Erste Version.

Inhaltsverzeichnis

Systemüberblick	1
Weitere Ressourcen	1
Gerätehardware	3
Integrierte Software	5
Prozessmanagement	6
Diagramm zum Sequenzierungsprotokoll	8
Funktionsweise der Sequenzierung	8
Systemkonfiguration	11
Anforderungen in Bezug auf Benutzerkonten	11
Konfigurieren von BaseSpace Sequence Hub und Proactive Support	14
Festlegen des Standardspeicherorts für den Ausgabeordner	15
Importieren anwendungsspezifischer Referenzgenome	18
Konfigurieren des Laufmodus	19
Geräteanpassung	20
Verbrauchsmaterialien und Ausstattung	22
Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien	22
Zusätzliche Verbrauchsmaterialien	26
Zusätzliche Ausstattung	28
Protokoll	29
Erwägungen zur Sequenzierung	29
Planen eines Sequenzierungslaufs in BaseSpace Sequence Hub	30
Auftauen der im Folienbeutel verpackten Kartusche und der Fließzelle	38
Verdünnen von Bibliotheken	41
Laden von Verbrauchsmaterialien in die Kartusche	43
Starten eines Sequenzierungslaufs	45
Sequenzierungsausgabe	54
Überblick über Real-Time Analysis	54
Real-Time Analysis-Workflow	57
Sequenzierungsausgabedateien	61
Ausgabedateien der DRAGEN-Sekundäranalyse	62
Ausgabeordnerstruktur der DRAGEN-Sekundäranalyse	69
Wartung	72
Freimachen von Speicherplatz auf der Festplatte	72
Software-Updates	73
Pipeline- und Lizenz-Updates für DRAGEN	74
Austauschen des Luftfilters	75

Fehlerbehebung	78
Beheben von Fehlermeldungen	78
Erneutes Lagern von Verbrauchsmaterialien	79
Abbrechen eines Laufs	79
Erneutes Stellen eines Laufs in die Warteschlange	80
Aus- und Wiedereinschalten des Geräts	81
Durchführen einer Systemprüfung	82
Wiederherstellen der Werkseinstellungen	82
Speichern eines Systemimages	82
Wiederherstellen eines gespeicherten Images	83
Quellen und Verweise	84
Einstellungen für Probenblätter der Version 2	84
Dunkelzyklus-Sequenzierung	96
Index	99
Technische Unterstützung	102

Systemüberblick

Das Illumina® NextSeq™ 1000-Sequenziersystem und das Illumina® NextSeq™ 2000-Sequenziersystem bieten einen gezielten Ansatz für NGS¹. Das anwendungsorientierte System bündelt die Sequenzierungstechnologie von Illumina in einem kostengünstigen Tischgerät mit folgenden Merkmalen:

- **Benutzerfreundlichkeit und Zugänglichkeit:** Das NextSeq 1000/2000 bietet die lokale DRAGEN-Analyse sowie geräteinterne Denaturierung und Verdünnung. Ein Bildgebungsmodul ist in das System integriert und Fluidikkomponenten sind in das Verbrauchsmaterial integriert, was die Wartung des Geräts vereinfacht.
- **Laden des Verbrauchsmaterials in einem einzigen Schritt:** Eine Einwegkartusche ist mit allen erforderlichen Reagenzien für einen Lauf vorbefüllt. Die Bibliothek und die Fließzelle werden direkt in die Kartusche geladen. Anschließend wird die Kartusche in das Gerät geladen. Die integrierte Identifikation ermöglicht eine genaue Nachverfolgung.
- **NextSeq 1000/2000-Software:** Im Gerät ist eine Software-Suite integriert, die die Vorgänge auf dem Gerät steuert, Bilder verarbeitet und Base-Calls generiert.
 - **Cloud-Modus:** Planen Sie Ihren Lauf mit Instrument Run Setup bei BaseSpace Sequence Hub. Der gewählte Analyseworkflow wird automatisch in der Cloud gestartet. Laufdaten und Analyseergebnisse werden ebenfalls in der Cloud bereitgestellt.
 - **Hybrid-Modus:** Planen Sie Ihren Lauf mit Instrument Run Setup bei BaseSpace Sequence Hub. Der gewählte Analyseworkflow wird dann über DRAGEN im Gerät gestartet.
 - **Local-Modus:** Planen Sie Ihren Lauf lokal mit einem Probenblatt im Dateiformat Version 2. Der gewählte Analyseworkflow wird dann automatisch über DRAGEN im Gerät gestartet.
 - **Standalone-Modus:** Planen Sie Ihren Lauf ohne Probenblatt.

Dieser Abschnitt enthält eine Übersicht über das System, einschließlich Informationen zu Hardware, Software und Datenanalyse. Außerdem werden wichtige Konzepte und Begriffe erläutert, die in der Dokumentation verwendet werden. Ausführliche technische Daten, Datenblätter und Informationen zu zugehörigen Produkten finden Sie auf der [Produktseite zu den Sequenziersystemen NextSeq 1000 und NextSeq 2000](#) auf der Website von Illumina.

Weitere Ressourcen

Auf den [Supportseiten zu den Sequenziersystemen NextSeq 1000 und NextSeq 2000](#) auf der Illumina-Website finden Sie weitere Ressourcen zum System. 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.

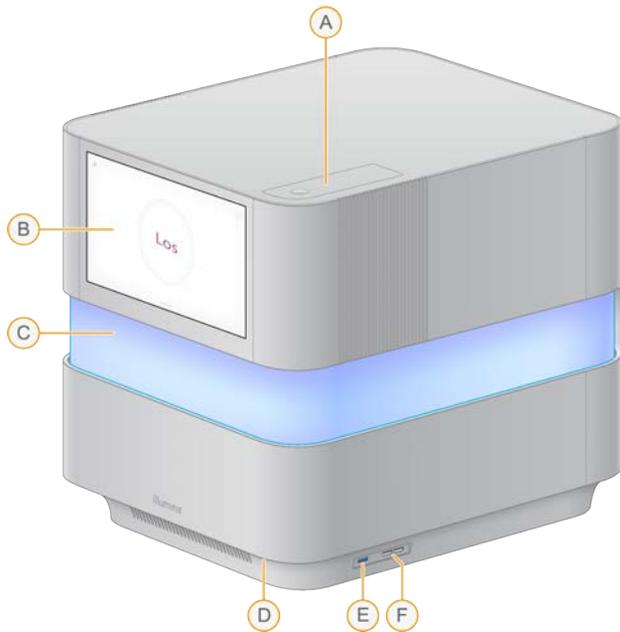
¹Next-Generation Sequencing (Sequenzierung der nächsten Generation)

Ressource	Beschreibung
<i>Custom Protocol Selector</i>	Ein Tool, mit dem sich ausführliche Anweisungen passend zur jeweiligen Bibliotheksvorbereitungsmethode, den Laufparametern und der Analysemethode erstellen lassen, einschließlich Optionen zur Verfeinerung der Detailstufe.
<i>NextSeq 1000- und NextSeq 2000-Sequenziersysteme Sicherheits- und Compliance-Handbuch (Dokument-Nr. 1000000111928)</i>	Bietet Informationen zur Betriebssicherheit, zu Compliance-Erklärungen sowie zu Gerätekennzeichnungen.
<i>RFID Reader-Modul Compliance-Handbuch (Dokument-Nr. 1000000002699)</i>	Bietet Informationen zum integrierten RFID Reader des Geräts, Compliance-Zertifizierungen sowie sicherheitsbezogene Informationen.
<i>NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide (Dokument-Nr. 1000000139235)</i>	Enthält Anweisungen zum Denaturieren und Verdünnen von vorbereiteten Bibliotheken für einen Sequenzierungslauf sowie zum Vorbereiten einer optionalen PhiX-Kontrolle.
<i>NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide (Dokument-Nr. 1000000139569)</i>	Bietet Informationen zum Ersetzen von Illumina-Sequenzierungs-Primern durch anwendungsspezifische Sequenzierungs-Primer.
<i>NextSeq 2000-Sequenziersystem Handbuch zur Standortvorbereitung (Dokument-Nr. 1000000109378)</i>	Enthält Spezifikationen für den Laborplatz, die elektrischen Anforderungen sowie die Umgebungs- und Netzwerkbedingungen.
<i>Hilfe zu BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Bietet Informationen zur Verwendung von BaseSpace™ Sequence Hub und den verfügbaren Analyseoptionen.
<i>Indexadapter Pooling-Handbuch (Dokument-Nr. 1000000041074)</i>	Enthält Anweisungen zum Pooling sowie Verfahrensbeschreibungen zur doppelten Indizierung.
<i>Illumina-Adaptersequenzen (Dokument-Nr. 1000000002694)</i>	Enthält eine Liste mit Adaptersequenzen für Illumina-Bibliotheksvorbereitungskits.

Gerätehardware

Die Sequenziersysteme NextSeq 1000 und NextSeq 2000 verfügen über eine Ein/Aus-Taste, einen Monitor, eine Statusleiste, eine Verbrauchsmaterialienkammer und USB-Anschlüsse.

Abbildung 1 Externe Systemkomponenten



- A. **Luftfilterkammer:** Bietet Zugang zum austauschbaren Luftfilter.
- B. **Touchscreen-Monitor:** Ermöglicht die Systemkonfiguration und -einrichtung am Gerät über die Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware.
- C. **Statusleiste:** Das farbige Licht zeigt den Fortschritt des Workflows an. Blau und Lila zeigen Interaktionen (z. B. Selbsttests) an. Mehrere Farben weisen auf wichtige Phasen und Daten (z. B. Abschluss der Sequenzierung) hin. Kritische Fehler werden rot angezeigt.
- D. **Ein/Aus-Taste:** Steuert die Stromversorgung des Geräts und zeigt an, ob das System eingeschaltet (Taste leuchtet) oder ausgeschaltet (Taste ist dunkel) ist bzw. ob es ausgeschaltet und noch am Stromnetz angeschlossen ist (Taste pulsiert).
- E. **USB-Anschluss (3.0):** Für den Anschluss einer externen tragbaren Festplatte für die Datenübertragung.
- F. **USB-Anschluss (2.0):** Für den Anschluss von Maus und Tastatur.

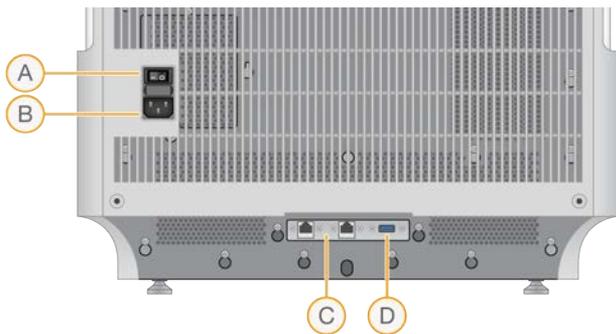
Stromanschluss und andere Anschlüsse

Sie können das Gerät vorsichtig bewegen, um den Netzschalter, den USB-Anschluss und weitere Anschlüsse an der Geräterückseite zu erreichen.

Auf der Rückseite des Geräts befinden sich der Schalter und der Anschluss für die Stromversorgung des Geräts sowie zwei Ethernet-Anschlüsse für eine optionale Ethernet-Verbindung. Über einen USB 3.0-Anschluss kann eine externe Festplatte für die Datenübertragung angeschlossen werden. (exFAT wird auf dieser Linux-basierten Plattform nicht unterstützt.)

Die Sequenziersysteme NextSeq 1000 und NextSeq 2000 sind mit zwei Ethernet-Anschlüssen ausgestattet, die den Funktionsumfang und die Flexibilität der Geräte erhöhen. Beispielsweise kann ein Ethernet-Anschluss für die Kommunikation mit einem internen Netzwerklaufwerk verwendet werden und der andere Anschluss für die externe Kommunikation, beispielsweise für BaseSpace Sequence Hub oder Proactive Support.

Abbildung 2 Komponenten auf der Rückseite

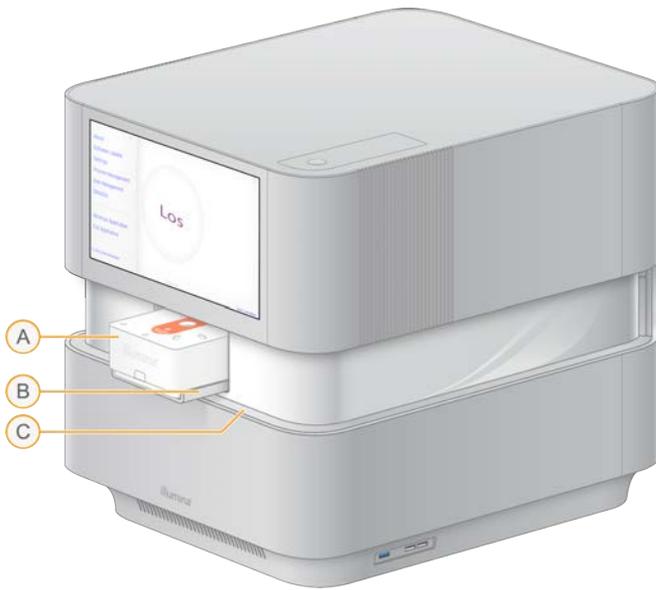


- A. **Kippschalter:** Zum Ein- und Ausschalten des Geräts.
- B. **Stromanschluss:** Für den Anschluss des Netzkabels.
- C. **Ethernet-Anschlüsse:** Zum Anschluss des optionalen Ethernet-Kabels.
- D. **USB-Anschluss (3.0):** Für den Anschluss einer externen Festplatte für die Datenübertragung.

Verbrauchsmaterialienkammer

Die Verbrauchsmaterialienkammer enthält die Kartusche einschließlich der Fließzelle und der verdünnten Bibliothek für den Sequenzierungslauf.

Abbildung 3 Geladene Verbrauchsmaterialienkammer



- A. **Kartusche:** Enthält die Fließzelle, Bibliothek und Reagenzien und fängt während des Laufs die verbrauchten Reagenzien auf.
- B. **Träger:** Hält die Kartusche während der Sequenzierung.
- C. **Blende:** Ermöglicht den Zugang zur Verbrauchsmaterialienkammer.

Integrierte Software

Die Systemsoftware-Suite umfasst integrierte Anwendungen für die Durchführung von Sequenzierungsläufen und der Analyse.

- **NextSeq 1000/2000 Control Software:** Steuert den Gerätebetrieb und stellt eine Benutzeroberfläche für die Konfiguration des Systems, die Konfiguration von Sequenzierungsläufen und die Überwachung der Laufstatistik während der Sequenzierung bereit.
- **Real-Time Analysis (RTA3):** Führt während des Laufs Bildanalysen und Base-Calling durch. Weitere Informationen finden Sie unter [Sequenzierungsausgabe auf Seite 54](#).
- **Universal Copy Service:** Kopiert Ausgabedateien der Sequenzierung aus dem Laufordner in den Ausgabeordner für BaseSpace Sequence Hub (wenn zutreffend), wo Sie darauf zugreifen können.

Die interaktive Steuerungssoftware führt automatisierte Hintergrundprozesse aus. Real-Time Analysis und Universal Copy Service sind ausschließlich Hintergrundprozesse.

Informationen zum System

Auf den Bereich „About“ (Info) können Sie über das Menü der Steuerungssoftware oben links zugreifen. Im Bereich „About“ (Info) finden Sie Kontaktdaten von Illumina und folgende Systeminformationen:

- Seriennummer des Geräts
- Computername
- Version der System-Suite
- Version des Bildgebungsbetriebssystems
- Gesamtanzahl der Läufe

Benachrichtigungen und Warnungen

Das Benachrichtigungssymbol wird rechts oben angezeigt. Wenn Warnungen vorliegen oder Fehler auftreten, klappt auf der rechten Seite ein Bereich auf, in dem auf entsprechende Benachrichtigungen hingewiesen wird. Sie können jederzeit auf das Benachrichtigungssymbol klicken, um aktuelle Benachrichtigungen oder den Benachrichtigungsverlauf für Warnungen und Fehler anzuzeigen.

- Warnungen müssen beachtet werden, aber sie stoppen nicht den Lauf und erfordern keine andere Aktion als eine Bestätigung.
- Fehler erfordern eine Aktion, bevor ein Lauf gestartet oder fortgesetzt werden kann.

Minimieren der Steuerungssoftware

Minimieren Sie die Steuerungssoftware, wenn Sie auf andere Anwendungen zugreifen möchten. (Wenn Sie beispielsweise im Datei-Explorer zum Ausgabeordner navigieren oder nach einem Probenblatt suchen möchten.)

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Minimize Application** (Anwendung minimieren) aus.
Die Steuerungssoftware wird minimiert.
2. Wenn Sie die Anzeige der Steuerungssoftware maximieren möchten, wählen Sie in der Symbolleiste **NextSeq 1000/2000 Control Software**.

Prozessmanagement

Der Bildschirm „Process Management“ (Prozessmanagement) zeigt temporäre Läufe an, die unter `/usr/local/illumina/runs` gespeichert wurden. Für alle Läufe werden das Datum, der Name und die ID angezeigt. Außerdem werden für die einzelnen Läufe Informationen zum Status von Lauf, Sekundäranalyse, Ausgabeordner und Cloud angezeigt. Wählen Sie den Lauf, um zusätzliche Informationen wie Workflow, Average % Q30 (Durchschnitt % Q30), Total PF Reads (PF-Reads insgesamt) und Total Yield (Gesamtergebnis) anzuzeigen. Informationen zum Löschen von Läufen und der Freigabe von Speicherplatz finden Sie unter *Freimachen von Speicherplatz auf der Festplatte auf Seite 72*. Informationen dazu, wie Sie einen Lauf erneut in die Warteschlange stellen, finden Sie unter *Erneutes Stellen eines Laufs in die Warteschlange auf Seite 80*.

Status of Run (Status des Laufs)

Dieser Abschnitt zeigt den Status des Sequenzierungslaufs an:

- **In Progress** (Läuft): Der Sequenzierungslauf wird ausgeführt.
- **Complete** (Abgeschlossen): Der Sequenzierungslauf wurde fertiggestellt.
- **Stopped** (Angehalten): Der Sequenzierungslauf wurde angehalten.
- **Errored** (Fehler): Während des Sequenzierungslaufs ist ein Fehler aufgetreten.

Status of Secondary Analysis (Status der Sekundäranalyse)

Dieser Abschnitt zeigt den Status der DRAGEN-Sekundäranalyse im Gerät an. Wenn die Analyse in BaseSpace Sequence Hub erfolgt, wird „NA“ (Nicht zutreffend) angezeigt.

- **Not Started** (Nicht gestartet): Die DRAGEN-Analyse wurde noch nicht gestartet.
- **In Progress** (Läuft): Die DRAGEN-Analyse wird ausgeführt.
- **Stopped** (Gestoppt): Die Analyse wurde gestoppt, ist jedoch unvollständig.
- **Errored** (Fehler): Während der DRAGEN-Analyse ist ein Fehler aufgetreten.
- **Complete** (Abgeschlossen): Gibt an, dass die DRAGEN-Analyse erfolgreich durchgeführt wurde.

Status of Output Folder (Status des Ausgabeordners)

Dieser Abschnitt zeigt den Status des Kopiervorgangs der Dateien in den Ausgabeordner an:

- **In Progress** (Läuft): Dateien werden in den Ausgabeordner kopiert.
- **Complete** (Abgeschlossen): Dateien wurden erfolgreich in den Ausgabeordner kopiert.

Status of Cloud (Status der Cloud, BaseSpace Sequence Hub)

Dieser Abschnitt zeigt den Status der über die Cloud in BaseSpace Sequence Hub hochgeladenen Dateien:

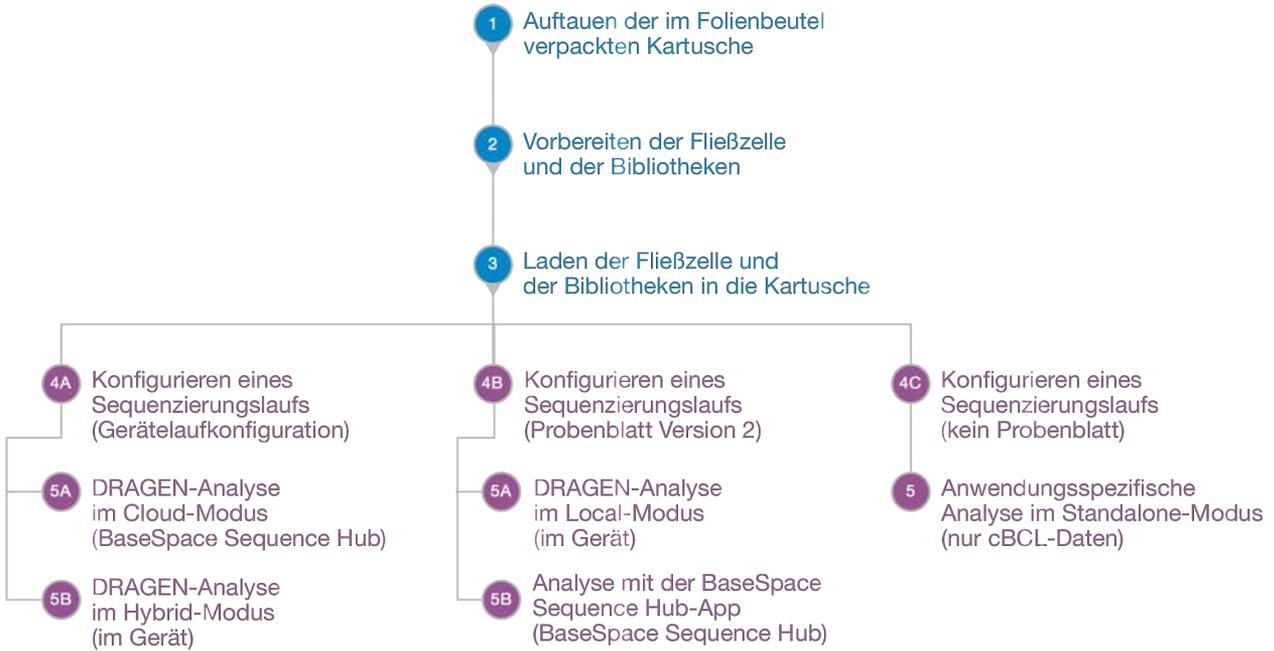
- **In Progress** (In Verarbeitung): Die Steuerungssoftware lädt Dateien in BaseSpace Sequence Hub hoch.
- **Complete** (Abgeschlossen): Dateien wurden in BaseSpace Sequence Hub hochgeladen.

Beheben von Statusfehlern

- Wenn der Lauf ausgeführt wird, schließen Sie den Bildschirm „Process Management“ (Prozessmanagement). Warten Sie etwa fünf Minuten und öffnen Sie den Bildschirm erneut.
- Wenn der Lauf nicht ausgeführt wird, schalten Sie das Gerät aus und wieder ein und öffnen Sie anschließend den Bildschirm „Process Management“ (Prozessmanagement) erneut. Siehe [Aus- und Wiedereinschalten des Geräts auf Seite 81](#).

Diagramm zum Sequenzierungsprotokoll

Das folgende Diagramm stellt das Sequenzierungsprotokoll des NextSeq 1000/2000 dar.



Funktionsweise der Sequenzierung

Die Sequenzierung mit den Sequenziersystemen NextSeq 1000 und NextSeq 2000 umfasst die Clusterbildung, die Sequenzierung und die Analyse. Die einzelnen Schritte werden während eines Sequenzierungslaufs automatisch ausgeführt. Je nach Systemkonfiguration wird die weitere Analyse nach Abschluss des Laufs separat vom Gerät durchgeführt.

Clusterbildung

Die Bibliothek¹ wird automatisch in Einzelstränge denaturiert und im Gerät weiter verdünnt. Während der Clusterbildung werden einzelne DNA-Moleküle an der Oberfläche der Fließzelle gebunden und dann amplifiziert, um Cluster² zu bilden. Die Clusterbildung nimmt ca. vier Stunden in Anspruch.

¹Eine DNA- oder RNA-Probe mit angelagerten Adaptoren für die Sequenzierung. Es gibt unterschiedliche Vorbereitungsverfahren.

²Eine klonale Gruppe DNA-Stränge auf einer Fließzelle, die einen Sequenzierungs-Read ergeben. Jeder DNA-Strang auf einer Fließzelle füllt eine Matrize, die amplifiziert wird, bis der Cluster aus Hunderten oder Tausenden Kopien besteht. Beispiel: Eine Fließzelle mit 10.000 Clustern erbringt 10.000 Single-Reads bzw. 20.000 Paired-End-Reads.

Sequenzierung

Die Clusterbildgebung erfolgt anhand von Zwei-Kanal-Chemie mit einem grünen und einem blauen Kanal zur Codierung der vier Nukleotide. Nachdem die Bildgebung für eine Platte auf der Fließzelle abgeschlossen ist, erfolgt die Bildgebung für die nächste Platte. Dieser Vorgang wird für jeden Sequenzierungszyklus wiederholt (ca. fünf Minuten pro Zyklus). Im Anschluss an die Bildanalyse führt die Real-Time Analysis-Software das Base-Calling¹, das Filtern und die Qualitätsbewertung² durch.

Primäranalyse

Während der Durchführung des Laufs überträgt die Steuerungssoftware Base-Call-Dateien³ (*.cbcl) zwecks Datenanalyse automatisch an den angegebenen Ausgabeordner. Während des Sequenzierungslaufs erfolgen im Rahmen der Real-Time Analysis-Software (RTA3) die Bildanalyse, das Base-Calling und das Demultiplexing⁴. Nach Abschluss der Sequenzierung beginnt die Sekundäranalyse. Die Methode der sekundären Datenanalyse ist abhängig von Ihrer Anwendung und der Systemkonfiguration.

Sekundäranalyse

BaseSpace Sequence Hub ist die Cloud-Computing-Umgebung von Illumina für die Laufüberwachung, Datenanalyse, Speicherung und Zusammenarbeit. Sie hostet DRAGEN- und BaseSpace Sequence Hub-Apps für gängige Analysemethoden zur Sequenzierung.

Nach Abschluss der ersten Sequenzierungsanalyse führt DRAGEN eine Sekundäranalyse mit einer der verfügbaren Analyse-Pipelines durch.

Im Cloud- oder Hybrid-Modus ruft DRAGEN das Probenblatt, das Referenzgenom und die Laufeingabedateien aus der Gerätelaufrückmeldung in BaseSpace Sequence Hub ab. Im Cloud-Modus werden cBCL-Daten automatisch auf BaseSpace Sequence Hub hochgeladen und BaseSpace Sequence Hub startet die DRAGEN-Sekundäranalyse. Im Hybrid-Modus wird die DRAGEN-Sekundäranalyse im Gerät durchgeführt. Die Ausgabe-dateien können in einem gewählten Ordner oder in der Cloud gespeichert werden.

Im Local-Modus ruft DRAGEN das Probenblatt, das Referenzgenom und die Laufeingabedateien aus den Sequenziersystemen NextSeq 1000 und NextSeq 2000 ab. Die DRAGEN-Sekundäranalyse wird im Gerät durchgeführt. Die Ausgabe-dateien können in einem gewählten Ausgabeordner gespeichert werden. Wenn „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) ausgewählt wurde, kann die Analyse auch über BaseSpace Sequence Hub-Apps gestartet werden, nachdem die Sequenzierung abgeschlossen ist.

¹Bestimmung einer Base (A, C, G oder T) für jeden Cluster einer Platte eines spezifischen Zyklus.

²Berechnet für jeden Base-Call mehrere Fehlerwahrscheinlichkeiten und ermittelt anhand des Prognosewerts den Q-Score.

³Enthält die Base-Calls und die entsprechenden Qualitäts-Scores für alle Cluster.

⁴Ein Analyseprozess, bei dem Reads für die einzelnen Bibliotheken in einem Pool unterschieden werden.

Konfigurieren Sie im Standalone-Modus einen Lauf ohne Probenblatt. Dieser Workflow wird für anwendungsspezifische Workflows empfohlen, die auf cBCL-Daten basieren.

- Weitere Informationen zu BaseSpace Sequence Hub finden Sie in der [Onlinehilfe zu BaseSpace Sequence Hub](#).
- Weitere Informationen zu DRAGEN finden Sie auf der [Supportseite zur DRAGEN Bio-IT-Plattform](#).
- Eine Übersicht aller Apps finden Sie unter [BaseSpace-Apps](#).

Systemkonfiguration

Dieser Abschnitt enthält Informationen zur Einrichtung des Systems, einschließlich der Beschreibung der Softwareeinstellungen.

In den Anweisungen wird vornehmlich die Steuerungssoftware beschrieben. Darüber hinaus sind einige Informationen zur Konfiguration von Netzwerk und Betriebssystem enthalten.

i | Bei der Verwendung von Google Chrome auf dem Gerät werden Sie zum Entsperren Ihres Login-Schlüsselbunds aufgefordert. Diese Aufforderung können Sie bedenkenlos ignorieren und abbrechen.

Anforderungen in Bezug auf Benutzerkonten

Im Linux-Betriebssystem sind drei Konten vorhanden:

- root (Superadministrator)
- ilmnadmin (Administrator)
- ilmuser (Benutzer)

Das Administratorkonto ist nur für das Einspielen von System-Updates wie der Aktualisierung der NextSeq 1000/2000 Control Software oder zur Nutzung durch IT-Mitarbeiter zum Mounten eines festen Netzwerklaufwerks vorgesehen.

Führen Sie alle anderen Funktionen, einschließlich der Sequenzierung, vom Benutzerkonto aus durch.

Kennwortanforderungen

Nach Abschluss der Geräteinstallation leitet der Servicetechniker eine Kennwortänderung für alle drei Konten ein. Aktualisieren Sie jedes Kennwort alle 180 Tage, wenn Sie dazu aufgefordert werden.

Tabelle 1 Standardkennwortrichtlinien

Richtlinie	Einstellung
Enforce password history (Kennwortchronik erzwingen)	Five passwords remembered (Fünf Kennwörter gespeichert)
Lockout threshold (Sperrschwellenwert)	Ten invalid logon attempts (Zehn ungültige Anmeldeversuche)
Minimum password length (Mindestkennwortlänge)	Ten characters (Zehn Zeichen)

Richtlinie	Einstellung
Minimum character variety (Minimale Zeichenvielfalt)	Three each of: number, upper case letter, lower case letter, and symbol (Jeweils drei: Ziffern, Großbuchstaben, Kleinbuchstaben und Sonderzeichen)
Maximum repeating characters (Maximale Anzahl gleicher Zeichen hintereinander Drei ZeichenPassword)	Three characters (Drei Zeichen)
Password must meet complexity requirements (Kennwort muss Komplexitätsvoraussetzungen entsprechen)	Disabled (Deaktiviert)
Store passwords using reversible encryption (Kennwörter mit umkehrbarer Verschlüsselung speichern)	Disabled (Deaktiviert)

Hinzufügen eines neuen Benutzers

1. Melden Sie sich beim Konto „ilmnadmin“ an.
2. Wählen Sie die Ein/Aus-Schaltfläche aus und öffnen Sie das Dropdown-Menü „ilmnadmin“.
3. Wählen Sie **Account Settings** (Kontoeinstellungen).
4. Wählen Sie **Unlock** (Entsperren) und geben Sie dann das Kennwort für das Konto „ilmnadmin“ ein.
5. Wählen Sie **Add User** (Benutzer hinzufügen).
6. Wählen Sie den Kontotyp „Standard“ aus und geben Sie dann einen neuen Benutzernamen ein.
7. Wählen Sie **Set password now** (Kennwort jetzt festlegen) und geben Sie ein Kennwort ein.
8. Wählen Sie **Add** (Hinzufügen).
Der neue Benutzer wird zur Liste „Users“ (Benutzer) hinzugefügt.
9. Gewähren Sie dem Benutzer Zugriff auf die NextSeq 1000/2000 Control Software wie folgt.
 - a. Öffnen Sie das Terminal.
 - b. Geben Sie folgenden Befehl ein:

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <Name des neuen Benutzers>
```
 - c. Geben Sie nach der entsprechenden Aufforderung das Kennwort für das Konto „ilmnadmin“ ein.
10. Prüfen Sie folgendermaßen, ob die Benutzerberechtigungen erfolgreich festgelegt wurden.
 - a. Melden Sie sich bei dem neuen Benutzerkonto an.
 - b. Navigieren Sie zur NextSeq 1000/2000 Control Software.
 - c. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Settings** (Einstellungen).

- d. Stellen Sie unter „Default Output Folder“ (Standardausgabeordner) sicher, dass Sie den Pfad für den Ausgabeordner auswählen und speichern können.

Wenn Sie den Pfad für den Ausgabeordner auswählen und speichern können, ohne dass eine Fehlermeldung angezeigt wird, wurden die Berechtigungen erfolgreich festgelegt.

Zurücksetzen des Kennworts

In diesem Abschnitt wird beschrieben, wie sich das Kennwort für die Konten „ilmnuser“, „ilmnadmin“ oder „root“ zurücksetzen lässt. Es gibt keine Möglichkeit, Kennwörter wiederherzustellen.

Zurücksetzen des Kennworts für das Konto „ilmnuser“

Zum Zurücksetzen des Kennworts für das Konto „ilmnuser“ muss das Kennwort für das Konto „ilmnadmin“ oder das Konto „root“ bekannt sein.

1. Melden Sie sich beim Konto „ilmnadmin“ an.
2. Öffnen Sie das Terminal.
3. Geben Sie den Befehl `sudo passwd ilmnuser` ein.
4. Geben Sie das Kennwort für das Konto „ilmnadmin“ in die Eingabeaufforderung ein.
5. Geben Sie ein neues Kennwort für das Konto „ilmnuser“ in die Eingabeaufforderung ein.
6. Geben Sie das neue Kennwort für das Konto „ilmnuser“ zur Bestätigung erneut in die Eingabeaufforderung ein.

Zurücksetzen des Kennworts für das Konto „ilmnadmin“

Zum Zurücksetzen des Kennworts für das Konto „ilmnadmin“ muss das Kennwort für das Konto „root“ bekannt sein.

1. Melden Sie sich beim Konto „root“ an.
2. Öffnen Sie das Terminal.
3. Geben Sie den Befehl `passwd ilmnadmin` für „ilmadmin“ oder den Befehl `passwd ilmnuser` für „ilmnuser“ ein, um das Kennwort für das jeweilige Konto zu ändern.
4. Geben Sie das neue Kennwort in die Eingabeaufforderung ein.
5. Geben Sie das neue Kennwort zur Bestätigung erneut in die Eingabeaufforderung ein.

Zurücksetzen des Kennworts für das Konto „root“

Das Kennwort für das Konto „root“ lässt sich mithilfe einer der folgenden Methoden zurücksetzen:

- Stellen Sie das letzte gespeicherte Betriebssystemimage wieder her, wenn Ihnen das zum Zeitpunkt der Speicherung des Images gültige Kennwort bekannt ist.
- Wenden Sie sich andernfalls an den technischen Support von Illumina.

Konfigurieren von BaseSpace Sequence Hub und Proactive Support

Konfigurieren Sie BaseSpace Sequence Hub und Proactive Support anhand folgender Anweisungen auf Ihrem System. Informationen zum Einrichten eines BaseSpace Sequence Hub-Kontos finden Sie in der [Onlinehilfe zu BaseSpace Sequence Hub](#).

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Settings** (Einstellungen).
2. Wählen Sie für die Einstellungen von BaseSpace Sequence Hub und Proactive Support eine der folgenden Optionen:

Option	Beschreibung und Anforderungen
Proactive Support Only (Nur Proactive Support)*	Übermittlung von Geräteleistungsdaten zur schnelleren Fehlerbehebung an Illumina. Erfordert eine Internetverbindung.
Proactive and Run Monitoring (Proactive und Laufüberwachung)	InterOp- und Protokolldateien werden an BaseSpace Sequence Hub zwecks Remote-Laufüberwachung gesendet. Bei dieser Option handelt es sich um die Standardeinstellung. Erforderlich sind ein BaseSpace Sequence Hub-Konto und eine Internetverbindung.
Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung)	InterOp-Dateien, Protokolldateien und Laufdaten werden zwecks Remote-Überwachung und Analyse an BaseSpace Sequence Hub gesendet. Erfordert ein BaseSpace Sequence Hub-Konto, eine Internetverbindung und ein Probenblatt.
None (Keine)	Die Verknüpfung zwischen Läufen und BaseSpace Sequence Hub-Konten wird aufgehoben und es werden keine Geräteleistungsdaten an Illumina Proactive Support gesendet.

* Je nach Version der Steuerungssoftware kann der Name dieser Einstellung auf der Benutzeroberfläche der Software von dem in diesem Handbuch abweichen.

Bei Aktivierung einer Option außer „None“ (Keine) ist Proactive Support aktiviert. Hierbei handelt es sich um einen kostenlosen Service, mit dem Sie Ihre Leistungsdaten auf dem MyIllumina-Kunden-Dashboard anzeigen können und der es den Serviceteams von Illumina ermöglicht, Fehler schneller zu beheben.

i | „Proactive and Run Monitoring“ (Proactive und Laufüberwachung) ist standardmäßig aktiviert. Wählen Sie **None** (Keine), um den Dienst zu deaktivieren.

3. Wenn Sie in Schritt 2 „None“ (Keine) ausgewählt haben, wählen Sie **Save** (Speichern), um den Vorgang abzuschließen. Fahren Sie andernfalls mit Schritt 6 fort.
4. Wählen Sie in der Liste „Hosting Location“ (Hosting-Speicherort) den Standort des BaseSpace Sequence Hub-Servers, auf den die Daten hochgeladen werden.
Stellen Sie sicher, dass Sie den nächstgelegenen Hosting-Standort verwenden.
5. Geben Sie, wenn Sie über ein Enterprise-Abonnement verfügen, den Domännennamen (URL) für Ihr BaseSpace Sequence Hub-Konto ein.
Beispiel: <https://IhrLabor.basespace.illumina.com>.
6. Wählen Sie **Save** (Speichern).

Festlegen des Standardspeicherorts für den Ausgabeordner

Legen Sie mithilfe der Anweisungen in diesem Abschnitt den Standardspeicherort für den Ausgabeordner fest. Sie können den Ausgabeordner für einzelne Läufe während der Laufkonfiguration ändern. Die Software speichert cBCL-Dateien¹ und andere Laufdaten im Ausgabeordner.

Es ist ein Ausgabeordner erforderlich, sofern BaseSpace Sequence Hub nicht für „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) konfiguriert ist. Verwenden Sie ausschließlich externe oder Netzwerklaufwerke als Standardspeicherort. Die Verwendung eines Ausgabeordners im Gerät beeinträchtigt den Sequenzierunslauf.

Angeben eines externen Laufwerks als Ausgabeordner

Gehen Sie folgendermaßen vor, wenn ein externes tragbares Laufwerk als Standardausgabeordner festgelegt werden soll. Die Verwendung eines Laufwerks mit eigener Stromversorgung wird empfohlen.

1. Schließen Sie das externe tragbare Laufwerk an einen USB 3.0-Anschluss an der Seite oder der Rückseite des Geräts an.
Stellen Sie sicher, dass Sie über eine Schreibberechtigung für das externe tragbare Laufwerk verfügen. Wenn dieses auf „Read Only“ (Nur lesen) festgelegt ist, kann die Steuerungssoftware keine Daten auf dem Laufwerk speichern.
2. Erstellen Sie einen neuen Ordner auf dem externen tragbaren Laufwerk. Dieser Ordner wird als Standardspeicherort für den Ausgabeordner verwendet.
Die NextSeq 1000/2000 Control Software erfordert eine mindestens zweistufige Ordnerstruktur, damit ein Speicherort als externes tragbares Laufwerk erkannt wird.
3. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Settings** (Einstellungen).
4. Wählen Sie unter „Default Output Folder“ (Standardausgabeordner) den vorhandenen Ordnerpfad und navigieren Sie zum neuen Ordner auf dem externen tragbaren Laufwerk.

¹Enthält die Base-Calls und die entsprechenden Qualitäts-Scores für alle Cluster.

5. **[Optional]** Wählen Sie eine Option aus dem Dropdown-Menü „Hosting Location“ (Hosting-Speicherort), wenn unter „Run Mode“ (Laufmodus) die Option **Online Run Setup** (Online-Laufkonfiguration) gewählt wurde.
6. Wählen Sie **Save** (Speichern).

Festlegen eines Netzwerklaufwerks als Standardausgabeordner

Verwenden Sie die folgenden Anweisungen für das Mounting eines festen Netzwerklaufwerks sowie zur Angabe des Speicherorts für den Standardausgabeordner. Server Message Block (SMB)/Common Internet File Systems (CIFS) und Network File System (NFS) sind die einzigen Methoden, die für das dauerhafte Mounting eines Netzwerklaufwerks auf dem NextSeq 1000/2000 unterstützt werden.

Anweisungen zum Mounten von SMB/CIFS

1. Wählen Sie bei geöffneter NextSeq 1000/2000 Control Software **Minimize Application** (Anwendung minimieren).
2. Melden Sie sich beim Konto „ilmnadmin“ an.
3. Wählen Sie **Applications** (Anwendungen).
4. Wählen Sie unter „Favorites“ (Favoriten) die Option **Terminal**.
5. Geben Sie `sudo touch /root/.smbcreds` ein und drücken Sie anschließend die **Eingabetaste**.
6. Geben Sie `sudo gedit /root/.smbcreds` ein und drücken Sie dann die **Eingabetaste**, um die Textdatei „smbcreds“ zu öffnen.
7. Geben Sie nach dem Öffnen der Textdatei `.smbcreds` Ihre Anmeldeinformationen im folgenden Format ein.

```
username=<Benutzername>
password=<Kennwort>
domain=<Domänenname>
```

Für die Anmeldeinformationen „username“ (Benutzername), „password“ (Kennwort) und „domain“ (Domäne) sind keine Klammern erforderlich. Die Domäne muss nur angegeben werden, wenn das Remote-Konto zu einer Domäne gehört.

8. Wählen Sie **Save** (Speichern) und schließen Sie die Datei.
9. Ermitteln Sie den Servernamen und den Freigabennamen für den SMB-/CIFS-Server. Der Server- und der Freigabename dürfen keine Leerzeichen enthalten. Beispiel:
Servername: 192.168.500.100 oder Meinserver-meininstitut-03
Freigabename: /share1
10. Geben Sie im Terminal `sudo chmod 400 /root/.smbcreds` ein und drücken Sie die **Eingabetaste**, um Lesezugriff auf die Textdatei `.smbcreds` zu gewähren.
11. Geben Sie `sudo mkdir /mnt/<Lokaler Name>` ein.
<Lokaler Name> ist der Name des neuen Verzeichnisses auf Ihrem Netzwerklaufwerk. Dieser darf Leerzeichen enthalten. Das ist das Verzeichnis, das auf dem Gerät angezeigt wird.

12. Drücken Sie die **Eingabetaste**.
13. Geben Sie `sudo gedit /etc/fstab` ein und drücken Sie dann die **Eingabetaste**.
14. Geben Sie, wenn die FSTAB-Datei geöffnet wird, Folgendes an einer beliebigen Stelle in der Datei ein und drücken Sie die **Eingabetaste**.

```
//<Servername>/<Freigabename> /mnt/<Lokaler Name> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```
15. Wählen Sie **Save** (Speichern) und schließen Sie die Datei.
16. Geben Sie im Terminal `sudo mount -a -vvv` ein und drücken Sie dann die **Eingabetaste**.
Das Netzwerklaufwerk ist jetzt als `/mnt/<Lokaler Name>` gemountet.
17. Geben Sie `<df | grep <Lokaler Name>>` ein und drücken Sie die **Eingabetaste**, um zu überprüfen, ob das Laufwerk erfolgreich gemountet wurde.
Der Name der Dateifreigabe sollte angezeigt werden.
18. Erstellen Sie einen neuen `<Unterordner>` im Ordner `<Lokaler Name>`. Der Unterordner ist der Speicherort für den Standardausgabeordner.
Die NextSeq 1000/2000 Control Software erfordert eine mindestens zweistufige Ordnerstruktur, damit ein Speicherort als gemountetes Netzwerklaufwerk erkannt wird.
19. Schalten Sie das Gerät aus und anschließend wieder ein. Siehe [Aus- und Wiedereinschalten des Geräts auf Seite 81](#).
20. Legen Sie das feste Netzwerklaufwerk als Standardausgabeordner fest. Siehe [Festlegen des festen Netzwerklaufwerks als Standardausgabeordner auf Seite 18](#).

Anweisungen zum Mounten von NFS

1. Wählen Sie bei geöffneter NextSeq 1000/2000 Control Software **Minimize Application** (Anwendung minimieren).
2. Melden Sie sich beim Konto „ilmnadmin“ an.
3. Ermitteln Sie den Servernamen für den NFS-Server.
Der Servername darf keine Leerzeichen enthalten. Beispiel:
Servername: 192.168.500.100 oder Meinserver-meininstitut-03
4. Wählen Sie **Applications** (Anwendungen).
5. Wählen Sie unter „Favorites“ (Favoriten) die Option **Terminal**.
6. Geben Sie `sudo mkdir /mnt/<Lokaler Name>` ein und drücken Sie die **Eingabetaste**.
`<Lokaler Name>` ist der Name des neuen Verzeichnisses auf Ihrem Netzwerklaufwerk.
7. Geben Sie `sudo gedit /etc/fstab` ein und drücken Sie dann die **Eingabetaste**.
8. Geben Sie, wenn die FSTAB-Datei geöffnet wird, Folgendes ein und drücken Sie die **Eingabetaste**.

```
<Servername>:/share //mnt/<Lokaler Name> nfs x-systemd.automount,defaults
0 0
```

9. Wählen Sie **Save** (Speichern) und schließen Sie die Datei.
10. Geben Sie im Terminal `sudo mount -a -vvv` ein und drücken Sie dann die **Eingabetaste**. Das Netzwerklaufwerk ist jetzt unter `/mnt/directory` im Ordner `<Lokaler Name>` gemountet.
11. Erstellen Sie einen neuen `<Unterordner>` im Ordner `<Lokaler Name>`. Der Unterordner ist der Speicherort für den Standardausgabeordner. Die NextSeq 1000/2000 Control Software erfordert eine mindestens zweistufige Ordnerstruktur, damit ein Speicherort als gemountetes Netzwerklaufwerk erkannt wird.
12. Schalten Sie das Gerät aus und anschließend wieder ein. Siehe *Aus- und Wiedereinschalten des Geräts auf Seite 81*.
13. Legen Sie das feste Netzwerklaufwerk als Standardausgabeordner fest. Siehe *Festlegen des festen Netzwerklaufwerks als Standardausgabeordner auf Seite 18*.

Festlegen des festen Netzwerklaufwerks als Standardausgabeordner

1. Melden Sie sich als „ilmnuser“ an.
2. Wählen Sie im Menü der NextSeq 1000/2000 Control Software die Option **Settings** (Einstellungen).
3. Wählen Sie unter „Default Output Folder“ (Standardausgabeordner) das feste gemountete Netzwerklaufwerk aus, das sich unter `/mnt/<Lokaler Name>/<Ausgabeverzeichnis>` befindet.
4. **[Optional]** Wählen Sie eine Option aus dem Dropdown-Menü „Hosting Location“ (Hosting-Speicherort), wenn unter „Run Mode“ (Laufmodus) die Option **Online Run Setup** (Online-Laufkonfiguration) gewählt wurde.
5. Wählen Sie **Save** (Speichern).

Importieren anwendungsspezifischer Referenzgenome

Neue anwendungsspezifische Referenzgenome können nur über das Administratorkonto importiert werden. Eine Liste aller kompatiblen Referenzgenome finden Sie auf der NextSeq 1000/2000-Produktkompatibilitätsseite.

1. Erstellen Sie mithilfe der BaseSpace Sequence Hub-App Reference Builder for Illumina Instruments ein Referenzgenom. Weitere Informationen finden Sie in der *Onlinehilfe zur App Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0*.
2. Melden Sie sich beim Konto „ilmnadmin“ an.
3. Wählen Sie das Menü der Steuerungssoftware und dann **Process Management** (Prozessmanagement).
4. Stellen Sie sicher, dass derzeit weder ein Sequenzierungslauf noch eine Sekundäranalyse im Gerät durchgeführt wird.
5. Wählen Sie das Menü der Steuerungssoftware und dann **DRAGEN**.
6. Wählen Sie im Abschnitt „Genome“ (Genom) **View Installed Genomes** (Installierte Genome anzeigen), um eine Liste aller derzeit installierten Genome (Illumina und anwendungsspezifisch) anzuzeigen.

7. Schließen Sie das Dialogfeld.
8. Wählen Sie unter „Import New Reference Genomes“ (Neue Referenzgenome importieren) die Option **Choose** (Auswählen), navigieren Sie zur Referenzgenomdatei (*.tar.gz) auf dem tragbaren Laufwerk bzw. auf dem gemounteten Netzwerklaufwerk und wählen Sie dann **Open** (Öffnen).
9. Wählen Sie **Import** (Importieren).

Konfigurieren des Laufmodus

Der Laufmodus legt für alle Läufe fest, an welcher Stelle die Laufparameter eingegeben werden müssen, und bestimmt die Datenanalysemethode.

Cloud- oder Hybrid-Modus

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Settings** (Einstellungen).
2. Wählen Sie unter „BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support“ (BaseSpace Sequence Hub Services und Proactive Support) die Option **Online Run Setup** (Onlinelaufkonfiguration).
3. Konfigurieren Sie zusätzliche Einstellungen wie erforderlich, indem Sie Folgendes wählen:
 - a. **Proactive and Run Monitoring** (Proactive und Laufüberwachung) oder **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung).
 - b. Dropdown-Menü **Hosting Location** (Hosting-Speicherort).
 - c. **[Optional]** Geben Sie einen **Private Domain Name** (Namen für die private Domäne) ein.
4. Wählen Sie **Save** (Speichern).

Local- und Standalone-Modus

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Settings** (Einstellungen).
2. Wählen Sie unter „BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support“ (BaseSpace Sequence Hub Services und Proactive Support) die Option **Local Run Setup** (Lokale Laufkonfiguration).
3. Konfigurieren Sie zusätzliche Einstellungen wie erforderlich, indem Sie Folgendes wählen:
 - a. **Proactive Support Only** (Nur Proactive Support), **Proactive and Run Monitoring** (Proactive und Laufüberwachung), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) oder **None** (Keine).



Die BaseSpace Sequence Hub-Funktion zum erneuten Stellen in die Warteschlange ist nur verfügbar, wenn **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) ausgewählt ist. Mit dieser Funktion lassen sich fehlerhafte Datenblätter korrigieren und die Demultiplexing-Analyse erneut in die Warteschlange stellen. Informationen dazu, wie Sie im Gerät einen Lauf erneut in die Warteschlange stellen, finden Sie unter *Erneutes Stellen eines Laufs in die Warteschlange auf Seite 80*.

- b. Dropdown-Menü **Hosting Location** (Hosting-Speicherort).

- c. **[Optional]** Geben Sie einen **Private Domain Name** (Namen für die private Domäne) ein.
4. Wählen Sie **Save** (Speichern).

Erwägungen hinsichtlich Probenblättern für den Local- und den Standalone-Modus

Für die Analyse mit DRAGEN muss das Probenblatt-Dateiformat Version 2 verwendet werden. Das Probenblatt-Dateiformat Version 2 ist auch mit BaseSpace Sequence Hub-Apps ohne DRAGEN kompatibel. Informationen zum Erstellen von Probenblättern im Dateiformat Version 2 finden Sie unter [Einstellungen für Probenblätter der Version 2 auf Seite 84](#).

Geräteanpassung

Dieser Abschnitt enthält Informationen zur Konfiguration der verfügbaren Anpassungseinstellungen. Informationen zum Festlegen eines Standardausgabeordners finden Sie unter [Festlegen des Standardspeicherorts für den Ausgabeordner auf Seite 15](#).

Benennen des Geräts

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Settings** (Einstellungen).
2. Wählen Sie „Instrument Nickname“ (Kurzname des Geräts) und geben Sie den gewünschten Namen für das Gerät ein.
Der Name wird am oberen Rand jedes Bildschirms angezeigt.
3. Wählen Sie **Save** (Speichern).

Festlegen von Denaturierungs- und Verdünnungseinstellungen

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Settings** (Einstellungen).
2. Wählen Sie aus, ob die Bibliotheken automatisch im Gerät denaturiert und verdünnt werden sollen. Standardmäßig ist für diese Einstellung die für den vorherigen Lauf gewählte Option festgelegt.
 - Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Denature and Dilute On Board** (Im Gerät denaturieren und verdünnen), um Bibliotheken automatisch im Gerät zu denaturieren und zu verdünnen.
 - Deaktivieren Sie das Kontrollkästchen **Denature and Dilute On Board** (Im Gerät denaturieren und verdünnen), um Bibliotheken manuell zu denaturieren und zu verdünnen. Anweisungen zur manuellen Denaturierung und Verdünnung von Bibliotheken finden Sie im *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide (Dokument-Nr. 1000000139235)*.

Festlegen der Voreinstellung für die automatische Entleerung von Reagenzien

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Settings** (Einstellungen).

2. Mit dieser Einstellung lässt sich festlegen, ob das System nicht verwendete Reagenzien nach jedem Lauf automatisch in die Kammer für Reagenzienabfall entleert und so die Entsorgung von Reagenzien nach dem Laufabschluss optimiert:
 - Aktivieren Sie zur automatischen Entsorgung das Kontrollkästchen **Purge Reagent Cartridge** (Reagenzienkartusche leeren).
 - Deaktivieren Sie das Kontrollkästchen **Purge Reagent Cartridge** (Reagenzienkartusche leeren), um die automatische Entleerung zu überspringen (Standardeinstellung).Die Entleerung nicht verwendeter Reagenzien verlängert den Workflow um ca. zwei Stunden.
3. Wählen Sie **Save** (Speichern).

Konfigurieren von Software-Updates

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Settings** (Einstellungen).
2. Wählen Sie, ob die Prüfung auf Software-Updates vom System automatisch durchgeführt werden soll:
 - Wenn die Prüfung automatisch erfolgen soll, aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Autocheck for software updates** (Automatisch auf Software-Updates prüfen).
 - Wenn Sie manuell auf Updates prüfen möchten, deaktivieren Sie das Kontrollkästchen **Autocheck for software updates** (Automatisch auf Software-Updates prüfen).Für die automatische Suche nach Software-Updates ist eine Internetverbindung erforderlich. Weitere Informationen zum Installieren von Software-Updates finden Sie unter [Software-Updates auf Seite 73](#).
3. Wählen Sie **Save** (Speichern).

Ändern der LCD-Helligkeit

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Settings** (Einstellungen).
2. Stellen Sie den Schieberegler „LCD Brightness“ (LCD-Helligkeit) auf den gewünschten Prozentwert ein.
3. Wählen Sie **Save** (Speichern).

Verbrauchsmaterialien und Ausstattung

Dieser Abschnitt führt den gesamten Inhalt des Reagenzien-Kits im Lagerungszustand auf. Außerdem erhalten Sie Informationen dazu, welche zusätzlichen Verbrauchsmaterialien und welche zusätzliche Ausstattung Sie für die Wartung und die Problembehebung benötigen.

Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien

Für die Sequenzierung mit dem NextSeq 1000/2000 ist ein Illumina NextSeq 1000/2000 P2 Reagents Kit oder ein Illumina NextSeq 1000/2000 P3 Reagents Kit für den Einmalgebrauch erforderlich. Das NextSeq 1000/2000 P2 Reagents Kit ist in drei Größen verfügbar (100, 200 und 300 Zyklen). Das NextSeq 1000/2000 P3 Reagents Kit ist in vier Größen verfügbar (50, 100, 200 und 300 Zyklen).

Das NextSeq 1000-Sequenziersystem ist nur mit dem Illumina NextSeq 1000/2000 P2 Reagents Kit kompatibel.

Das Reagenzien-Kit umfasst eine Kartusche und eine Fließzelle für die Sequenzierung. Achten Sie beim Erhalt des NextSeq 1000/2000 P2 Reagents Kit oder des Illumina NextSeq 1000/2000 P3 Reagents Kit auf Folgendes:

- Lagern Sie die Komponenten unverzüglich bei den angegebenen Temperaturen, um eine einwandfreie Funktion zu gewährleisten.
- Öffnen Sie die Verpackung aus Silberfolie erst, wenn Sie dazu aufgefordert werden.
- Lagern Sie Kartuschen im zugehörigen Karton, um Beschädigungen der Folienverpackung zu verhindern.
- Lagern Sie Kartuschen so, dass die Pfeile nach oben weisen.

 | Andernfalls werden die Sequenzierungsdaten beeinträchtigt.

Tabelle 2 Kit-Komponenten

Verbrauchsmaterial	Menge	Lagerungstemperatur	Abmessungen
Kartusche	1	-25 °C bis -15 °C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm
Fließzelle	1	2 °C bis 8 °C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm
RSB with Tween 20	1	-25 °C bis -15 °C	4 cm x 6,6 cm x 5 cm

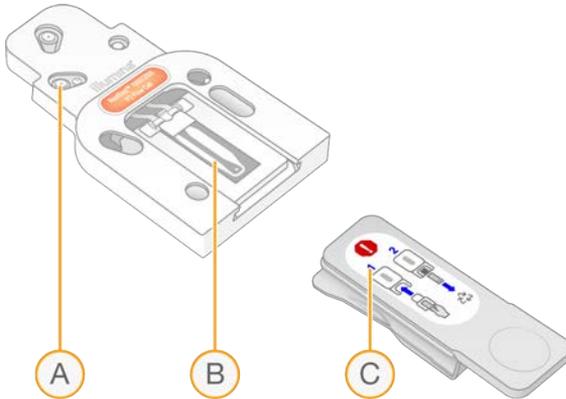
* Lieferung bei Raumtemperatur.

Beide Verbrauchsmaterialien sind mit Identifikatoren zur Nachverfolgung und Sicherstellung der Kompatibilität versehen. Die Kartusche und die Fließzelle verwenden RFID¹.

¹Radio-Frequency Identification (Identifizierung mithilfe elektromagnetischer Wellen)

Fließzelle

Bei der Fließzelle handelt es sich um eine strukturierte Fließzelle mit einer Lane. Der Fließzellenglasträger ist von einer Kunststoffkartusche umschlossen. Die sichere Handhabung erfolgt mithilfe einer vorstehenden grauen Lasche.

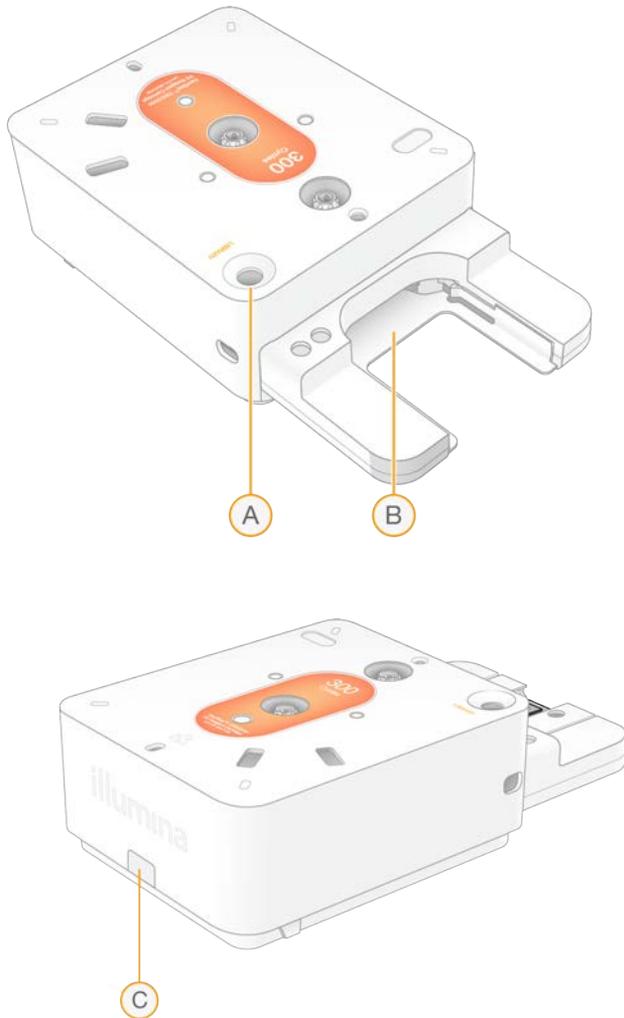


- A. Kunststoffkartusche
- B. Fließzelle
- C. Graue Lasche

Die innere Oberfläche der Fließzelle ist mit Millionen von Nanowells versehen. Es werden Cluster in den Nanowells gebildet, aus denen dann die Sequenzierungsreaktion durchgeführt wird. Die strukturierte Anordnung der Nanowells erhöht die Anzahl der Ausgabe-Reads und -daten.

Kartusche

Die Sequenzierungsreagenzienkartusche ist mit Cluster-, Sequenzierungs-, Paired-End- und Indizierungsreagenzien vorbefüllt. Ein folienversiegelter Behälter ist für Bibliotheken vorgesehen und die Aussparung auf der Vorderseite ist für die Fließzelle bestimmt.



- A. Bibliotheksbehälter
- B. Aussparung für Fließzelle
- C. Drainageverschluss

Die Kartusche enthält alle erforderlichen Verbrauchsmaterialien für einen Lauf: Reagenzien, Bibliothek und Fließzelle. Die Bibliothek und die Fließzelle werden in die aufgetaute Kartusche geladen. Anschließend wird die Kartusche in das Gerät geladen. Nach Beginn des Laufs werden die Reagenzien und die Bibliothek automatisch von der Kartusche an die Fließzelle übertragen.

Die Kartusche enthält Pumpen und Ventile sowie sämtliche Flüssigkeiten für das System, einschließlich eines Behälters an der Unterseite zur Aufnahme der verbrauchten Reagenzien. Die Kartusche wird nach dem Lauf entsorgt. Ein Gerätewaschlauf ist daher nicht erforderlich.

Unterstützte Anzahl von Zyklen

Das Etikett auf der Kartusche gibt an, wie viele Zyklen analysiert werden und nicht, wie viele Zyklen ausgeführt werden. Die Fließzelle ist mit einer beliebigen Anzahl von Zyklen und einem beliebigen Read-Typ kompatibel.

Alle Kartuschen für 100 und 200 Zyklen ermöglichen 38 zusätzliche Zyklen. Kartuschen für 300 Zyklen ermöglichen 27 zusätzliche Zyklen. Beispielsweise bietet die 300-Zyklen-Kartusche genügend Reagenzien für bis zu 327 Sequenzierungszyklen. Informationen darüber, wie viele Zyklen zu sequenzieren sind, finden Sie unter *Anzahl der Zyklen in einem Read*.

Symbolbeschreibungen

Die folgende Tabelle beschreibt die Symbole auf dem Verbrauchsmaterial bzw. auf der Verbrauchsmaterialverpackung.

Symbol	Beschreibung
	Das Datum, an dem das Verbrauchsmaterial abläuft. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, verwenden Sie das Verbrauchsmaterial vor diesem Datum.
	Gibt den Hersteller an (Illumina).
	Die Verwendung ist ausschließlich für Forschungszwecke (Research Use Only, RUO) vorgesehen.
	Gibt die Artikelnummer an, damit das Verbrauchsmaterial identifiziert werden kann. ¹

Symbol	Beschreibung
	Gibt den Chargencode an, um die Charge zu identifizieren, in der das Verbrauchsmaterial hergestellt wurde. ¹
	Weist auf eine Gesundheitsgefährdung hin.
	Lagerungstemperaturbereich in Grad Celsius. Lagern Sie das Verbrauchsmaterial bei Temperaturen innerhalb des angegebenen Bereichs. ²

Zusätzliche Verbrauchsmaterialien

Für die Sequenzierung und die Wartung sind folgende Verbrauchsmaterialien erhältlich.

Verbrauchsmaterialien für die Sequenzierung

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien für die Sequenzierung

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
Einweg-Handschuhe, ungepudert	Allgemeiner Laborlieferant	Allgemeine Verwendung.
NextSeq 1000/2000 P2 (v3) Reagents Kit	Illumina: Katalog-Nr. 20046811 (100 Zyklen) Katalog-Nr. 20046812 (200 Zyklen) Katalog-Nr. 20046813 (300 Zyklen)	Enthält die Reagenzienkartusche, die Fließzelle und NextSeq 1000/2000 RSB mit Tween 20 für einen Lauf. Kompatibel mit NextSeq 1000 und NextSeq 2000.

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
NextSeq 2000 P3 Reagents Kit	Illumina: Katalog-Nr. 20046810 (50 Zyklen) Katalog-Nr. 20040559 (100 Zyklen) Katalog-Nr. 20040560 (200 Zyklen) Katalog-Nr. 20040561 (300 Zyklen)	Enthält die Reagenzienkartusche, die Fließzelle und NextSeq 1000/2000 RSB mit Tween 20 für einen Lauf. Nur kompatibel mit dem NextSeq 2000.
Mikroröhrchen, 1,5 ml	Fisher Scientific, Katalog-Nr. 14-222-158 oder vergleichbare Low-Binding-Röhrchen	Verdünnen von Bibliotheken auf Ladekonzentration.
Pipettenspitzen, 10 µl	Allgemeiner Laborlieferant	Verdünnen von Bibliotheken.
Pipettenspitzen, 20 µl	Allgemeiner Laborlieferant	Verdünnen und Laden von Bibliotheken.
Pipettenspitzen, 200 µl	Allgemeiner Laborlieferant	Verdünnen von Bibliotheken.
Pipettenspitzen, 1.000 µl	Allgemeiner Laborlieferant	Durchstechen der Folie des Bibliotheksbehälters.
[Optional] PhiX Control v3	Illumina, Katalog-Nr. FC-110-3001	Durchführen eines Laufs nur mit PhiX oder Aufstocken in PhiX zu Kontrollzwecken.
[Optional] Papierhandtücher	Allgemeiner Laborlieferant	Trocknen der Kartusche nach einem Wasserbad.

Verbrauchsmaterialien für die Wartung

Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien für die Wartung

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
Einweg-Handschuhe, ungepudert	Allgemeiner Laborlieferant	Allgemeine Verwendung.
NextSeq 1000/2000 Air Filter Replacement*	Illumina, Katalog-Nr. 20029759	Austausch des Luftfilters alle sechs Monate.

* Das System wird mit einem eingesetzten Luftfilter und einem Ersatzteil geliefert. Ersatzteile sind vom Benutzer bereitzustellen, sofern diese nicht unter die Garantie fallen. Bis zur Verwendung in der Packung belassen.

Zusätzliche Ausstattung

Für die Sequenzierung ist folgende Ausstattung erforderlich.

Element	Quelle	Zweck
Gefrierschrank, -25 °C bis -15 °C	Allgemeiner Laborlieferant	Lagern der Kartusche.
Eiskübel	Allgemeiner Laborlieferant	Lagerung der Bibliotheken bis zur Sequenzierung.
Pipette, 10 µl	Allgemeiner Laborlieferant	Verdünnen von Bibliotheken auf Ladekonzentration.
Pipette, 20 µl	Allgemeiner Laborlieferant	Verdünnen von Bibliotheken auf Ladekonzentration und Laden der Bibliotheken in die Kartusche.
Pipette, 200 µl	Allgemeiner Laborlieferant	Verdünnen von Bibliotheken auf Ladekonzentration.
Kühlschrank, 2 °C bis 8 °C	Allgemeiner Laborlieferant	Lagern der Fließzelle oder Auftauen der Kartusche.
<p>[Optional] Eines der folgenden temperaturgeregelten Wasserbäder oder ein gleichwertiges Produkt:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Thermo Scientific Precision 35L Circulating Water Bath (nimmt fünf Kartuschen gleichzeitig auf) • SHEL LAB 22L Digital Circulating Water Bath (nimmt drei Kartuschen gleichzeitig auf) 	<ul style="list-style-type: none"> • Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. TSCIR 35 • Shel Lab, Katalog-Nr. SWBC22 	Auftauen der Kartusche.

Protokoll

Dieser Abschnitt enthält detaillierte Angaben zur Vorbereitung von Verbrauchsmaterialien, zur Verdünnung von Bibliotheken und zur Konfiguration eines Sequenzierlaufs in einem der vier Laufmodi (Cloud, Hybrid und Local verwenden DRAGEN oder BaseSpace Sequence Hub, während es sich beim Standalone-Modus um einen eigenständigen Lauf zum Generieren von cBCL-Daten ausschließlich für anwendungsspezifische Analyse-Workflows handelt).

Tragen Sie beim Umgang mit Reagenzien und anderen Chemikalien eine Schutzbrille, einen Laborkittel und ungepuderte Handschuhe.

Stellen Sie vor dem Starten des Protokolls sicher, dass Sie über die erforderlichen Verbrauchsmaterialien und Geräte verfügen. Siehe *Verbrauchsmaterialien und Ausstattung*.

Gehen Sie gemäß den Protokollen in der angezeigten Reihenfolge vor. Halten Sie sich dabei an die angegebenen Volumina, Temperaturen und Zeiten.

Erwägungen zur Sequenzierung

Machen Sie sich vor dem Start des Protokolls mit den folgenden Informationen zur Verdünnung von Bibliotheken und der Laufkonfiguration vertraut. Das Erzielen einer optimalen Ladekonzentration ist entscheidend für die erfolgreiche Sequenzierung und Analyse. Die Angabe der korrekten Zyklenanzahl für einen Read trägt zu einer optimalen Datenausgabe bei.

Ladevolumen und -konzentrationen

Das Ladevolumen beträgt 20 µl. Die Ladekonzentration variiert je nach Bibliothekstyp:

Bibliothekstyp	Ladekonzentration (pM)
AmpliSeq™ for Illumina Library PLUS	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep with Enrichment	1.000
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA PCR-Free	1.000
100 % PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1.200
TruSeq DNA Nano 550	1.500
TruSeq Stranded mRNA	1.000

Für weitere Bibliothekstypen wird für den Start eine Ladekonzentration von 650 pM empfohlen. Optimieren Sie diese Konzentration im Rahmen aufeinanderfolgender Läufe, um eine Ladekonzentration zu ermitteln, mit der Sie durchgehend Daten gemäß den Spezifikationen erhalten.

i | Verwenden Sie zur Optimierung der Ladekonzentration die Metrik „% Loading Concentration“ in der Ausgabedatei `PrimaryAnalysisMetrics.csv`, die nach Fertigstellung des Laufs zur Verfügung steht. Erhöhen Sie die Ladekonzentration, wenn der Wert für „% Loading Concentration“ < 95 % liegt, bei nachfolgenden Läufen in Schritten von 100 pM.

Anzahl der Zyklen in einem Read

Die Eingabe von mindestens 26 Zyklen und maximal 151 Zyklen pro Read hilft, die Datenqualität sicherzustellen. Die genaue Anzahl der Zyklen hängt von Ihrem Versuch ab. Die NextSeq 1000/2000 Control Software erfordert mindestens einen Zyklus für Read 1, zeigt jedoch eine Warnung an, wenn die Anzahl der Zyklen für Read 1 kleiner als 26 ist.

Die Gesamtzahl der Zyklen für Read 1, Index 1, Index 2 und Read 2 darf nicht größer sein als die Anzahl der vom Kit unterstützten Zyklen plus 38 Zyklen für Kits mit 100 und 200 Zyklen sowie plus 27 Zyklen für Kits mit 300 Zyklen. Die NextSeq 1000/2000 Control Software zeigt eine Warnung an, wenn für Index 1 und Index 2 weniger als sechs Zyklen angegeben wurden. Die Warnung wird nicht angezeigt, wenn für Index 1 oder Index 2 null Zyklen angegeben wurden.

Die minimale und maximale Zykluszahl beinhaltet einen zusätzlichen Zyklus. Fügen Sie immer einen Zyklus zur gewünschten Read-Länge hinzu, um die Auswirkungen von Phasierung und Vorphasierung zu korrigieren. Die Read-Länge ist die Anzahl der **Sequenzierungs**-Zyklen in Read 1 und Read 2. Nicht berücksichtigt sind zusätzliche Zyklen und Indexzyklen. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt „Korrektur der Phasierung“ unter [Real-Time Analysis-Workflow auf Seite 57](#).

Beispiel für eine Laufkonfiguration:

- Für eine Read-Länge von 35 (Single-Read) geben Sie **36** in das Feld „Read 1“ ein.
- Für eine Read-Länge von 150 pro Read (Paired-End) geben Sie **151** in das Feld „Read 1“ und **151** in das Feld „Read 2“ ein.

Planen eines Sequenzierungslaufs in BaseSpace Sequence Hub

Verwenden Sie die Option „Instrument Run Setup“ (Gerätelaufkonfiguration) in BaseSpace Sequence Hub, um Laufeinstellungen zu erstellen und zu konfigurieren. Wenn Sie einen Lauf im Cloud- oder Hybrid-Modus konfigurieren, senden Sie die Laufkonfiguration an die Liste geplanter Läufe auf der Registerkarte „Planned Runs“ (Geplante Läufe) in Ihrem BaseSpace Sequence Hub-Konto. Zur Sequenzierung auf den Sequenziersystemen NextSeq 1000 und NextSeq 2000 verfügbare Läufe werden auf der Registerkarte „Planned Runs“ (Geplante Läufe) angezeigt. Wenn Sie einen Lauf im Local-Modus konfigurieren, verwenden Sie die Option „Instrument Run Setup“

(Gerätelaufkonfiguration), um ein Probenblatt im Dateiformat Version 2 zu erstellen. Wahlweise finden Sie unter [Einstellungen für Probenblätter der Version 2 auf Seite 84](#) Informationen zum Erstellen eines Probenblatts ohne BaseSpace Sequence Hub mithilfe einer bereitgestellten Vorlage.

Die Gerätelaufkonfiguration von BaseSpace Sequence Hub unterstützt bis zu 384 Proben.

Konfigurieren eines Laufs

1. Navigieren Sie zu BaseSpace Sequence Hub.
 2. Geben Sie Ihre E-Mail-Adresse und Ihr BaseSpace Sequence Hub-Kennwort ein und wählen Sie anschließend **Sign in** (Anmelden).
 3. Wählen Sie die Registerkarte **Runs** (Läufe) und dann das Dropdown-Menü **New Run** (Neuer Lauf).
 4. Wählen Sie **NextSeq 1000/2000**.
 5. Geben Sie im Feld „Run Name“ (Laufname) einen beliebigen eindeutigen Namen ein, um den aktuellen Lauf zu identifizieren.
Der Laufname kann max. 225 alphanumerische Zeichen, Leerzeichen, Bindestriche und Unterstriche enthalten.
 6. Wählen Sie einen der folgenden Analysespeicherorte.
 - **BaseSpace**: Analyse der Sequenzierungsdaten in der Cloud
 - **Local** (Lokal): Analyse der Sequenzierungsdaten im Gerät oder Generieren eines Probenblatts der Version 2 für den Local- oder den Hybrid-Modus.
 7. Wählen Sie einen Analysetyp und eine Version.
Weitere Informationen zur Sekundäranalyse finden Sie unter [Ausgabedateien der DRAGEN-Sekundäranalyse auf Seite 62](#) oder in der Dokumentation zur BaseSpace Sequence Hub-App. Wenn Sie die DRAGEN Single Cell RNA-Analyse ausgewählt haben, finden Sie auf der Seite „Compatible Products“ (Kompatible Produkte) für die DRAGEN Bio-IT-Plattform weitere Informationen zur Kompatibilität von Einzelzell-RNA-Bibliotheksvorbereitungskits von Drittanbietern.
- i** | Für die Geräteanalyse muss die gewählte Version der auf dem Gerät installierten Version von DRAGEN entsprechen. Informationen zum Ermitteln der auf dem Gerät installierten DRAGEN-Version finden Sie unter [Pipeline- und Lizenz-Updates für DRAGEN auf Seite 74](#).
8. **[Optional]** Konfigurieren Sie anwendungsspezifische Index-Kits wie folgt.
Bei Verwendung mehrerer Bibliotheken müssen die Bibliotheken dieselbe Index-Read-Länge aufweisen.
 - a. Wählen Sie im Dropdown-Menü „Index Adapter Kit“ (Index-Adapter-Kit) die Option **Add Custom Index Adapter Kit** (Anwendungsspezifisches Index-Adapter-Kit hinzufügen).
 - b. Wählen Sie einen Vorlagentyp und geben Sie den Kit-Namen, die Adaptersequenzen, die Indexstrategien und die Indexsequenzen ein.
Stellen Sie sicher, dass die Adaptersequenzen für den zweiten Index (i5) in Vorwärtsrichtung vorliegen.

- c. Wählen Sie **Create New Kit** (Neues Kit erstellen).
9. **[Optional]** Konfigurieren Sie ein anwendungsspezifisches Bibliotheksvorbereitungskit wie folgt.
 - a. Wählen Sie im Dropdown-Menü „Library Prep Kit“ (Bibliotheksvorbereitungskit) die Option **Add Custom Library Prep Kit** (Anwendungsspezifisches Bibliotheksvorbereitungskit hinzufügen).
 - b. Geben Sie den Namen, die Read-Typen, die Standard-Read-Zyklen und kompatible Index-Adapter-Kits für das anwendungsspezifische Bibliotheksvorbereitungskit ein.
 - c. Wählen Sie **Create New Kit** (Neues Kit erstellen).
10. Wählen Sie die folgenden Geräteeinstellungen. Je nach Bibliotheksvorbereitungskit werden die empfohlenen Einstellungen automatisch ausgewählt. Bei einigen Bibliotheksvorbereitungskits sind die Anzahl der Index-Reads und die Read-Typen fest vorgegeben und können nicht geändert werden.
 - Library prep kit (Bibliotheksvorbereitungskit)
 - Index adapter kit (Index-Adapter-Kit)
 - Number of index reads (Anzahl der Index-Reads)
 - Read type (Read-Typ)
 - Number of sequencing cycles per read (Anzahl der Sequenzierungszyklen pro Read)



Wenn für das Bibliotheksvorbereitungskit „Not Specified“ (Nicht festgelegt) gewählt wird, wird die Anzahl der Index-Reads erst aktualisiert, wenn die Indexsequenzen im Abschnitt „Sample Data“ (Probendaten) eingegeben werden.

11. Geben Sie die Probeninformationen mithilfe einer der folgenden Optionen in die Tabelle „Sample Data“ (Probendaten) ein. Weisen Sie in der Spalte „Project“ (Projekt) einen Gruppennamen zu, um Proben zur Zusammenfassung der Daten während der nachgeschalteten Analyse zu gruppieren.
 - Wählen Sie **Import Data** (Daten importieren) und anschließend das Probenblatt. Stellen Sie sicher, dass die im Probenblatt „BCLConvert_Data“ angegebenen Indexsequenzen mit dem im NextSeq 1000/2000 gewählten Index-Kit übereinstimmen und dass Ihr Probenblatt richtig formatiert ist. Siehe *Einstellungen für Probenblätter der Version 2 auf Seite 84*. Änderungen am Probenblatt nach dem ersten Download können zu einem Fehlschlagen der Analyse führen.
 - Fügen Sie Proben-IDs und entweder die Well-Positionen der Indexplatte oder i7- und i5-Indizes direkt aus einer externen Datei ein. Geben Sie vor dem Einfügen im Feld „Rows“ (Zeilen) die Anzahl der Probenzeilen ein und wählen Sie dann **+**. Proben-IDs können bis zu 20 alphanumerische Zeichen, Bindestriche und Unterstriche enthalten.



Bei Indexplatten mit festem Layout sind Einträge für Well-Positionen erforderlich. Bei Indizes ohne festes Layout sind Einträge für i7- und i5-Indizes erforderlich. i5-Indizes müssen in Vorwärtsrichtung eingegeben werden.

- Geben Sie Proben-IDs und entsprechende Well-Positionen oder Indizes manuell ein. Wenn für das Bibliotheksvorbereitungskit „Not Specified“ (Nicht angegeben) ausgewählt ist, müssen Index 2-Sequenzen in Vorwärtsrichtung eingegeben werden.

12. Wählen Sie **Next** (Weiter).

Konfigurieren der Sekundäranalyse

Konfigurieren Sie die Einstellungen des für den Lauf ausgewählten Analysetyps.

Illumina DRAGEN BCL Convert

Konfigurieren Sie die Illumina DRAGEN BCL Convert-Analyse anhand der folgenden Schritte.

1. Geben Sie die folgenden optionalen Einstellungen ein.

Einstellung	Beschreibung
AdapterRead1	Adaptersequenz für Read 1. Lassen Sie das Feld „AdapterRead1“ frei, wenn Sie ein Illumina-Bibliotheksvorbereitungskit verwenden.
AdapterRead2	Adaptersequenz für Read 2. Lassen Sie das Feld „AdapterRead2“ frei, wenn Sie ein Illumina-Bibliotheksvorbereitungskit verwenden.
BarcodeMismatchesIndex1	Die Anzahl der zulässigen Nichtübereinstimmungen zwischen dem ersten Index-Read und der Indexsequenz. Der Standardwert lautet 1. Bei einem Barcode von 6 bp lautet der empfohlene Wert 0.
BarcodeMismatchesIndex2	Die Anzahl der zulässigen Nichtübereinstimmungen zwischen dem zweiten Index-Read und der Indexsequenz. Der Standardwert lautet 1. Bei einem Barcode von 6 bp lautet der empfohlene Wert 0.

Einstellung	Beschreibung
OverrideCycles	<p>Zeichenfolge zur Angabe der UMI-Zyklen und zum Ausschluss von Zyklen aus einem Read. Folgende Werte sind zulässig:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N: Gibt die zu ignorierenden Zyklen an. • Y: Gibt die Sequenzierungszyklen an. • I: Gibt die Indexzyklen an. • U: Gibt die zu trimmenden UMI-Zyklen an. <p>Die einzelnen Elemente werden mit Semikola getrennt. Im Folgenden finden Sie Beispiele für OverrideCycles-Eingaben.</p> <pre>U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66</pre>

2. Wählen Sie aus, ob eine Kopie der FASTQ-Dateien gespeichert werden soll. FASTQ-Dateien werden nur generiert, wenn Sie auswählen, dass FASTQ-Dateien gespeichert werden sollen.
3. Wählen Sie eine der folgenden Optionen für FASTQ-Ausgabeformate:
 - **gzip**: Speicherung der FASTQ-Dateien im GZIP-Format.
 - **DRAGEN**: Speicherung der FASTQ-Dateien im ORA-Format.
4. Stellen Sie die Laufkonfiguration fertig.
 - Wählen Sie **Submit Run** (Lauf absenden), um die Laufkonfiguration an Ihr BaseSpace Sequence Hub-Konto zu senden. An BaseSpace Sequence Hub gesendete Läufe werden in der Liste mit den geplanten Läufen angezeigt und sind im Cloud-Modus und im Hybrid-Modus für Systeme verfügbar.
 - Wählen Sie **Export Sample Sheet** (Probenblatt exportieren) aus der Dropdown-Liste **Submit Run** (Lauf absenden), um die Laufkonfiguration als Probenblatt im Dateiformat Version 2 zu speichern. Das Probenblatt ist erforderlich, um auf Systemen Läufe im Local-Modus zu starten. Diese Option ist nur verfügbar, wenn „Local“ (Lokal) als Analyseort ausgewählt wurde.

Illumina DRAGEN Enrichment

Konfigurieren Sie die Illumina DRAGEN Enrichment-Analyse anhand der folgenden Schritte.

1. Wählen Sie ein Referenzgenom.
Verwenden Sie, wenn möglich, ein ALT-sensibles Referenzgenom.
2. Wählen Sie eine *.bed-Datei mit den gewünschten Zielregionen aus oder laden Sie eine neue anwendungsspezifische Datei hoch.

Stellen Sie sicher, dass das Referenzgenom der BED-Datei dem in Schritt 1 gewählten Referenzgenom entspricht. Verwenden Sie für eine neue anwendungsspezifische BED-Datei folgendes Benennungsschema: `name_der_panel_versionNummer.referencegenom.bed`.

- **Local-Modus:** Wählen Sie **Select Custom File (Local)** (Anwendungsspezifische Datei wählen [Lokal]) für einen einzelnen Lauf oder **Upload Custom File (BaseSpace)** (Anwendungsspezifische Datei hochladen [BaseSpace]) zur wiederholten Verwendung.
 - **Cloud- oder Hybrid-Modus:** Wählen Sie **Upload Custom File (BaseSpace)** (Anwendungsspezifische Datei hochladen [BaseSpace]). Die anwendungsspezifische BED-Datei steht nur in der Arbeitsgruppe zur Verfügung, in die sie hochgeladen wurde.
3. Wählen Sie den Keimbahn-Varianten-Caller oder den Caller für somatische Varianten.
 4. Wählen Sie ein Mapping/Alignment-Ausgabeformat.
 5. Wählen Sie aus, ob eine Kopie der FASTQ-Dateien gespeichert werden soll. FASTQ-Dateien werden nur generiert, wenn Sie auswählen, dass FASTQ-Dateien gespeichert werden sollen.
 6. Wählen Sie eine der folgenden Optionen für FASTQ-Ausgabeformate:
 - **gzip:** Speicherung der FASTQ-Dateien im GZIP-Format.
 - **DRAGEN:** Speicherung der FASTQ-Dateien im ORA-Format.
 7. Stellen Sie die Laufkonfiguration fertig.
 - Wählen Sie **Submit Run** (Lauf absenden), um die Laufkonfiguration an Ihr BaseSpace Sequence Hub-Konto zu senden. An BaseSpace Sequence Hub gesendete Läufe werden in der Liste mit den geplanten Läufen angezeigt und sind im Cloud-Modus und im Hybrid-Modus für Systeme verfügbar.
 - Wählen Sie **Export Sample Sheet** (Probenblatt exportieren) aus der Dropdown-Liste **Submit Run** (Lauf absenden), um die Laufkonfiguration als Probenblatt im Dateiformat Version 2 zu speichern. Das Probenblatt und die ergänzenden Dateien für die Sekundäranalyse werden in einem ZIP-Ordner heruntergeladen und sind erforderlich, um auf Systemen Läufe im Local-Modus zu starten. Diese Option ist nur verfügbar, wenn „Local“ (Lokal) als Analyseort ausgewählt wurde.

Illumina DRAGEN Germline

Konfigurieren Sie die Illumina DRAGEN Germline-Analyse anhand der folgenden Schritte.

1. Wählen Sie Ihr Referenzgenom.
Verwenden Sie, wenn möglich, ein ALT-sensibles Referenzgenom.
2. Wählen Sie ein Mapping/Alignment-Ausgabeformat.
3. Wählen Sie aus, ob eine Kopie der FASTQ-Dateien gespeichert werden soll. FASTQ-Dateien werden nur generiert, wenn Sie auswählen, dass FASTQ-Dateien gespeichert werden sollen.

4. Wählen Sie eine der folgenden Optionen für FASTQ-Ausgabeformate:
 - **gzip**: Speicherung der FASTQ-Dateien im GZIP-Format.
 - **DRAGEN**: Speicherung der FASTQ-Dateien im ORA-Format.
5. Stellen Sie die Laufkonfiguration fertig.
 - Wählen Sie **Submit Run** (Lauf absenden), um die Laufkonfiguration an Ihr BaseSpace Sequence Hub-Konto zu senden. An BaseSpace Sequence Hub gesendete Läufe werden in der Liste mit den geplanten Läufen angezeigt und sind im Cloud-Modus und im Hybrid-Modus für Systeme verfügbar.
 - Wählen Sie **Export Sample Sheet** (Probenblatt exportieren) aus der Dropdown-Liste **Submit Run** (Lauf absenden), um die Laufkonfiguration als Probenblatt im Dateiformat Version 2 zu speichern. Das Probenblatt und die ergänzenden Dateien für die Sekundäranalyse werden in einem ZIP-Ordner heruntergeladen und sind erforderlich, um auf Systemen Läufe im Local-Modus zu starten. Diese Option ist nur verfügbar, wenn „Local“ (Lokal) als Analyseort ausgewählt wurde.

Illumina DRAGEN RNA

Konfigurieren Sie die Illumina DRAGEN RNA-Analyse anhand der folgenden Schritte.

1. Wählen Sie Ihr Referenzgenom.
Verwenden Sie, wenn möglich, ein nicht ALT-sensibles Referenzgenom.
2. Wählen Sie Ihr Mapping/Alignment-Ausgabeformat.
3. Wählen Sie aus, ob eine Kopie der FASTQ-Dateien gespeichert werden soll. FASTQ-Dateien werden nur generiert, wenn Sie auswählen, dass FASTQ-Dateien gespeichert werden sollen.
4. Wählen Sie eine der folgenden Optionen für FASTQ-Ausgabeformate:
 - **gzip**: Speicherung der FASTQ-Dateien im GZIP-Format.
 - **DRAGEN**: Speicherung der FASTQ-Dateien im ORA-Format.
5. **[Optional]** Laden Sie eine RNA-Annotationsdatei im GTF (Gene Transfer Format) hoch.
 - **Local-Modus**: Wählen Sie **Select Custom File (Local)** (Anwendungsspezifische Datei wählen [Lokal]) für einen einzelnen Lauf oder **Upload Custom File (BaseSpace)** (Anwendungsspezifische Datei hochladen [BaseSpace]) zur wiederholten Verwendung.
 - **Cloud- oder Hybrid-Modus**: Wählen Sie **Upload Custom File (BaseSpace)** (Anwendungsspezifische Datei hochladen [BaseSpace]). Die GTF-Datei steht nur in der Arbeitsgruppe zur Verfügung, in die sie hochgeladen wurde.

Wählen Sie nach dem Hochladen einer GTF-Datei in eine BaseSpace Sequence Hub-Arbeitsgruppe im Dropdown-Menü eine RNA-Annotationsdatei aus.

6. Stellen Sie die Laufkonfiguration fertig.
 - Wählen Sie **Submit Run** (Lauf absenden), um die Laufkonfiguration an Ihr BaseSpace Sequence Hub-Konto zu senden. An BaseSpace Sequence Hub gesendete Läufe werden in der Liste mit den geplanten Läufen angezeigt und sind im Cloud-Modus und im Hybrid-Modus für Systeme verfügbar.
 - Wählen Sie **Export Sample Sheet** (Probenblatt exportieren) aus der Dropdown-Liste **Submit Run** (Lauf absenden), um die Laufkonfiguration als Probenblatt im Dateiformat Version 2 zu speichern. Das Probenblatt und die ergänzenden Dateien für die Sekundäranalyse werden in einem ZIP-Ordner heruntergeladen, wenn eine optionale GTF-Datei bereitgestellt wurde, und sind erforderlich, um auf Systemen Läufe im Local-Modus zu starten. Diese Option ist nur verfügbar, wenn „Local“ (Lokal) als Analyseort ausgewählt wurde.

Illumina DRAGEN Single Cell RNA

Konfigurieren Sie die Illumina DRAGEN Single Cell RNA-Analyse anhand der folgenden Schritte.

1. Wählen Sie Ihr Referenzgenom.
Verwenden Sie, wenn möglich, ein nicht ALT-sensibles Referenzgenom.
2. **[Optional]** Laden Sie eine RNA-Annotationsdatei im GTF (Gene Transfer Format) hoch.
 - **Local-Modus:** Wählen Sie **Select Custom File (Local)** (Anwendungsspezifische Datei wählen [Lokal]) für einen einzelnen Lauf oder **Upload Custom File (BaseSpace)** (Anwendungsspezifische Datei hochladen [BaseSpace]) zur wiederholten Verwendung.
 - **Cloud- oder Hybrid-Modus:** Wählen Sie **Upload Custom File (BaseSpace)** (Anwendungsspezifische Datei hochladen [BaseSpace]). Die GTF-Datei steht nur in der Arbeitsgruppe zur Verfügung, in die sie hochgeladen wurde.

Wählen Sie nach dem Hochladen einer GTF-Datei in eine BaseSpace Sequence Hub-Arbeitsgruppe im Dropdown-Menü eine RNA-Annotationsdatei aus.
3. Wählen Sie Ihr Mapping/Alignment-Ausgabeformat.
4. Wählen Sie aus, ob eine Kopie der FASTQ-Dateien gespeichert werden soll. FASTQ-Dateien werden nur generiert, wenn Sie auswählen, dass FASTQ-Dateien gespeichert werden sollen.
5. Wählen Sie eine der folgenden Optionen für FASTQ-Ausgabeformate:
 - **gzip:** Speicherung der FASTQ-Dateien im GZIP-Format.
 - **DRAGEN:** Speicherung der FASTQ-Dateien im ORA-Format.
6. Wählen Sie die dem Bibliotheksvorbereitungskit entsprechende Konfiguration.
Wählen Sie beispielsweise bei Auswahl des Bibliotheksvorbereitungskits „Single Cell RNA Library Kit 1“ für „Configuration Type“ (Konfigurationstyp) die Option „Type 1“ (Typ 1) aus.
7. Wählen Sie den Barcode-Read aus.

8. **[Optional]** Bearbeiten Sie die Anzahl der Basen in den Barcodes und dem UMI. Die Werte werden anhand des Bibliotheksvorbereitungskits und des gewählten Konfigurationstyps automatisch eingefügt.
9. Wählen Sie die Strangausrichtung.
10. **[Optional]** Wählen Sie eine Datei mit den Barcode-Sequenzen oder laden Sie eine neue anwendungsspezifische Datei hoch.
11. Geben Sie bei Verwendung des Konfigurationstyps „Advanced“ (Erweitert) oder „Custom (Anwendungsspezifisch) die Werte für die Anzahl der Override-Zyklen, die Barcode-Position und die UMI-Position ein.
12. Stellen Sie die Laufkonfiguration fertig.
 - Wählen Sie **Submit Run** (Lauf absenden), um die Laufkonfiguration an Ihr BaseSpace Sequence Hub-Konto zu senden. An BaseSpace Sequence Hub gesendete Läufe werden in der Liste mit den geplanten Läufen angezeigt und sind im Cloud-Modus und im Hybrid-Modus für Systeme verfügbar.
 - Wählen Sie **Export Sample Sheet** (Probenblatt exportieren) aus der Dropdown-Liste **Submit Run** (Lauf absenden), um die Laufkonfiguration als Probenblatt im Dateiformat Version 2 zu speichern. Das Probenblatt und die ergänzenden Dateien für die Sekundäranalyse werden in einem ZIP-Ordner heruntergeladen, wenn eine optionale GTF-Datei bereitgestellt wurde, und sind erforderlich, um auf Systemen Läufe im Local-Modus zu starten. Diese Option ist nur verfügbar, wenn „Local“ (Lokal) als Analyseort ausgewählt wurde.

Auftauen der im Folienbeutel verpackten Kartusche und der Fließzelle

In diesem Schritt wird die Kartusche **im ungeöffneten Beutel aufgetaut** und die Fließzelle wird vorbereitet. Tauen Sie die Kartusche im Beutel mithilfe einer von drei Methoden auf: geregeltes Wasserbad, Kühlschrank oder Raumtemperatur. Verwenden Sie die Kartusche unmittelbar nach dem Auftauen. Frieren Sie die Kartusche nicht erneut ein. Wenn die Kartusche nach dem Auftauen nicht direkt verwendet werden kann, finden sie unter [Erneutes Lagern von Verbrauchsmaterialien auf Seite 79](#) weitere Informationen.

Abbildung 4 Im Folienbeutel verpackte Kartusche



Auftauen der Kartusche in einem geregelten Wasserbad

1. Ziehen Sie ein neues Paar ungepuderter Handschuhe an und entnehmen Sie die Kartusche aus dem Lagerort.
2. Entnehmen Sie die Kartusche aus dem Karton, **öffnen Sie jedoch nicht den Silberfolienbeutel.**

- ! Das Auftauen eines beschädigten Beutels in einem Wasserbad kann dazu führen, dass die Sequenzierung fehlschlägt. Tauen Sie den Beutel stattdessen bei Raumtemperatur oder in einem Kühlschrank auf.
3. Tauen Sie die im Beutel verpackte Kartusche sechs Stunden lang in einem geregelten Wasserbad bei einer Temperatur von 25 °C auf:
 - Die Wassertiefe muss mindestens 9,5 bis 10 cm betragen, unabhängig davon, wie viele Kartuschen aufgetaut werden.
 - Stellen Sie ein temperaturgeregeltes Wasserbad auf 25 °C ein.
 - Setzen Sie den Beutel mit dem Etikett nach oben in das Wasserbad, ohne diesen vollständig einzutauchen.
- ! Beschweren Sie die Kartusche nicht, um diese vollständig einzutauchen. Die Sequenzierungsdaten werden beeinträchtigt, wenn das Etikett nicht nach oben zeigt oder sich die Kartusche während des Auftauens umdreht.
- Belassen Sie die Kartusche höchstens acht Stunden im Wasserbad.
 - Tauen Sie nur so viele Kartuschen gleichzeitig im Wasserbad auf wie zulässig. Angaben zu geeigneten Wasserbädern finden Sie unter *Zusätzliche Ausstattung auf Seite 28*.

- Stapeln Sie die Kartuschen nicht.
4. Entnehmen Sie die Kartusche aus dem Wasserbad und trocknen Sie sie mit Papiertüchern.

Auftauen der Kartusche in einem Kühlschrank

1. Ziehen Sie ein neues Paar ungepuderter Handschuhe an.
2. Entnehmen Sie die Kartusche einen Tag vor dem geplanten Lauf aus der Lagerung bei -25 °C bis -15 °C.
3. Entnehmen Sie die Kartusche aus dem Karton, **öffnen Sie jedoch nicht den Silberfolienbeutel**.
4. Platzieren Sie die Kartusche bei Raumtemperatur mit dem Etikett nach oben und so, dass Luft an den Seiten und der Oberseite zirkulieren kann.

 Die Sequenzierungsdaten werden beeinträchtigt, wenn das Beuteletikett nicht nach oben weist.

5. Lassen Sie die Reagenzien 6 Stunden lang bei Raumtemperatur auftauen.
6. Platzieren Sie die Kartusche bei 2 °C bis 8 °C mit dem Etikett nach oben und so, dass Luft an den Seiten zirkulieren kann, im Kühlschrank.

 Die Sequenzierungsdaten werden beeinträchtigt, wenn das Beuteletikett nicht nach oben weist.

7. Lassen Sie die Kartusche 12 Stunden im Kühlschrank auftauen. Diese Lagerung darf 72 Stunden nicht überschreiten.

Auftauen der Kartusche bei Raumtemperatur

1. Ziehen Sie ein neues Paar ungepuderter Handschuhe an.
2. Nehmen Sie die Kartusche aus dem -25 °C bis -15 °C kalten Lagerort heraus.
3. Entnehmen Sie die Kartusche aus dem Karton, **öffnen Sie jedoch nicht den Silberfolienbeutel**.
4. Platzieren Sie die Kartusche mit dem Etikett nach oben und so, dass Luft an den Seiten und der Oberseite zirkulieren kann.

 Die Sequenzierungsdaten werden beeinträchtigt, wenn das Beuteletikett nicht nach oben weist.

5. Lassen Sie die Reagenzien 9 Stunden lang bei Raumtemperatur auftauen. Die Dauer darf 16 Stunden nicht überschreiten.

Vorbereiten von Fließzelle und Kartusche

1. Bereiten Sie die Fließzelle folgendermaßen vor.
 - a. Nehmen Sie eine neue Fließzelle aus einem Lagerort mit einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C.

- b. Bevor Sie die Fließzelle aus der Verpackung nehmen, lagern Sie die ungeöffnete Verpackung 10 bis 15 Minuten lang bei Raumtemperatur, um Kondensation zu vermeiden. Wenn Sie die Fließzelle auf diese Weise vorbereiten, stellen Sie sicher, dass sie rechtzeitig die Raumtemperatur erreicht.
2. Auftauen im Kühlschrank:
 - a. Entnehmen Sie die aufgetaute Kartusche aus dem Aufbewahrungsort mit einer Temperatur zwischen 2 °C und 8 °C.
 - b. Legen Sie die ungeöffnete Kartusche vor der Sequenzierung für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur zur Seite. Die Dauer darf 1 Stunde nicht überschreiten.

Verdünnen von Bibliotheken

Bei Verwendung der Denaturierung und Verdünnung im Gerät werden bei diesem Schritt die Bibliotheken auf die zulässige Ladekonzentration verdünnt. Ein optionaler PhiX¹-Spike-in von 2 % liefert zusätzliche Metriken, erhöht die Basenvarianz oder ergibt eine positive Kontrollprobe. Für Bibliotheken mit geringerer Basenvarianz kann der Prozentwert des PhiX-Spike-ins erhöht werden.

Anweisungen zur manuellen Denaturierung und Verdünnung von Bibliotheken finden Sie im *NextSeq 1000 and 2000 Denature and Dilute Libraries Guide (Dokument-Nr. 1000000139235)*. Dieser Schritt bezieht sich ausschließlich auf die Denaturierung und Verdünnung im Gerät.

Verdünnen der Bibliothek auf 2 nM

1. **[Optional]** Nehmen Sie 10-nM-PhiX aus dem -25 °C bis -15 °C kalten Lagerort heraus. PhiX wird ausschließlich für einen optionalen Spike-in oder einen Lauf nur mit PhiX benötigt.
2. **[Optional]** Lassen Sie PhiX fünf Minuten lang bei Raumtemperatur auftauen und führen Sie anschließend eine Quantifizierung mithilfe eines fluoreszenzbasierten Verfahrens wie Qubit zur Bestimmung der PhiX-Konzentration durch. Verwenden Sie eine Konzentration von 10 nM, wenn keine Quantifizierung möglich ist.
3. Mischen Sie die Bibliothek oder PhiX kurz mit dem Vortexer und zentrifugieren Sie anschließend eine Minute lang bei 280 × g.
4. Bereiten Sie durch Verdünnen mit RSB mit Tween 20 mindestens 24 µl einer 2-nM-Bibliothek in einem Low-Binding-Röhrchen vor. Anweisungen zum PhiX-Spike-in finden Sie unter *Hinzufügen einer PhiX-Kontrolle (optional)* auf Seite 43.
5. Mischen Sie kurz mit dem Vortexer und zentrifugieren Sie anschließend eine Minute lang bei 280 × g.

¹PhiX ist eine kleine, gebrauchsfertige Illumina-Bibliothek mit einer ausgewogenen Nukleotidverteilung.

Verdünnen der 2-nM-Bibliothek auf Ladekonzentration

1. Mischen Sie die folgenden Volumina in einem Low-Binding-Röhrchen, um 24 µl einer auf die entsprechende Ladekonzentration verdünnten Bibliothek vorzubereiten:

Bibliothekstyp*	Ladekonzentration (pM)	Volumen 2-nM-Bibliothek (µl)	Volumen RSB mit Tween 20 (µl)
Ampliseq for Illumina Library PLUS	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15
Illumina DNA Prep with Enrichment	1.000	12	12
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750	9	15
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA PCR-Free	1.000	12	12
TruSeq DNA Nano 350	1.200	14,4	9,6
TruSeq DNA Nano 550	1.500	18	6
TruSeq Stranded mRNA	1.000	12	12
100 % PhiX	650	7,8	16,2

* Beginnen Sie bei nicht aufgeführten Bibliothekstypen mit einer Ladekonzentration von 650 pM und optimieren Sie diese im Verlauf der weiteren Läufe.

Diese Tabelle enthält Beispielladekonzentrationen. Das NextSeq 1000/2000 ist mit allen Illumina-Bibliotheksvorbereitungskits kompatibel. Die optimale Ladekonzentration kann jedoch variieren.

2. Mischen Sie kurz mit dem Vortexer und zentrifugieren Sie anschließend eine Minute lang bei 280 × g.
3. Lagern Sie verdünnte Bibliotheken bis zur Sequenzierung auf Eis.
Sequenzieren Sie auf die Ladekonzentration verdünnte Bibliotheken am selben Tag.
4. Fahren Sie mit den nachfolgenden Schritten fort.
 - Wenn Sie PhiX hinzufügen, befolgen Sie die Anweisungen unter *Hinzufügen einer PhiX-Kontrolle (optional) auf Seite 43*.
 - Bei Läufen ohne oder nur mit PhiX befolgen Sie die Anweisungen unter *Laden von Verbrauchsmaterialien in die Kartusche auf Seite 43*.

Hinzufügen einer PhiX-Kontrolle (optional)

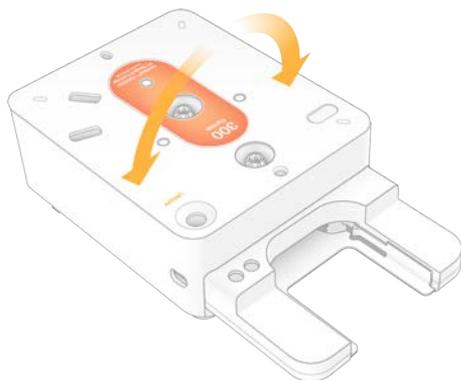
1. Mischen Sie die folgenden Volumina in einem Low-Binding-Röhrchen, um 20 µl 1-nM-PhiX vorzubereiten:
 - 10-nM-PhiX (2 µl)
 - RSB (18 µl)
2. Mischen Sie kurz mit dem Vortexer und zentrifugieren Sie anschließend eine Minute lang bei 280 × g.
3. Fügen Sie 1 µl 1-nM-PhiX zu 24 µl auf die endgültige Ladekonzentration verdünnter Bibliothek hinzu.
Diese Volumina ergeben ein PhiX-Spike-in von ca. 2 %. Der tatsächliche Prozentsatz ist abhängig von der Qualität und Quantität der Bibliothek.
4. Lagern Sie die Bibliothek mit PhiX-Spike-in bis zur Sequenzierung auf Eis.
Sequenzieren Sie Bibliotheken mit PhiX-Spike-in am Tag der Verdünnung.

Laden von Verbrauchsmaterialien in die Kartusche

Mit diesem Schritt werden die vorgefüllten Reagenzien gemischt und die verdünnten Bibliotheken sowie die Fließzelle geladen, um die Kartusche für die Sequenzierung vorzubereiten.

Vorbereiten der Kartusche

1. Öffnen Sie den Beutel der Kartusche, indem Sie ihn an einer der oberen seitlichen Einkerbungen aufreißen oder mit einer Schere aufschneiden.
2. Nehmen Sie die Kartusche aus dem Beutel heraus. Entsorgen Sie Beutel und Trocknungsmittel.
3. Invertieren Sie die Kartuschen zehn Mal, um die Reagenzien zu mischen.
Die internen Komponenten können beim Invertieren rasseln, was normal ist.

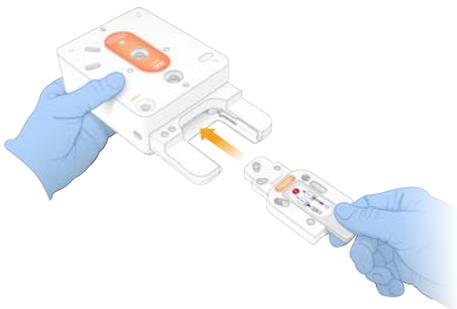


Laden der Fließzelle

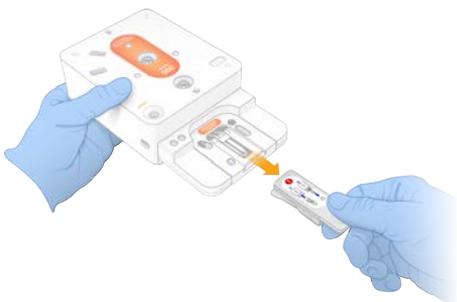
1. Öffnen Sie die Verpackung aus Silberfolie, indem Sie sie an einer der oberen seitlichen Einkerbungen aufreißen oder mit einer Schere aufschneiden.
Wenn die Kartusche nicht unmittelbar verwendet werden kann, finden sie unter *Erneutes Lagern von Verbrauchsmaterialien auf Seite 79* weitere Informationen.
2. Nehmen Sie die Fließzelle aus der Verpackung.
Bewahren Sie die Verpackung und das Trocknungsmittel auf, falls Sie die Fließzelle erneut lagern müssen. Das Trocknungsmittel befindet sich in einem Beutel am Boden der Folienverpackung. Entsorgen Sie beides nach Beginn der Sequenzierung.



3. Halten Sie die Fließzelle an der grauen Lasche so, dass das Etikett auf der Lasche nach oben zeigt.
4. Schieben Sie die Fließzelle in die Aussparung auf der Vorderseite der Kartusche.
Ein hörbares Klicken gibt an, dass die Fließzelle richtig positioniert ist. Wenn die Kartusche korrekt geladen ist, steht die graue Lasche aus der Kartusche hervor.



5. Ziehen Sie die graue Lasche ab, um die Fließzelle freizulegen. Führen Sie die Lasche dem Recycling zu.



Laden der Bibliotheken

1. Durchstechen Sie den Bibliotheksbehälter mit einer neuen P1000-Pipettenspitze und schieben Sie die Folie an den Rand, um die Öffnung zu vergrößern.
2. Entsorgen Sie die Pipettenspitze, um eine Kontaminierung zu vermeiden.
3. Bewegen Sie die Pipettenspitze langsam zum Behälter **boden** und geben Sie 20 µl verdünnte Bibliothek auf den Boden des Behälters. Achten Sie darauf, die Folie nicht zu berühren.



Starten eines Sequenzierungslaufs

Bei diesem Schritt wird ein Sequenzierungslauf in einem von vier Modi gestartet:

- **Cloud-Modus:** Der Lauf wird aus einer Liste geplanter Läufe in der NextSeq 1000/2000 Control Software gewählt. Während der Sequenzierung werden cBCL-Daten auf BaseSpace Sequence Hub hochgeladen. Nach der Sequenzierung startet DRAGEN in BaseSpace Sequence Hub automatisch.
- **Hybrid-Modus:** Der Lauf wird aus einer Liste geplanter Läufe in der NextSeq 1000/2000 Control Software gewählt. Nach der Sequenzierung startet die Geräteanalyse automatisch. Die cBCL-Daten und Ausgabedateien der DRAGEN-Sekundäranalyse werden im gewählten Ausgabeordner gespeichert.
- **Local-Modus:** Ein Probenblatt im Dateiformat Version 2 wird manuell in die NextSeq 1000/2000 Control Software importiert. Nach der Sequenzierung startet die Geräteanalyse automatisch. Die cBCL-Daten und Ausgabedateien der DRAGEN-Sekundäranalyse werden im gewählten Ausgabeordner gespeichert. Wenn „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) ausgewählt wurde, kann die Analyse auch über BaseSpace Sequence Hub-Apps gestartet werden, nachdem die Sequenzierung abgeschlossen ist.

- **Standalone-Modus:** Konfigurieren eines Laufs anhand der Anweisungen in der NextSeq 1000/2000 Control Software, um cBCL-Daten zu generieren.

 Das Öffnen der Blende während des Selbsttests oder des Laufs kann zum Fehlschlagen des Laufs führen.

 Halten Sie, um eventuelle Verletzungen zu vermeiden, Ihre Hände vom Gerät fern, während die Blende geöffnet oder geschlossen wird.

Starten eines Cloud- oder Hybrid-Laufs

1. Konfigurieren Sie den Laufmodus wie unter *Konfigurieren des Laufmodus auf Seite 19* beschrieben.
2. Wählen Sie **Start** (Starten).
3. Geben Sie Ihre Anmeldedaten für BaseSpace Sequence Hub ein und wählen Sie anschließend **Sign In** (Anmelden).
4. Wenn Sie „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) gewählt haben, wählen Sie die in BaseSpace Sequence Hub unter „Instrument Run Setup“ (Gerätelaufkonfiguration) erstellte Arbeitsgruppe, die Ihren Lauf enthält.

 Zur Vermeidung von Fehlern muss eine Arbeitsgruppe ausgewählt werden. Stellen Sie sicher, dass eine Arbeitsgruppe ausgewählt wurde, bevor Sie fortfahren.

5. Wählen Sie **Next** (Weiter).
6. Wählen Sie Ihren Lauf.
7. Stellen Sie sicher, dass die Versionen von Analyse, Lauflänge und Sekundäranalyse dem richtigen Lauf entsprechen.
Die Analyse zeigt „Cloud_“ an. Dies gibt an, dass die Analyse in BaseSpace Sequence Hub erfolgt.
8. Wählen Sie **Review** (Überprüfung).

9. **[Optional]** Geben Sie Orte für anwendungsspezifische Read-Primer und Index-Primer ein.
Weitere Informationen zum Vorbereiten und Hinzufügen anwendungsspezifischer Primer finden Sie im *NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide (Dokument-Nr. 1000000139569)*. Prüfen Sie auf der Seite „Compatible Products“ (Kompatible Produkte) für Ihr Bibliotheksvorbereitungskit, ob anwendungsspezifische Primer von Illumina erforderlich sind.
10. **[Optional]** Verwenden Sie eine anwendungsspezifische Rezeptur für die Dunkelzyklus-Sequenzierung. Siehe *Dunkelzyklus-Sequenzierung auf Seite 96*.
11. Deaktivieren Sie das Kontrollkästchen **Denature and Dilute On Board** (Im Gerät denaturieren und verdünnen), um Bibliotheken manuell zu denaturieren und zu verdünnen.
Die Standardauswahl wird in den Einstellungen der NextSeq 1000/2000 Control Software festgelegt.
12. **[Optional]** Wählen Sie das Feld „Output Folder“ (Ausgabeordner) und geben Sie den neuen Speicherort ein, wenn Sie den Ausgabeordner ändern möchten.
Das Feld „Output Folder“ (Ausgabeordner) wird anhand der Standardeinstellungen automatisch ausgefüllt. Es handelt sich um ein Pflichtfeld, sofern nicht **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) ausgewählt ist.
Wenn Sie „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) gewählt haben, wird für „Save to BaseSpace Sequence Hub“ (Auf BaseSpace Sequence Hub speichern) die Option „Enabled“ (Aktiviert) angezeigt.
Wenn Sie „Proactive and Run Monitoring“ (Proactive und Laufüberwachung) gewählt haben, wird für „Save to BaseSpace Sequence Hub“ (Auf BaseSpace Sequence Hub speichern) die Option „Disabled“ (Deaktiviert) angezeigt.
13. Überprüfen Sie Ihre Laufinformationen und wählen Sie **Prep** (Vorbereiten) aus.

Starten eines lokalen Laufs

1. Konfigurieren Sie den Laufmodus wie unter *Konfigurieren des Laufmodus auf Seite 19* beschrieben.
2. Wählen Sie **Start** (Starten).
3. Wenn Sie „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) oder „Proactive and Run Monitoring“ (Proactive und Laufüberwachung) gewählt haben, geben Sie Ihre BaseSpace Sequence Hub-Anmeldeinformationen ein und wählen Sie dann **Sign In** (Anmelden).
4. Wenn Sie „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) gewählt haben, wählen Sie die BaseSpace Sequence Hub-Arbeitsgruppe, in der Ihr Lauf gespeichert werden soll, und anschließend **Next** (Weiter).

 Zur Vermeidung von Fehlern muss eine Arbeitsgruppe ausgewählt werden. Stellen Sie sicher, dass eine Arbeitsgruppe ausgewählt wurde, bevor Sie fortfahren.

5. Wählen Sie unter „Start With Sample Sheet“ (Mit Probenblatt beginnen) die Option **Choose...** (Auswählen ...) und navigieren Sie zum Probenblatt (im Format Version 2) auf dem NextSeq 1000/2000-Gerät, dem tragbaren Laufwerk oder dem gemounteten Netzwerklaufwerk. Probenblattnamen dürfen keine Sonderzeichen enthalten.

- **Gerätelaufkonfiguration verwendet:** Wählen Sie den ZIP-Ordner mit dem Probenblatt Version 2 und ggf. den ergänzenden Dateien. Wählen Sie andernfalls das Probenblatt der Version 2.
- **Gerätelaufkonfiguration nicht verwendet:** Stellen Sie sicher, dass sich die ergänzende Datei für die Sekundäranalyse im selben Verzeichnis befindet wie das Probenblatt der Version 2.

i | Das ausgewählte Probenblatt muss im Format Version 2 vorliegen. Wenn Sie ein Probenblatt im Format Version 2 erstellen möchten, laden Sie das Probenblatt unter „Instrument Run Setup“ (Gerätelaufkonfiguration) in BaseSpace Sequence Hub herunter. Sie können auch eine Probenblattvorlage im Format Version 2 von der NextSeq 1000/2000-Supportseite bearbeiten. Weitere Informationen zum Format Version 2 und zu entsprechenden Anforderungen finden Sie unter [Einstellungen für Probenblätter der Version 2 auf Seite 84](#). Stellen Sie sicher, dass sich Dateien, auf die im Probenblatt verwiesen wird, im selben Ordner wie das Probenblatt befinden.

6. Wählen Sie **Review** (Überprüfung).

7. **[Optional]** Geben Sie Orte für anwendungsspezifische Read-Primer und Index-Primer ein. Weitere Informationen zum Vorbereiten und Hinzufügen anwendungsspezifischer Primer finden Sie im *NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide (Dokument-Nr. 1000000139569)*. Prüfen Sie auf der Seite „Compatible Products“ (Kompatible Produkte) für Ihr Bibliotheksvorbereitungskit, ob anwendungsspezifische Primer von Illumina erforderlich sind.

8. **[Optional]** Verwenden Sie eine anwendungsspezifische Rezeptur für die Dunkelzyklus-Sequenzierung. Siehe [Dunkelzyklus-Sequenzierung auf Seite 96](#).

9. Deaktivieren Sie das Kontrollkästchen **Denature and Dilute On Board** (Im Gerät denaturieren und verdünnen), um Bibliotheken manuell zu denaturieren und zu verdünnen. Die Standardauswahl wird in den Einstellungen der NextSeq 1000/2000 Control Software festgelegt.

10. **[Optional]** Wählen Sie das Feld „Output Folder“ (Ausgabeordner) und geben Sie den neuen Speicherort ein, wenn Sie den Ausgabeordner ändern möchten.

Das Feld „Output Folder“ (Ausgabeordner) wird anhand der Standardeinstellungen automatisch ausgefüllt. Es handelt sich um ein Pflichtfeld, sofern nicht Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) ausgewählt ist.

Wenn Sie „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) gewählt haben, wird für „Save to BaseSpace Sequence Hub“ (Auf BaseSpace Sequence Hub speichern) die Option „Enabled“ (Aktiviert) angezeigt.

Wenn Sie „Proactive and Run Monitoring“ (Proactive und Laufüberwachung) gewählt haben, wird für „Save to BaseSpace Sequence Hub“ (Auf BaseSpace Sequence Hub speichern) die Option „Disabled“ (Deaktiviert) angezeigt.

11. Überprüfen Sie Ihre Laufinformationen und wählen Sie **Prep** (Vorbereiten) aus.

Initiieren eines eigenständigen Laufs

1. Konfigurieren Sie den Laufmodus wie unter *Konfigurieren des Laufmodus auf Seite 19* beschrieben.
2. Wählen Sie **Start** (Starten).
3. Wenn Sie „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) oder „Proactive and Run Monitoring“ (Proactive und Laufüberwachung) gewählt haben, geben Sie Ihre BaseSpace Sequence Hub-Anmeldeinformationen ein und wählen Sie dann **Sign In** (Anmelden).
4. Wenn Sie „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) gewählt haben, wählen Sie die BaseSpace Sequence Hub-Arbeitsgruppe, in der Ihr Lauf gespeichert werden soll, und anschließend **Next** (Weiter).
5. Wählen Sie **Set Up New Run** (Neuen Lauf konfigurieren).
6. Geben Sie im Feld „Run Name“ (Laufname) einen beliebigen eindeutigen Namen ein, um den aktuellen Lauf zu identifizieren.
Der Laufname kann alphanumerische Zeichen, Bindestriche, Trennstriche und Unterstriche enthalten.
7. Wählen Sie unter „Read Type“ (Read-Typ) die Anzahl der Sequenzierungs-Reads aus, die durchgeführt werden sollen:
 - **Single Read** (Single-Read): Führt einen Read durch und ist die einfachere, schnellere Variante.
 - **Paired End** (Paired-End): Führt zwei Reads durch. Die übereinstimmenden Daten der beiden Läufe generieren hochwertigere Daten und sorgen für ein genaueres Alignment.
8. Geben Sie die in jedem Read ausgeführte Anzahl der Zyklen ein:
Die maximale Anzahl der Index-Zyklen ist unbegrenzt, jedoch muss die Summe der Read-Zyklen und der Index-Zyklen kleiner als die Anzahl der auf dem Etikett der Kartuschen angegebenen Zyklen plus 27 sein.

Read 1: Geben Sie **1–151** Zyklen ein.

Index 1: Geben Sie die Anzahl der Zyklen für den Index 1 (i7) Primer ein. Geben Sie bei Läufen nur mit PhiX in beide Indexfelder **0** ein.

Index 2: Geben Sie die Anzahl der Zyklen für den Index 2 (i5) Primer ein.

Read 2: Geben Sie bis zu **151** Zyklen ein. Dieser Wert ist in der Regel der gleiche wie der Wert für Read 1.

9. Importieren Sie über **Choose...** (Auswählen ...) ein Probenblatt, wenn Sie die Option „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) ausgewählt haben.

- i** | Das ausgewählte Probenblatt muss im Format Version 2 vorliegen. Wenn Sie ein Probenblatt im Format Version 2 erstellen möchten, laden Sie das Probenblatt unter „Instrument Run Setup“ (Gerätelaufkonfiguration) in BaseSpace Sequence Hub herunter. Sie können auch eine Probenblattvorlage im Format Version 2 von der NextSeq 1000/2000-Supportseite bearbeiten. Weitere Informationen zum Format Version 2 und zu entsprechenden Anforderungen finden Sie unter *Einstellungen für Probenblätter der Version 2 auf Seite 84*. Stellen Sie sicher, dass sich Dateien, auf die im Probenblatt verwiesen wird, im selben Ordner wie das Probenblatt befinden.
- [Optional]** Geben Sie Orte für anwendungsspezifische Read-Primer und Index-Primer ein. Weitere Informationen zum Vorbereiten und Hinzufügen anwendungsspezifischer Primer finden Sie im *NextSeq 1000 and 2000 Custom Primers Guide (Dokument-Nr. 1000000139569)*. Prüfen Sie auf der Seite „Compatible Products“ (Kompatible Produkte) für Ihr Bibliotheksvorbereitungskit, ob anwendungsspezifische Primer von Illumina erforderlich sind.
 - [Optional]** Verwenden Sie eine anwendungsspezifische Rezeptur für die Dunkelzyklus-Sequenzierung. Siehe *Dunkelzyklus-Sequenzierung auf Seite 96*.
 - Deaktivieren Sie das Kontrollkästchen **Denature and Dilute On Board** (Im Gerät denaturieren und verdünnen), um Bibliotheken manuell zu denaturieren und zu verdünnen. Die Standardauswahl wird in den Einstellungen der NextSeq 1000/2000 Control Software festgelegt.
 - [Optional]** Wählen Sie das Feld „Output Folder“ (Ausgabeordner) und geben Sie den neuen Speicherort ein, wenn Sie den Ausgabeordner ändern möchten. Das Feld „Output Folder“ (Ausgabeordner) wird anhand der Standardeinstellungen automatisch ausgefüllt. Es handelt sich um ein Pflichtfeld, sofern nicht Proactive, Run Monitoring and Storage (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) ausgewählt ist.
 - Wählen Sie **Prep** (Vorbereiten).

Laden der Verbrauchsmaterialien in das Gerät

- Stellen Sie sicher, dass die Kartusche vorab aufgetaut und zum Mischen zehnmal invertiert wurde, bevor die Fließzelle (graue Lasche entfernt) sowie die verdünnte Bibliothek geladen werden.
- Wählen Sie **Load** (Laden). Die NextSeq 1000/2000 Control Software öffnet die Blende und wirft den Träger aus.

3. Setzen Sie die Kartusche mit der Kennzeichnung nach oben auf den Träger, die Fließzelle weist dabei ins Innere des Geräts. Drücken Sie die Kartusche auf den Träger, bis die Befestigungselemente einrasten.



4. Wählen Sie **Close** (Schließen), um die Kartusche einzuziehen und die Blende zu schließen. Die NextSeq 1000/2000 Control Software zeigt nach zwei Minuten Informationen zu den gescannten Verbrauchsmaterialien an.
5. **[Optional]** Mit **Eject Cartridge** (Kartusche auswerfen) können Sie die Kartusche auswerfen. Nach einer Minute wird die Blende geöffnet und die Kartusche wird ausgeworfen.
6. Wählen Sie **Sequence** (Sequenzieren).

Selbsttests

Selbsttests beinhalten eine Geräte- und eine Fluidikprüfung. Während der Fluidikprüfung werden die Kartuschenfolien durchstochen. Dabei sind drei bis vier entsprechende Geräusche aus dem Gerät wahrnehmbar. Dies ist so vorgesehen. Das Reagenz wird nun durch die Fließzelle geleitet.

! Verbrauchsmaterialien können nach Beginn der Fluidikprüfung nicht mehr wiederverwendet werden.

1. Warten Sie etwa 15 Minuten, bis die Selbsttests abgeschlossen sind. Nach erfolgreichem Abschluss startet der Lauf automatisch.
2. Wenn während der Geräteprüfung ein Fehler auftritt, wählen Sie **Retry** (Wiederholen), um die Prüfung erneut durchzuführen. Wenn eine Prüfung läuft, wird der Kreis für diese Prüfung animiert.
3. Informationen zur Behebung wiederkehrender Fehler finden Sie unter *Beheben von Fehlermeldungen auf Seite 78*.

Überwachen des Lauffortschritts

1. Überwachen Sie den Ausführungsfortschritt des Laufs und die Kennzahlen, die auf dem Sequenzierungsbildschirm angezeigt werden.

- **Estimated run completion** (Geschätzter Abschluss des Laufs): Das ungefähre Datum und die ungefähre Uhrzeit für den Abschluss des Laufs. Zum Berechnen von präzisen Abschlussprognosen für den Lauf sind zehn bereits erfolgte Läufe erforderlich.
- **Average %Q30** (Durchschnittliche %Q30): Der durchschnittliche Prozentsatz von Base-Calls mit einem Q-Score ≥ 30 .
- **Projected Yield** (Erwartetes Ergebnis): Die erwartete Anzahl von Base-Calls für den Lauf.
- **Total Reads PF** (PF-Reads insgesamt): Anzahl der Paired-End-Cluster (falls zutreffend) nach Filterung (in Millionen).
- **Real Time Demux** (Demultiplexing in Echtzeit): Status des Demultiplexings bei Initiierung zu Beginn von Read 2 nach Abschluss der Read 1-, Index 1- und Index 2-Zyklen. Der Status „Complete“ (Abgeschlossen) wird auch dann angezeigt, wenn keine Index-Zyklen durchgeführt werden. Nicht für Läufe im Cloud-Modus verfügbar.
- **Real Time Alignment** (Alignment in Echtzeit): Status des Alignments von Read 1 bei Initiierung zu Beginn von Read 2 nach Abschluss der Read 1-, Index 1- und Index 2-Zyklen. Nicht für Läufe im Cloud-Modus verfügbar.

Q30- und Ergebniswerte werden nach Zyklus 26 (ca. 6 Stunden nach Beginn des Laufs) angezeigt.

2. Zur Überwachung von Laufprozessen wählen Sie das Menü der Steuerungssoftware und dann **Process Management** (Prozessmanagement).
3. Mit **End Run** (Lauf beenden) können Sie einen Lauf abbrechen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter [Abbrechen eines Laufs auf Seite 79](#).
4. Entladen Sie die Verbrauchsmaterialien aus dem Gerät. Entfernen Sie die Kartusche innerhalb von drei Tagen aus dem Gerät.

Entladen von Verbrauchsmaterialien

1. Wählen Sie nach Abschluss der Sequenzierung **Eject Cartridge** (Kartusche auswerfen). Die Software wirft die gebrauchte Kartusche aus dem Gerät.
2. Nehmen Sie die Kartusche aus dem Träger heraus.
3. Nehmen Sie die Fließzelle aus der Kartusche.
Derzeit sind keine Anweisungen zum Zerlegen von Fließzellen für das Recycling vorhanden.
4. Entsorgen Sie die Fließzelle, die elektronische Komponenten enthält, gemäß den geltenden Vorschriften Ihrer Region.
5. **[Optional]** Entfernen Sie den Drainageverschluss unter dem Illumina-Logo an der Seite der Kartusche über einem geeigneten Bereich (z. B. Waschbecken oder Behälter für gefährliche Flüssigkeitsabfälle). Der Verschluss muss dabei horizontal oder nach unten weg von Ihrem Gesicht weisen. Entsorgen Sie verbrauchte Reagenzien gemäß den geltenden Vorschriften Ihrer Region. Die Drainagezeit ist von der Kartuschengröße abhängig, wenn die automatische Entleerung von Reagenzien nicht aktiviert ist.



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 in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter support.illumina.com/sds.html.

6. Entsorgen Sie die Kartusche (ggf. mit nicht verbrauchten Reagenzien) gemäß den geltenden Vorschriften Ihrer Region.
Derzeit sind keine Anweisungen zum Zerlegen von Kartuschen für das Recycling vorhanden. Eine Nachwaschung ist nicht erforderlich, da die Fluidik mit der Kartusche entsorgt wird.
7. Wählen Sie **Close Door** (Klappe schließen), um den Träger wieder zu laden und zum Startbildschirm zurückzukehren.
Die Software lädt den Träger automatisch neu und Sensoren bestätigen die Entnahme der Kartusche.

Sequenzierungsausgabe

In diesem Abschnitt wird die Real-Time Analysis-Software beschrieben, mit der Base-Calling, Zuweisung von Qualitäts-Scores und Datenausgabe erfolgen. Sie erhalten Informationen zu den unterschiedlichen Ausgabedateitypen und dazu, wo diese nach dem Lauf gespeichert werden.

Überblick über Real-Time Analysis

Die Sequenziersysteme NextSeq 1000 und NextSeq 2000 führen RTA3 aus, eine Implementierung der Real-Time Analysis-Software auf dem CE-Gerät (Compute Engine). RTA3 extrahiert Intensitäten aus Bildern von der Kamera, führt das Base-Calling durch, weist Base-Calls einen Qualitäts-Score zu, führt das Alignment auf PhiX durch und fasst Daten in InterOp-Berichtsdateien zusammen, die in der Instrument Control Software angezeigt werden können.

Zur Optimierung der Verarbeitungszeit legt RTA3 die Informationen im Speicher ab. Wenn RTA3 abgeschlossen ist, wird die Verarbeitung nicht wieder aufgenommen und alle Laufdaten, die im Speicher verarbeitet werden, gehen verloren.

RTA3-Eingabedaten

RTA3 erfordert für die Verarbeitung Plattenbilder, die im lokalen Systemspeicher gespeichert sind. RTA3 empfängt Laufinformationen und Befehle von der Steuerungssoftware.

RTA3-Ausgabedaten

Bilder von jedem Farbkanal werden gespeichert und als Platten an RTA3 übergeben. RTA3 gibt von diesen Bildern mehrere hinsichtlich ihrer Qualität ausgewertete Base-Call-Dateien und Filterdateien aus. Alle anderen Ausgaben sind ergänzende Dateien für die Ausgabe.

Dateityp	Beschreibung
Base-Call-Dateien	Die einzelnen analysierten Platten sind in einer verknüpften Base-Call-Datei (*.cbcl) enthalten. Platten derselben Lane oder Oberfläche werden in einer *.cbcl-Datei für die jeweilige Lane und Oberfläche aggregiert.
Filterdateien	Die einzelnen Platten produzieren jeweils eine Filterdatei (*.filter), die angibt, ob ein Cluster die Filter passiert.
Clusterpositionsdateien	Clusterpositionsdateien (*.locs) enthalten die X- und Y-Koordinaten aller Cluster einer Platte. Für jeden Lauf wird eine Clusterpositionsdatei generiert.

Ausgabedateien werden für die nachgeschaltete Analyse in DRAGEN und BaseSpace Sequence Hub verwendet.

Fehlerbehandlung

RTA3 erstellt Protokolldateien und speichert sie im Ordner „Logs“ (Protokolle). Fehler werden in einer Textdatei im Dateiformat *.log aufgezeichnet.

Wenn die Verarbeitung abgeschlossen ist, werden die folgenden Protokolldateien an das endgültige Ausgabeziel übertragen:

`info_00000.log` enthält eine Zusammenfassung wichtiger Laufereignisse.

`error_00000.log` protokolliert während des Laufs aufgetretene Fehler.

`warning_00000.log` protokolliert während des Laufs aufgetretene Warnungen.

Fließzellenplatten

Platten sind kleine Bildgebungsbereiche auf der Fließzelle. Die Kamera nimmt ein Bild je Platte auf.

Die NextSeq 1000/2000 P2-Fließzelle enthält 132 Platten. Die NextSeq 1000/2000 P3-Fließzelle enthält 264 Platten.

Tabelle 5 Fließzellenplatten

Fließzellenkomponente	NextSeq 1000/2000 P2-Fließzelle	NextSeq 1000/2000 P3-Fließzelle	Beschreibung
Lanes	1	2	Eine Lane ist ein physischer Kanal mit Einlass- und Auslassöffnungen.
Oberflächen	2	2	Zwei Oberflächen der P2- und P3-Fließzellen werden aufgenommen: die obere und die untere. Die obere Oberfläche einer Platte wird zuerst abgebildet.
Bildstreifen pro Lane	6	6	Ein Bildstreifen ist eine Spalte in einer Fließzellen-Lane.

Fließzellenkomponente	NextSeq 1000/2000 P2-Fließzelle	NextSeq 1000/2000 P3-Fließzelle	Beschreibung
Platten je Bildstreifen	11	11	Eine Platte ist ein Teil eines Bildstreifens und stellt einen abgebildeten Bereich auf der Fließzelle dar.
Gesamtanzahl generierter Platten	132	264	Lanes × Oberflächen × Bildstreifen × Platten je Bildstreifen ergibt die Gesamtanzahl an Platten.

Plattenbenennung

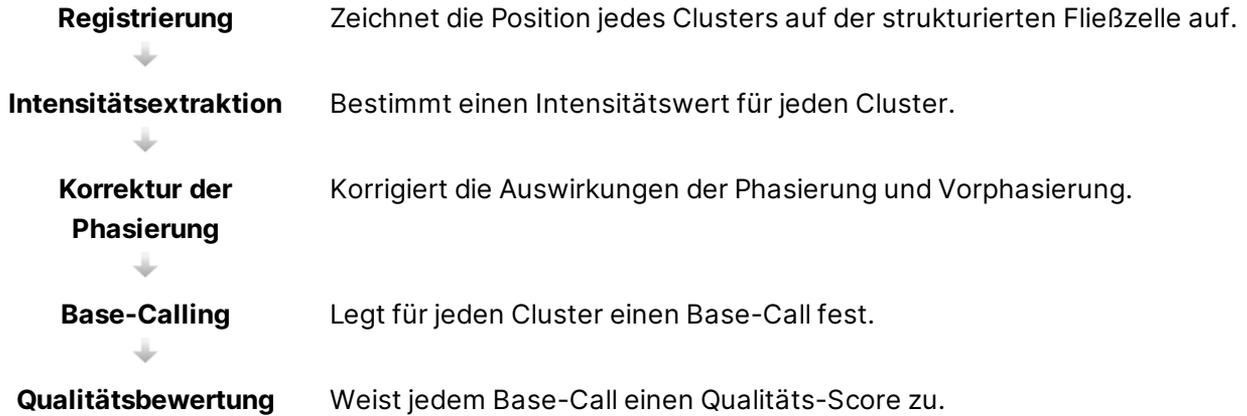
Bei dem Plattennamen handelt es sich um eine vierstellige Zahl, die die Plattenposition der Fließzelle darstellt. Beispielsweise gibt der Plattenname 1205 Folgendes an: obere Oberfläche, Bildstreifen 2, Platte 05.

Die erste Ziffer gibt die Oberfläche an: 1 für die Oberseite und 2 für die Unterseite.

Die zweite Ziffer gibt die Bildstreifennummer an: 1, 2, 3, 4, 5 oder 6.

Die letzten beiden Ziffern geben die Plattennummer an. Bei den Bildstreifen 1 bis 4 beginnt die Nummerierung bei 01 am Auslassende der Fließzelle und reicht bis 14 am Einlassende. Bei den Bildstreifen 5 bis 6 beginnt die Nummerierung bei 01 am Einlassende und reicht bis 11 am Auslassende.

Real-Time Analysis-Workflow



Registrierung

Bei der Registrierung wird auf der strukturierten Fließzelle ein Bild auf dem gedrehten Quadrat-Array mit Nanowells ausgerichtet. Aufgrund der geordneten Struktur der Nanowells sind die X- und Y-Koordinaten der einzelnen Cluster einer Platte vorbestimmt. Die Clusterpositionen des jeweiligen Laufs werden in einer Clusterpositionsdatei (s.locs) gespeichert.

Wenn die Registrierung für ein Bild in einem Zyklus fehlschlägt, werden für diese Platte in diesem Zyklus keine Base-Calls erzeugt. Mithilfe des Sequenzierungsanalyse-Viewers können Sie bestimmen, welche Bilder die Registrierung nicht bestanden haben.

Intensitätsextraktion

Nach der Registrierung berechnet die Intensitätsextraktion einen Intensitätswert für jeden Nanowell in einem bestimmten Bild. Schlägt die Registrierung fehl, kann die Intensität für diese Platte nicht extrahiert werden.

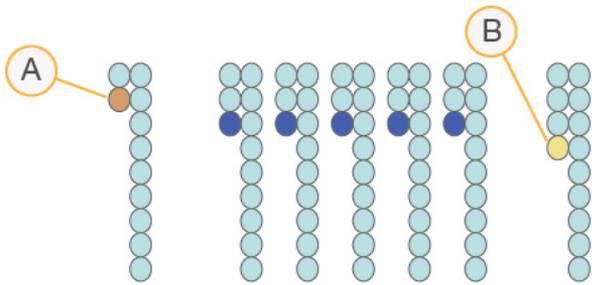
Korrektur der Phasierung

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 vorseilt.

Abbildung 5 Phasierung und Vorphasierung



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

RTA3 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. Die Sequenziersysteme NextSeq 1000 und NextSeq 2000 verwenden die Zweikanal-Sequenzierung, die nur zwei Bilder benötigt, um die Daten für vier DNA-Basen zu codieren: ein Bild aus dem grünen Kanal und ein Bild aus dem blauen Kanal.

Das Ergebnis „No-Call“ wird als N identifiziert. „No-Calls“ treten auf, wenn Cluster die Filter nicht passieren, die Registrierung fehlschlägt oder Cluster außerhalb des Bildes verschoben werden.

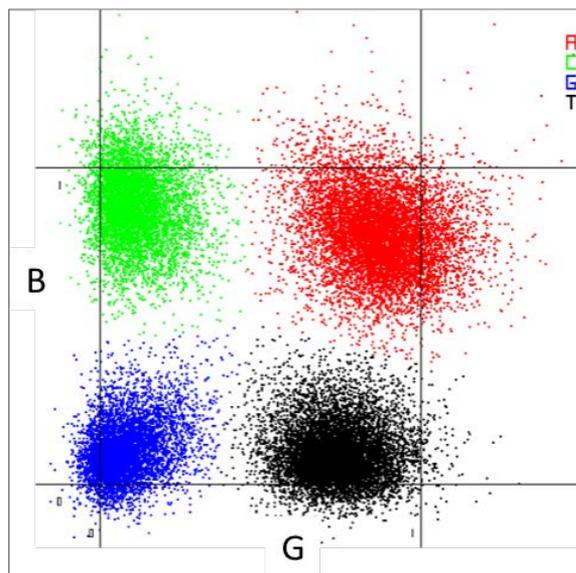
Intensitäten für jeden Cluster werden aus den grünen und blauen Bildern extrahiert und miteinander verglichen. Dies ergibt vier verschiedene Populationen. Jede Population entspricht einer Base. Der Base-Calling-Prozess bestimmt, zu welcher Population jeder Cluster gehört.

Tabelle 6 Base-Calls bei einer Zweikanal-Sequenzierung

Base	Grüner Kanal	Blauer Kanal	Ergebnis
A	1 (vorhanden)	1 (vorhanden)	Cluster, die Intensitäten sowohl im grünen als auch im blauen Kanal aufweisen.
C	0 (nicht vorhanden)	1 (vorhanden)	Cluster, die Intensitäten nur im blauen Kanal aufweisen.
G	0 (nicht vorhanden)	0 (nicht vorhanden)	Cluster, die keine Intensitäten bei einer bekannten Clusterposition aufweisen.

Base	Grüner Kanal	Blauer Kanal	Ergebnis
T	1 (vorhanden)	0 (nicht vorhanden)	Cluster, die Intensitäten nur im grünen Kanal aufweisen.

Abbildung 6 Darstellung der Clusterintensitäten



i Die Farbe der einzelnen Cluster entspricht den %Base-Graphen im Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) und BaseSpace Sequence Hub Run Data by Cycle. Eine Entsprechung zum grünen und blauen Kanal ist nicht vorgesehen.

Cluster nach Filterung

Während des Laufs filtert RTA3 Rohdaten, um Reads zu entfernen, die dem Schwellenwert für Datenqualität nicht genügen. Überlappende Cluster sowie Cluster niedriger Qualität werden entfernt.

Bei der Zweikanalanalyse verwendet RTA3 ein populationsbasiertes System zum Feststellen der Reinheit (Reinheitsmessung der Intensität) eines Base-Calls. Cluster passieren Filter (PF), wenn in den ersten 25 Zyklen höchstens ein Base-Call eine Reinheit unter einem festen Schwellenwert aufweist. Wenn enthalten, wird das PhiX-Alignment im Zyklus 26 für eine Teilmenge von Platten für Cluster durchgeführt, die die Filter passiert haben. Für Cluster, die die Filter nicht passieren, erfolgt kein Base-Call und kein Alignment.

Qualitäts-Scores

Ein Qualitäts-Score (Q-Score) ist eine Prognose über die Wahrscheinlichkeit eines falschen Base-Calls. Je höher der Q-Score ist, desto höher ist die Qualität des Base-Calls und die Wahrscheinlichkeit, dass dieser korrekt ist. Nachdem der Q-Score ermittelt wurde, werden die Ergebnisse in Base-Call-Dateien (*.cbcl) gespeichert.

Der Q-Score kommuniziert kurz und bündig kleine Fehlerwahrscheinlichkeiten. Qualitäts-Scores werden als Q(X) dargestellt, wobei X der Score-Wert ist. Die folgende Tabelle zeigt die Beziehung zwischen einem 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 von 10)

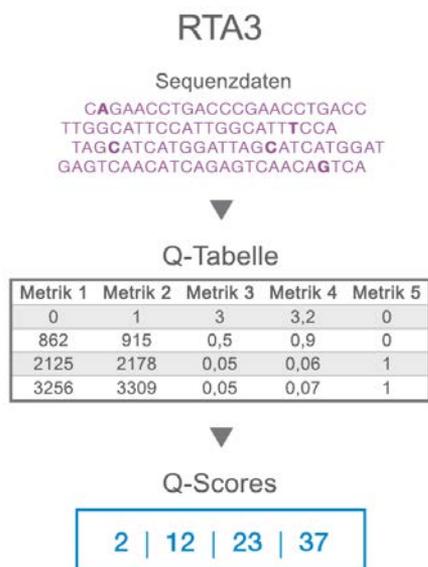
Qualitätsbewertung und Berichterstellung

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.

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

Zur Generierung der Q-Tabelle für die Sequenziersysteme NextSeq 1000 und NextSeq 2000 wurden anhand des Clusterings dieser spezifischen Prognosefunktionen drei Gruppen von Base-Calls ermittelt. Im Anschluss an die Gruppierung der Base-Calls wurde die mittlere Fehlerrate für jede der drei Gruppen empirisch berechnet und die entsprechenden Q-Scores wurden gemeinsam mit den zu den Gruppen gehörigen Prognosefunktionen in die Q-Tabelle aufgenommen. Daher sind bei RTA3 nur drei Q-Scores möglich. Diese Q-Scores entsprechen der durchschnittlichen Fehlerrate der Gruppe (**Abbildung 7**). Alles in allem ergibt sich hieraus eine vereinfachte, jedoch hochpräzise Qualitätsbewertung. Die drei Gruppen in der Qualitätstabelle stehen für Base-Calls von geringer (< Q15), mittlerer (ca. Q20) und hoher Qualität (> Q30). Ihnen sind die spezifischen Scores 12, 23 und 37 zugeordnet. Zusätzlich erhalten No-Calls den Null-Score 2. Dieses Berichterstellungsmodell für Q-Score verringert die Speicherplatz- und Bandbreitenanforderungen, ohne dabei die Genauigkeit oder die Performance zu beeinträchtigen.

Abbildung 7 Vereinfachte Qualitätsbewertung mit RTA3



Sequenzierungsausgabedateien

Dateityp	Dateibeschreibung, Speicherort und Name
Verkettete Base-Call-Dateien	<p>Jeder analysierte Cluster wird in eine Datei mit verketteten Base-Calls aufgenommen, zusammengefasst in einer Datei je Zyklus, Lane und Oberfläche. Die zusammengefasste Datei enthält den verketteten Base-Call und den codierten Qualitäts-Score für jeden Cluster. Die verketteten Base-Call-Dateien werden von BaseSpace Sequence Hub oder bcl2fastq2 verwendet.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1 L[Lane]_[Oberfläche].cbcl, z. B. L001_1.cbcl</p>
Clusterpositionsdateien	<p>Für jede Fließzelle enthält eine binäre Clusterpositionsdatei die XY-Koordinaten für jeden Cluster in einer Platte. Eine sechseckige Anordnung, die der Nanowell-Anordnung der Fließzelle entspricht, definiert die Koordinaten vor.</p> <p>Data/Intensities s_[Lane].locs</p>
Filterdateien	<p>Die Filterdatei gibt an, ob ein Cluster die Filter passiert hat. Filterdateien werden bei Zyklus 26 generiert und verwenden 25 Datenzyklen. Für jede Platte wird eine Filterdatei erstellt.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001 s_[Lane]_[Platte].filter</p>

Dateityp	Dateibeschreibung, Speicherort und Name
InterOp-Dateien	Binäre Berichtsdateien können mit der Instrument Control Software im Gerät oder in SAV oder BaseSpace Hub außerhalb des Geräts angezeigt werden. InterOp-Dateien werden während des Laufs aktualisiert. InterOp-Ordner
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

Ausgabedateien der DRAGEN-Sekundäranalyse

Die DRAGEN Bio-IT-Plattform führt mithilfe einer der folgenden Analysepipelines eine weiterführende Analyse der Sequenzierungsausgabe im Gerät durch.

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

Dieser Abschnitt enthält Informationen zu den einzelnen DRAGEN-Pipelines, einschließlich Informationen zu Ausgabedateien. Zusätzlich zur Generierung von spezifischen Dateien für die einzelnen Pipelines stellt DRAGEN Analysemetriken in einer `<Probename>.metrics.json`-Datei und die unter *illumina DRAGEN BCL Convert-Pipeline auf Seite 64* erläuterten Berichte bereit.

Erwägungen zu Ausgabedateien:

- Bei Ausführung der Pipelines Germline, RNA und Enrichment bei der Geräteanalyse werden keine BAM-Dateien auf BaseSpace Sequence Hub hochgeladen, wenn „Proactive, Run Monitoring and Storage“ (Proactive, Laufüberwachung und -speicherung) ausgewählt ist.

DRAGEN Enrichment-Pipeline

Die DRAGEN Enrichment-Pipeline unterstützt das Calling kleiner Varianten sowie das Calling struktureller Varianten. Damit ein Varianten-Calling erfolgen kann, muss eine *.bed-Datei im Probenblatt enthalten sein oder in BaseSpace Sequence Hub unter „Instrument Run Setup“ (Gerätelaufkonfiguration) angegeben werden. Nur für Paired-End-Reads und den Keimbahnmodus wird das Calling struktureller Varianten generiert.

Die Pipeline generiert die folgenden Ausgabedateien.

Komponente	Typ	Name der Ausgabedatei
Mapping/Aligning	BAM oder CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <Probenname>.bam oder • <Probenname>.cram
Calling kleiner Varianten	VCF und gVCF	<ul style="list-style-type: none"> • <Probenname>.hard-filtered.gvcf.gz • <Probenname>.hard-filtered.vcf.gz
Calling struktureller Varianten	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <Probenname>.sv.vcf.gz

DRAGEN Germline-Pipeline

Die DRAGEN Germline-Pipeline unterstützt die folgenden Funktionen:

- Calling kleiner Varianten
- Calling struktureller Varianten für Paired-End-Reads
- Calling von Kopienzahlvarianten für Humangenome
- Repeat-Expansionen für Humangenome
- Homozygotie-Regionen für Humangenome

Nur für Paired-End-Reads wird das Calling struktureller Varianten generiert.

Die Pipeline generiert die folgenden Ausgabedateien.

Komponente	Typ	Name der Ausgabedatei
Mapping/Aligning	BAM oder CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <Probenname>.bam oder • <Probenname>.cram
Calling kleiner Varianten	VCF und gVCF	<ul style="list-style-type: none"> • <Probenname>.hard-filtered.gvcf.gz • <Probenname>.hard-filtered.vcf.gz
Structural Variant Caller	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <Probenname>.sv.vcf.gz
Kopienzahlvarianten	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <Probenname>.cnv.vcf.gz
Repeat-Expansion	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <Probenname>.repeats.vcf.gz
Homozygotie-Regionen	CSV und BED	<ul style="list-style-type: none"> • <Probenname>.roh_metrics.csv • <Probenname>.roh.bed

DRAGEN RNA-Pipeline

Die DRAGEN RNA-Pipeline ermöglicht die Erkennung von Genfusionen sowie die Transkript-Quantifizierung. Geben Sie zum Generieren von Ausgabedateien im Probenblatt eine GTF-Datei an oder stellen Sie sicher, dass die Standarddatei `genes.gtf.gz` für das Referenzgenom vorhanden ist.

Die Pipeline generiert die folgenden Ausgabedateien.

Komponente	Typ	Name der Ausgabedatei	Beschreibung
Mapping/Aligning	BAM oder CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <Probenname>.bam oder <Probenname>.cram 	Alignment-Ausgabe gemäß SAM-Spezifikationen.
Erkennung von Genfusionen	Klartext	<ul style="list-style-type: none"> <Probenname>.fusion_candidates.preliminary 	<ul style="list-style-type: none"> Fusionskandidaten vor Filterung.
		<ul style="list-style-type: none"> <Probenname>.fusion_candidates.final 	<ul style="list-style-type: none"> Fusionskandidaten nach Filterung.
Transkript-Quantifizierung	Klartext	<ul style="list-style-type: none"> <Probenname>.quant.genes.sf 	<ul style="list-style-type: none"> Ergebnisse der Transkript-Quantifizierung auf Genebene.
		<ul style="list-style-type: none"> <Probenname>.quant.sf 	<ul style="list-style-type: none"> Alle Ergebnisse der Transkript-Quantifizierung.

DRAGEN Single Cell RNA-Pipeline

DRAGEN unterstützt die Zell- und die Genklassifikation. Geben Sie zum Generieren von Ausgabedateien im Probenblatt eine GTF-Datei an oder stellen Sie sicher, dass die Standarddatei `genes.gtf.gz` für das Referenzgenom vorhanden ist.

Die Pipeline generiert die folgenden Ausgabedateien.

Komponente	Typ	Name der Ausgabedatei
Mapping/Aligning	BAM oder CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <Probenname>.bam oder <Probenname>.cram
Zell-/Genklassifikation	TSV, CSV und MTX	<ul style="list-style-type: none"> <Probenname>.scRNA.barcodeSummary.tsv <Probenname>.scRNA.genes.tsv <Probenname>.scRNA.matrix.mtx
Analyseberichte	HTML	<Probenname>.dragen.scrna-report.*.html

Illumina DRAGEN BCL Convert-Pipeline

Die DRAGEN BCL Convert-Pipeline verwendet aus dem Sequenzierungslauf generierte BCL-Daten und Probenblattinformationen zur Ausgabe einer FASTQ-Datei für jede Probe. Der Name der FASTQ-Datei lautet `<Probenname>.fastq.gz`.

Die Pipeline generiert die folgenden Berichte.

Komponente	Typ	Name der Ausgabedatei
Demultiplexing	CSV	• Demultiplex_Stats.csv
Adaptermetriken	CSV	• Adapter_Metrics.csv
Index-Hopping	CSV	• Index_Hopping_Counts.csv
Häufigste unbekannte Barcodes	CSV	• Top_Unknown_Barcodes.csv

Bericht zur Demultiplexing-Statistik

Der Bericht zur Demultiplexing-Statistik enthält Informationen zur Anzahl der Reads nach Filterung, die jeder Probe im Probenblatt zugewiesen sind. Alle Reads, die sich nicht eindeutig einer Probe zuordnen lassen, werden als „undetermined“ (unbestimmt) gekennzeichnet. Außerdem enthält dieser Bericht Informationen zu den Qualitäts-Scores der Basen in den Reads nach Filterung (Passing Filter, PF), die jeder Probe zugewiesen sind.

Die folgenden Informationen sind enthalten.

Metrik	Beschreibung
Lane	Die Fließzellen-Lane der sequenzierten Probe.
SampleID	Die Proben-ID aus dem Probenblatt. Wenn der Read keiner Probe entspricht, wird im Feld <code>undetermined</code> (unbestimmt) angegeben.
Index	Die durch einen Trennstrich getrennte Verkettung von Index-Read 1 und Index-Read 2 aus dem Probenblatt. Wenn der Read keiner Probe entspricht, wird im Feld <code>undetermined</code> (unbestimmt) angegeben.
# Reads	Die Anzahl der PF-Reads für die Probe in der angegebenen Lane.
# Perfect Index Reads	Die Anzahl der Reads mit exakter Übereinstimmung mit den kombinierten im Probenblatt angegebenen Indexsequenzen.
# One Mismatch Index Read	Die Anzahl der Reads mit einem Fehler in den kombinierten im Probenblatt angegebenen Indexsequenzen.
# of \geq Q30 Bases (PF)	Die Anzahl der Basen, einschließlich Adaptern, die Reads über einem Q30-Qualitätsschwellenwert entsprechen.
Mean Quality Score (PF)	Der mittlere Qualitäts-Score der Reads für die Probe in der angegebenen Lane. Der Wert enthält Adapterbasen.

Berichte zu Adaptermetriken

Die Datei mit den Adaptermetriken enthält die Anzahl der den einzelnen Reads zugeordneten Adapter- und Probenbasen.

Die folgenden Informationen sind enthalten.

Metrik	Beschreibung
Lane	Die Fließzellen-Lane der sequenzierten Probe.
Sample_ID	Die Proben-ID aus dem Probenblatt. Wenn der Read keiner Probe entspricht, wird im Feld <code>undetermined</code> (unbestimmt) angegeben.
index	Die index1-Sequenz aus dem Probenblatt. Das Feld ist leer, wenn im Probenblatt kein Wert für „index“ angegeben wurde oder der Wert für die Proben-ID <code>undetermined</code> (unbestimmt) lautet.
index2	Die index2-Sequenz aus dem Probenblatt. Das Feld ist leer, wenn im Probenblatt kein Wert für „index2“ angegeben wurde oder der Wert für die Proben-ID <code>undetermined</code> (unbestimmt) lautet.
R1_ AdapterBases	Anzahl der Basen für AdapterRead1 im Probenblatt.
R1_ SampleBases	Anzahl der getrimmten oder maskierten Basen von Read 1 für die entsprechende Lane und die entsprechende Probe.
R2_ AdapterBases	Anzahl der Basen für AdapterRead2 im Probenblatt.
R2_ SampleBases	Anzahl der getrimmten oder maskierten Basen von Read 2 für die entsprechende Lane und die entsprechende Probe.
# Reads	Die Anzahl der Reads für die Probe in der angegebenen Lane.

Bericht zur Index-Hopping-Zählung

Der Bericht zur Index-Hopping-Zählung enthält die Anzahl der Reads für jeden erwarteten und übersprungenen Index für Läufe mit doppeltem Index. Der Bericht enthält ausschließlich eindeutige doppelte Indizes nach Lane, wenn in keinem der Indizes ein Barcode-Konflikt erkannt wird. Zur Generierung der Index-Hopping-Metriken für eine Lane muss jedes Eintragspaar aus den Indizes einen Hamming-Abstand von mindestens $2N + 1$ aufweisen, wobei N die für den Index angegebene Barcode-Nichtübereinstimmungstoleranz angibt.

Die folgenden Informationen sind enthalten.

Für Läufe ohne Index oder Läufe mit einfachem Index bzw. Lanes, die keine eindeutigen doppelten Indizes enthalten, enthält die Datei nur die Header.

Metrik	Beschreibung
Lane	Die Fließzellen-Lane der sequenzierten Probe.
# Reads	Die Anzahl der Reads für die Probe in der angegebenen Lane.

Metrik	Beschreibung
SampleID	Die Proben-ID aus dem Probenblatt. Wenn der Read keiner Probe entspricht, wird im Feld <code>undetermined</code> (unbestimmt) angegeben.
index	Die index1-Sequenz aus dem Probenblatt. Das Feld ist leer, wenn es sich um einen Single-End-Read handelt oder der Wert für die Proben-ID <code>undetermined</code> (unbestimmt) lautet.
index2	Die index2-Sequenz aus dem Probenblatt. Das Feld ist leer, wenn es sich um einen Single-End-Read handelt oder der Wert für die Proben-ID <code>undetermined</code> (unbestimmt) lautet.

Bericht zu den häufigsten unbekanntem Barcodes

Der Bericht zu den häufigsten unbekanntem Barcodes enthält die 100 häufigsten Indexeinträge oder Indexpaare je Lane, die nicht im Probenblatt gemäß der Anzahl zulässiger Nichtübereinstimmungen angegeben wurden. Wenn mehrere Indexwerte als 100. Indexeintrag angegeben werden, werden alle Indexwerte mit derselben Anzahl als 100. Eintrag ausgegeben.

Die folgenden Informationen sind enthalten:

Metrik	Beschreibung
Lane	Die Fließzellen-Lane der sequenzierten Probe.
index	Die Sequenz für jeden unbekanntem Index in Index-Read 1. Das Feld ist leer, wenn keine unbekanntem Indizes gefunden wurden.
index2	Die Sequenz für jeden unbekanntem Index in Index-Read 2. Das Feld ist leer, wenn ein Single-Read-Lauf erfolgt ist oder wenn keine unbekanntem Indizes gefunden wurden.
# Reads	Die Anzahl der Reads für die Probe in der angegebenen Lane.

Illumina DRAGEN-Qualitätssicherungsberichte

DRAGEN FastQC generiert standardmäßig für alle Pipelines Qualitätssicherungsdiagramme. Die gesammelten Ergebnisse der Qualitätssicherung werden im Ordner `AggregatedFastqcMetrics` gespeichert, die probenspezifischen Ergebnisse im Ordner `<Probename>`.

Die folgenden Qualitätssicherungsdiagramme werden bereitgestellt.

Qualitätssicherungsdiagramm	Beschreibung
adapter_content	Prozentualer Anteil der Sequenzen für jedes Basenpaar.

Qualitätssicherungsdiagramm	Beschreibung
positional_mean_quality	Durchschnittlicher Phred-skaliertes Basenqualitäts-Score für jede Read-Position.
gc_content	Prozentualer GC-Inhalt für jeden Sequenzierungs-Read.
positional_quality.read_1	Durchschnittlicher Phred-skaliertes Qualitätswert der Basen mit einem spezifischen Nukleotid an einer bestimmten Stelle in Read 1.
gc_quality	
positional_quality.read_2	Durchschnittlicher Phred-skaliertes Qualitätswert der Basen mit einem spezifischen Nukleotid an einer bestimmten Stelle in Read 2.
n_content	
read_length	Die Sequenzlänge für jeden Read.
positional_base_content.read_1	Die Anzahl der Basen für ein spezifisches Nukleotid an bestimmten Stellen in Read 1.
read_quality	Durchschnittlicher Phred-skaliertes Qualitäts-Score für jeden Sequenzierungs-Read.
positional_base_content.read_2	Die Anzahl der Basen für ein spezifisches Nukleotid an bestimmten Stellen in Read 2.

Ausgabeordnerstruktur der DRAGEN-Sekundäranalyse

DRAGEN generiert standardmäßig Ausgabedateien in dem auf der Registerkarte „Settings“ (Einstellungen) gewählten Ausgabeordner.

📁 Data

📁 AggregateFastQCPlots

- 📄 *.png
- 📄 *stderr_.txt
- 📄 *stdout_.txt
- 📄 dragen_prev_24_hrs.log
- 📄 SampleSheet.csv
- 📄 Laufeingabedateien (z. B. BED- oder GTF-Dateien)

📁 sample_name

📁 enrich_caller , germline_seq oder rna_seq

📁 sample_name

- 📄 *.png
- 📄 dragen_*.log
- 📄 sample_name.*.metrics.csv
- 📄 **[DNA]** sample_name.*.vcf.gz
- 📄 **[DNA]** sample_name.*.gvcf.gz: nicht verfügbar für die Enrichment-Pipeline der DRAGEN Bio-IT-Plattform.
- 📄 sample_name.*.bam oder sample_name.*.cram
- 📄 Logs
- 📄 **[RNA]** sample_name.fusion_candidates.filter_info
- 📄 **[RNA]** sample_name.fusion_candidates.final
- 📄 **[RNA]** sample_name.quant.genes.sf
- 📄 **[RNA]** sample_name.quant.sf
- 📄 sample_name.metrics.json
- 📄 **[scRNA]** sample_dragen-scRNA-report.*.html
- 📄 **[scRNA]** sample_name.scRNA.barcodeSummary.tsv
- 📄 sample_name.fastqc_metrics.csv
- 📄 sample_name.trimmer_metrics.csv

logs

*.txt

*.csv

fastq: Nur verfügbar, wenn KeepFastq auf „true“ festgelegt ist.

*.fastq.gz

ora_fastq: Nur verfügbar, wenn FastqCompressionFormat auf „dragen“ festgelegt ist.

*.fastq.ora

RunInstrumentAnalyticsMetrics

0001

dataset.json

0002

dataset.json

Adapter_Metrics.csv

Demultiplex_Stats.csv

Index_Hopping_Counts.csv

Reports

Demultiplex_Stats.csv

RunInfo.xml

Trim_Metrics.csv

fastq_list.csv

SampleSheet.csv

Index_Hopping_Counts.csv

Top_Unknown_Barcodes.csv

Read1InstrumentAnalyticsMetrics: nur für Paired-End-Reads.

0001

dataset.json

0002

dataset.json

Adapter_Metrics.csv

Demultiplex_Stats.csv

Index_Hopping_Counts.csv

 **Read1Metrics:** nur für Paired-End-Reads.

 Adapter_Metrics.csv

 Trim_Metrics.csv

 Index_Hopping_Counts.csv

Wartung

In diesem Abschnitt werden die erforderlichen Maßnahmen erläutert, mit denen der ordnungsgemäße Zustand des Systems gewährleistet wird. Erfahren Sie, wie Sie Software-Updates installieren, den Luftfilter austauschen und andere regelmäßige Wartungsarbeiten ausführen. Wenn die Steuerungssoftware aktuell gehalten wird, verfügt Ihr System stets über die neuesten Fehlerbehebungen sowie Funktionen und gewährleistet damit die optimale Leistung.

Freimachen von Speicherplatz auf der Festplatte

Für einen Sequenzierungslauf sind etwa 200 GB Speicherplatz auf der lokalen Festplatte erforderlich. Wenn nur noch wenig Speicherplatz verfügbar ist, wird eine Warnung angezeigt. Führen Sie die folgenden Schritte aus, um Speicherplatz freizugeben, indem Sie abgeschlossene Läufe und installierte Referenzgenome löschen.

 | Löschen Sie Läufe ausschließlich mithilfe der NextSeq 1000/2000 Control Software und nicht manuell über das Betriebssystem. Das manuelle Löschen von Läufen kann die Steuerungssoftware beeinträchtigen.

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Disk Management** (Datenträgermanagement).
Der Bildschirm „Disk Management“ (Datenträgermanagement) wird geöffnet. Er enthält eine Liste mit den auf der lokalen Festplatte gespeicherten Läufen und Referenzgenomen.
2. Wählen Sie für den Lauf, den Sie löschen möchten, die Option **Delete Run** (Lauf löschen).
Beim Löschen eines Laufs wird der lokale Laufordner gelöscht. Der Ausgabeordner, eine Kopie des Laufordners, bleibt erhalten.
3. Wählen Sie im Dialogfeld **Yes, Delete Run** (Ja, Lauf löschen), um das Löschen des Laufs zu bestätigen.
4. Wiederholen Sie Schritt 2 und Schritt 3 für jeden Lauf, den Sie löschen möchten.
5. Wählen Sie für das Genom, das Sie löschen möchten, die Option **Delete Genome** (Genom löschen).
6. Wählen Sie im Dialogfeld **Yes, Delete Genome** (Ja, Genom löschen).
7. Wiederholen Sie Schritt 5 und 6 für alle Genome, die Sie löschen möchten.
8. Wenn Sie fertig sind, schließen Sie „Disk Management“ (Datenträgermanagement), um zum Startbildschirm zurückzukehren.

Software-Updates

Durch die Aktualisierung der Software ist gewährleistet, dass das System über alle aktuellen Funktionen und Problembehebungen verfügt. Software-Updates werden zu einer System-Suite mit folgender Software zusammengefasst:

- NextSeq 1000/2000 Control Software
- NextSeq 1000/2000-Rezepturen
- Universal Copy Service
- Real-Time Analysis

i | DRAGEN-Module sind in der System-Suite nicht enthalten. Installieren Sie diese ggf. separat. Die DRAGEN-Module stehen Ihnen über die Supportseiten zur Verfügung.

Das System ist für das automatische oder manuelle Herunterladen von Software-Updates konfiguriert:

- **Automatische Updates:** Updates werden automatisch von BaseSpace Sequence Hub für die Installation heruntergeladen. Für diese Option ist eine Internetverbindung, jedoch kein BaseSpace Sequence Hub-Konto erforderlich.
- **Manuelle Updates:** Updates werden manuell aus dem Internet heruntergeladen, lokal oder auf einem tragbaren Laufwerk gespeichert und von diesem Speicherort aus installiert. Für diese Option ist keine Internetverbindung für das Gerät erforderlich.

Installieren eines automatischen Software-Updates

1. Melden Sie sich beim Konto „ilmnadmin“ an.
2. Stellen Sie sicher, dass derzeit weder ein Sequenzierungslauf noch eine Sekundäranalyse im Gerät durchgeführt wird.
3. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Software Update** (Software-Update) aus. Für automatische Updates konfigurierte Systeme zeigen einen Hinweis an, sobald ein Software-Update verfügbar ist.
4. Wählen Sie zur Überprüfung, ob ein Update vorhanden ist, **Check Online for Software Update** (Online nach Software-Update suchen).
5. Wählen Sie **Update Now** (Jetzt aktualisieren) aus, um die neue Software-Version herunterzuladen. Nach Abschluss des Downloads wird die Steuerungssoftware geschlossen und der Installationsassistent wird angezeigt.
Die Steuerungssoftware wird automatisch neu gestartet. Alle Firmware-Updates werden nach dem Neustart automatisch ausgeführt.

i | Wenn Sie ein Update vor Abschluss der Installation abbrechen, wird das Update an der aktuellen Stelle gestoppt. Alle bis zum Abbruch durchgeführten Änderungen werden auf die vorherige Version zurückgesetzt oder nicht installiert.

Installieren eines manuellen Software-Updates

1. Melden Sie sich beim Konto „ilmnadmin“ an.
2. Stellen Sie sicher, dass derzeit weder ein Sequenzierungslauf noch eine Sekundäranalyse im Gerät durchgeführt wird.
3. Wenn ein Software-Update verfügbar ist, laden Sie das Installationsprogramm für die Suite (*.tar.gz) von der [Supportseite für die Sequenziersysteme NextSeq 1000 und NextSeq 2000](#) herunter. Speichern Sie das Installationsprogramm auf einem lokalen oder tragbaren Laufwerk.
4. Wenn Sie das Installationsprogramm auf einem tragbaren Laufwerk gespeichert haben, schließen Sie das Laufwerk an einen der USB 3.0-Anschlüsse auf der Seite oder auf der Rückseite des Geräts an.
5. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Software Update** (Software-Update) aus.
6. Wählen Sie **Choose...** (Auswählen ...), um zum Installationsprogramm zu navigieren.
7. Wählen Sie **Update Now** (Jetzt aktualisieren), um die Installation zu starten.

Die Steuerungssoftware gibt während der Installation an, dass keine anderen Vorgänge durchgeführt werden können.

Die Steuerungssoftware wird automatisch neu gestartet. Alle Firmware-Updates werden nach dem Neustart automatisch ausgeführt.



Wenn Sie ein Update vor Abschluss der Installation abbrechen, wird das Update an der aktuellen Stelle gestoppt. Alle bis zum Abbruch durchgeführten Änderungen werden auf die vorherige Version zurückgesetzt oder nicht installiert.

Pipeline- und Lizenz-Updates für DRAGEN

Nur Systemadministratoren können DRAGEN-Pipelines aktualisieren und die DRAGEN-Lizenz verlängern.

Verlängern der DRAGEN-Lizenz online

Aktualisieren Sie die Lizenz für die DRAGEN Bio-IT-Plattform wie folgt, wenn die Sequenziersysteme NextSeq 1000 und NextSeq 2000 über eine Internetverbindung verfügen.

1. Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina, um einen neuen Lizenzschlüssel zu beantragen.
2. Warten Sie 24 Stunden, bis die Lizenz automatisch aktualisiert wurde, oder aktualisieren Sie die Lizenz unmittelbar, wie im Folgenden beschrieben.
 - a. Wählen Sie das Menü der Steuerungssoftware und dann **DRAGEN**.
 - b. Wählen Sie **Check Online** (Online prüfen), um zu prüfen, ob ein neuer DRAGEN-Lizenzschlüssel verfügbar ist.
 - c. Wählen Sie **Update** (Aktualisieren), wenn ein Lizenzschlüssel verfügbar ist.

Verlängern der DRAGEN-Lizenz offline

Aktualisieren Sie die Lizenz für die DRAGEN Bio-IT-Plattform wie folgt, wenn die Sequenziersysteme NextSeq 1000 und NextSeq 2000 nicht über eine Internetverbindung verfügen.

1. Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina, um einen neuen Lizenzschlüssel zu beantragen. Speichern Sie die Datei `license.zip` auf einem lokalen oder tragbaren Laufwerk.
2. Wenn Sie die ZIP-Datei auf einem tragbaren Laufwerk gespeichert haben, schließen Sie das Laufwerk an einen der USB 3.0-Anschlüsse auf der Seite oder auf der Rückseite des Geräts an. Bewegen Sie das Gerät ggf. vorsichtig, um die Anschlüsse auf der Rückseite zu erreichen.
3. Wählen Sie das Menü der Steuerungssoftware und dann **DRAGEN**.
4. Wählen Sie **Choose** (Auswählen), um zu der ZIP-Datei zu navigieren, und wählen Sie dann **Open** (Öffnen).

Installieren von Pipeline-Updates

1. Wenn ein Pipeline-Update verfügbar ist, laden Sie das Installationsprogramm (*.tar.gz) von der [DRAGEN-Supportseite](#) herunter. Speichern Sie das Installationsprogramm auf einem lokalen oder tragbaren Laufwerk.
2. Wenn Sie das Installationsprogramm auf einem tragbaren Laufwerk gespeichert haben, schließen Sie das Laufwerk an einen der USB 3.0-Anschlüsse auf der Seite oder auf der Rückseite des Geräts an. Bewegen Sie das Gerät ggf. vorsichtig, um die Anschlüsse auf der Rückseite zu erreichen.
3. Wählen Sie das Menü der Steuerungssoftware und dann **Process Management** (Prozessmanagement).
4. Stellen Sie sicher, dass derzeit weder ein Sequenzierungslauf noch eine Sekundäranalyse im Gerät durchgeführt wird.
5. Wählen Sie das Menü der Steuerungssoftware und dann **DRAGEN**.
6. Wählen Sie unter „Version“ die Option **Browse for New Version** (Neue Version suchen), um zum Installationsprogramm zu navigieren.
7. Wählen Sie **Install** (Installieren), um die Installation zu starten.
8. Geben Sie als Systemkennwort „ilmnadmin“ ein und wählen Sie dann **Authenticate** (Authentifizieren).

Austauschen des Luftfilters

Gehen Sie folgendermaßen vor, um alle sechs Monate den abgelaufenen Luftfilter zu ersetzen.

Der Luftfilter ist eine rechteckige Einwegkartusche, die den Lüfter auf der rechten Seite des Geräts abdeckt. Dies sorgt für die erforderliche Kühlung und verhindert, dass Fremdkörper in das System eindringen. Das Gerät wird mit einem eingebauten und einem Ersatzluftfilter geliefert. Zusätzliche Ersatzteile sind in einem gültigen Gerätewartungsvertrag enthalten oder können bei Illumina erworben werden.

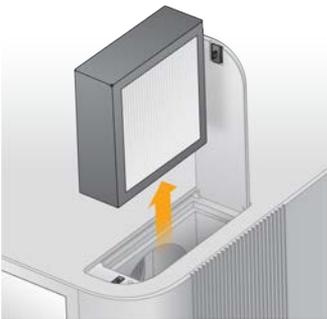
1. Drücken Sie, wie in der folgenden Abbildung dargestellt, auf die rechte Seite der oberen Abdeckung auf der Oberseite des Geräts, um sie zu entriegeln.



2. Öffnen Sie die Abdeckung.



3. Entriegeln Sie die Luftfilterkartusche, die sich in der Mitte der Abdeckung befindet, indem Sie auf die Kartusche drücken. Entfernen und entsorgen Sie anschließend die Kartusche.



4. Setzen Sie einen neuen Luftfilter in die Aufnahme ein. Drücken Sie auf den Luftfilter, bis dieser einrastet.

5. Schließen Sie die obere Abdeckung. Drücken Sie anschließend auf die Abdeckung, bis diese einrastet.



6. Stellen Sie das Gerät wieder an seinen ursprünglichen Standort.

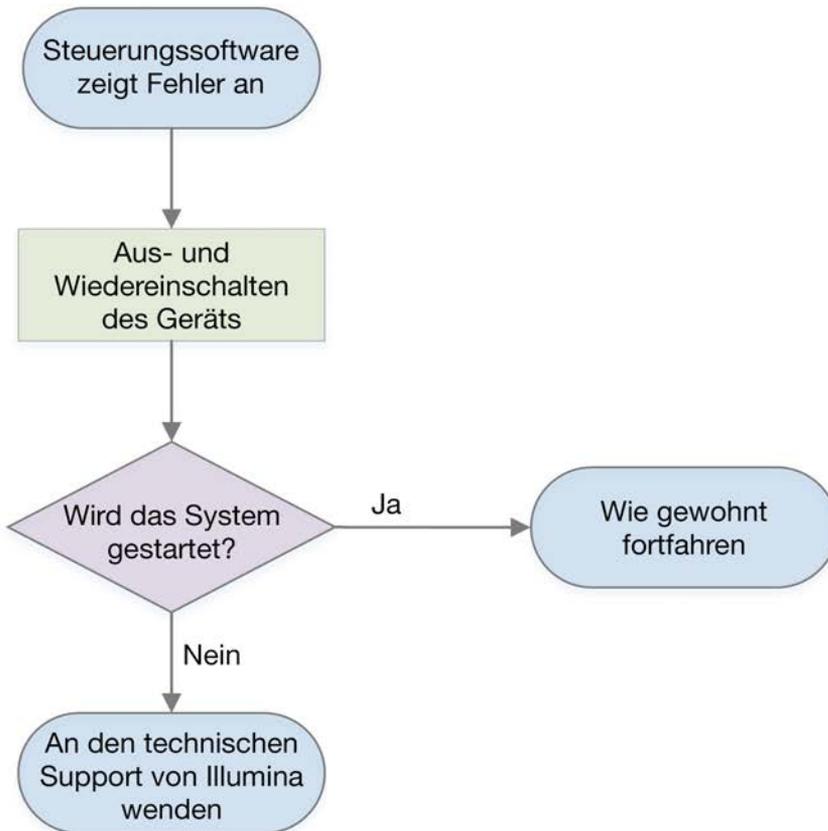
Fehlerbehebung

Dieser Abschnitt enthält ausführliche Informationen zum Abbrechen eines Laufs, zum Aus- und Wiedereinschalten des Geräts sowie zu weiteren Fehlerbehebungsverfahren.

Beheben von Fehlermeldungen

In diesem Anhang finden Sie detaillierte Anweisungen zur Problembehebung. Das folgende Ablaufdiagramm enthält eine Übersicht zur Problembehebung bei Fehlermeldungen, die während der Initialisierung, der Laufkonfiguration oder der Sequenzierung angezeigt werden und sich durch eine Wiederholung nicht beheben lassen.

Viele Fehler lassen sich durch Aus- und Wiedereinschalten beheben: Schalten Sie das Gerät aus und starten Sie es neu.



Erneutes Lagern von Verbrauchsmaterialien

Lagern Sie aufgetaute Kartuschen und Fließzellen im Fall eines Gerätefehlers beim Selbsttest vor dem Fluidiktest gemäß den folgenden Anweisungen.

1. Trennen Sie die Fließzelle von der Kartusche.
 2. Entfernen Sie die verdünnte Bibliothek aus dem Behälter (bis ca. 18 µl) und entsorgen Sie diese.
-  Bereiten Sie eine neue Verdünnung derselben Bibliothek für den nächsten Lauf vor, um eine Kreuzkontaminierung mit Bibliotheksresten im Behälter zu verhindern.
3. Platzieren Sie die Kartusche bei einer Lagertemperatur von 2 °C bis 8 °C mit dem Etikett nach oben und so, dass Luft an allen Seiten zirkulieren kann.
Diese Lagerung darf 72 Stunden nicht überschreiten. Wenn die Kartusche 12 Stunden lang über Nacht aufgetaut wurde, dürfen 60 Stunden nicht überschritten werden.
 4. Verpacken Sie die Fließzelle in der Originalverpackung aus Silberfolie mit dem Trocknungsmittel.
 5. Verschließen Sie die Folienverpackung mit Klebeband und lagern Sie diese bei 2 °C bis 8 °C.
Diese Lagerung darf 72 Stunden nicht überschreiten.

Abbrechen eines Laufs

1. Wählen Sie **End Run** (Lauf beenden).
2. Aktivieren Sie zur automatischen Entsorgung der Reagenzienkartusche das Kontrollkästchen **Purge Reagent Cartridge** (Reagenzienkartusche leeren).
Die Standardauswahl wird in den Einstellungen der NextSeq 1000/2000 Control Software festgelegt.
3. Wählen Sie **Yes, end the sequencing run** (Ja, Sequenzierungslauf beenden).
Das Abbrechen eines Laufs kann nicht rückgängig gemacht werden. Die Software kann den Lauf nicht fortsetzen und die Verbrauchsmaterialien können nicht wiederverwendet werden, wenn die Selbsttests bereits durchgeführt wurden.
4. Wählen Sie **Eject Cartridge** (Kartusche auswerfen), um die Blende zu öffnen und den Träger auszuwerfen.
5. Nehmen Sie die Kartusche aus dem Träger heraus.
6. Lagern oder entsorgen Sie die Kartusche, je nachdem, zu welchem Zeitpunkt der Abbruch durchgeführt wurde:

Situation	Instanz
Sie haben den Lauf vor oder während des Selbsttests abgebrochen und möchten die Verbrauchsmaterialien wiederverwenden.	Siehe <i>Erneutes Lagern von Verbrauchsmaterialien auf Seite 79</i> .
Alle anderen Situationen.	Siehe <i>Entladen von Verbrauchsmaterialien auf Seite 52</i> .

- Wählen Sie **Close Door** (Klappe schließen), um den Träger wieder zu laden und zum Startbildschirm zurückzukehren.

Sensoren bestätigen das Entfernen der Kartusche.

Erneutes Stellen eines Laufs in die Warteschlange

Wenn unter „Process Management“ (Prozessmanagement) für „Status of Secondary Analysis“ (Status der Sekundäranalyse) ein Fehler angezeigt wird, können Sie den Lauf erneut in die Warteschlange stellen, um im Gerät mit den generierten cBCL-Dateien eine DRAGEN-Analyse durchzuführen. Damit der Lauf erneut in die Warteschlange gestellt werden kann, muss der ursprüngliche Laufordner auf dem Gerät vorhanden sein. Bei diesem erneuten Stellen in die Warteschlange werden keine Läufe in BaseSpace Sequence Hub erneut in die Warteschlange gestellt. Informationen zum erneuten Stellen in die Warteschlange in BaseSpace Sequence Hub finden Sie unter „Fix Sample Sheet“ (Probenblatt korrigieren) im Hilfecenter zu BaseSpace Sequence Hub.

- Aktualisieren Sie Ihr Probenblatt der Version 2 und speichern Sie das Probenblatt auf einem tragbaren Laufwerk oder einem gemounteten Netzwerklaufwerk.
- Wenn Sie das Probenblatt auf einem tragbaren Laufwerk gespeichert haben, schließen Sie das Laufwerk an einen der USB 3.0-Anschlüsse auf der Seite oder auf der Rückseite des Geräts an. Bewegen Sie das Gerät ggf. vorsichtig, um die Anschlüsse auf der Rückseite zu erreichen.
- Wählen Sie das Menü der Steuerungssoftware und dann **Process Management** (Prozessmanagement).
- Stellen Sie sicher, dass derzeit weder ein Sequenzierungslauf noch eine Sekundäranalyse im Gerät durchgeführt wird.
- Wählen Sie neben dem abgeschlossenen Lauf, der erneut in die Warteschlange gestellt werden soll, die Option **Requeue** (Erneut in die Warteschlange stellen) aus.
- Wählen Sie **Choose** (Auswählen), um zum aktualisierten Probenblatt zu navigieren, und wählen Sie dann **Open** (Öffnen).
- Wählen Sie **Start Requeue** (Erneutes Stellen in die Warteschlange starten).

Aus- und Wiedereinschalten des Geräts

Beim Aus- und Wiedereinschalten des Geräts wird das System sicher heruntergefahren und neu gestartet, um eine verlorene Verbindung wiederherzustellen, eine Spezifikation anzupassen oder einen Initialisierungsfehler zu beheben. Die Softwaremeldungen geben an, in welchen Fällen das Gerät zum Beheben eines Fehlers oder einer Warnung aus- und wieder eingeschaltet werden muss.

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **Shut Down Instrument** (Gerät ausschalten).
2. Wenn sich das System nicht abschaltet, halten Sie die Ein/Aus-Taste auf der rechten Seite des Geräts gedrückt, bis die Lichter erlöschen.
3. Wenn die Ein/Aus-Taste pulsiert, drücken Sie auf die „Aus“-Seite (O) des Kippschalters auf der Rückseite.

Die Ein/Aus-Taste kann nach dem Ausschalten des Geräts weiterhin pulsieren.

Abbildung 8 Position des Kippschalters



4. Warten Sie 30 Sekunden.
5. Drücken Sie auf die „Ein“-Seite (I) des Kippschalters.
6. Wenn die Ein/Aus-Taste pulsiert, drücken Sie sie.

Abbildung 9 Position der Ein/Aus-Taste



7. Warten Sie ca. fünf Minuten, bis das Betriebssystem geladen wurde. Wenn das Betriebssystem geladen ist, melden Sie sich beim System an.
Die Steuerungssoftware wird gestartet und initialisiert das System. Warten Sie ca. fünf Minuten, bis das System initialisiert wurde. Nach Abschluss der Initialisierung wird der Startbildschirm angezeigt.

Durchführen einer 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 Fehlerbehebungszwecken eine Systemprüfung durchzuführen.

Die vier Subsystemtests benötigen etwa 58 Minuten zur Prüfung auf Selbsttestfehler und andere Probleme. Anhand der Tests wird bestätigt, dass die Komponenten ordnungsgemäß ausgerichtet sind und funktionieren.

Die Testergebnisse werden im Ordner `system-check` unter `/usr/local/illumina/system-check` ausgegeben.

Durchführung einer Systemprüfung

1. Wählen Sie im Menü der Steuerungssoftware die Option **System Checks** (Systemprüfungen).
2. Aktivieren Sie das Kontrollkästchen für die gewünschten der folgenden Systemprüfungen:
 - **Network Connectivity** (Netzwerkverbindung): Prüft den Status und die Leistung der Netzwerkverbindung.
 - **Enclosure** (Gehäuse): Prüft die Funktion des thermischen Systems und des Hubmechanismus der Blende.
 - **Motion** (Bewegung): Prüft die Bewegungsgrenzen und die Leistung des z- und des xy-Tisches.
 - **Optics** (Optik): Prüft die Funktion des Bildmoduls.
3. Wählen Sie **Start** (Starten).

Wiederherstellen der Werkseinstellungen

Setzen Sie das System auf die Werkseinstellungen zurück, um ein Downgrade der Software durchzuführen oder das System nach einer unerwünschten Konfiguration wiederherzustellen. Diese Funktion darf nur von einem Illumina-Mitarbeiter verwendet werden.

Speichern eines Systemimages

Durch Speichern eines Systemimages lässt sich eine funktionierende Softwareinstallation sichern. Dieses Systemimage kann zu einem späteren Zeitpunkt wiederhergestellt werden. Es wird empfohlen, das Systemimage unmittelbar im Anschluss an die Erstinstallation und das Ändern des Kennworts durch einen Illumina-Mitarbeiter zu speichern.

1. Starten Sie Linux neu.
2. Wählen Sie, wenn Sie zur Auswahl eines Betriebssystems aufgefordert werden, **Capture Installed Image** (Systemimage speichern).

Die Betriebssystemoptionen werden kurz angezeigt, bevor automatisch die NextSeq 1000/2000 Control Software gestartet wird.

i | Da nur ein Image gespeichert werden kann, wird hierdurch ein zuvor gespeichertes Image überschrieben.

3. Warten Sie ca. 30 Minuten, bis das System das Image des derzeit installierten Systems gespeichert hat.

Während der Speicherung erfolgen u. U. mehrere Neustarts. Nach Abschluss des Vorgangs startet das System mit dem Image des derzeit installierten Systems im Speicher neu.

Wiederherstellen eines gespeicherten Images

Unerwünschte Konfigurationen lassen sich durch Wiederherstellen eines zuvor gespeicherten Systemimages beseitigen.

1. Starten Sie Linux neu.
2. Wählen Sie **Restore Installed Image** (Systemimage wiederherstellen), wenn Sie zur Auswahl eines Betriebssystems aufgefordert werden.

Die Betriebssystemoptionen werden kurz angezeigt, bevor automatisch die NextSeq 1000/2000 Control Software gestartet wird.

i | Für Systemimages ist das entsprechende Kennwort erforderlich. Melden Sie sich nach der Wiederherstellung mit dem Kennwort für das Image beim System an.

3. Warten Sie etwa 30 Minuten, bis die Wiederherstellung abgeschlossen ist.

Die Wiederherstellung kann mehrere Neustarts beinhalten. Nach Abschluss des Vorgangs startet das System mit dem aus dem Image wiederhergestellten System neu.

Quellen und Verweise

Einstellungen für Probenblätter der Version 2

Im Local-Modus können Sie ein Probenblatt im Dateiformat Version 2 für die Konfiguration der Laufeinstellungen verwenden. Erstellen Sie unter „Instrument Run Setup“ (Gerätelaufkonfiguration) ein Probenblatt oder bearbeiten Sie die Datei *NextSeq 1000 and NextSeq 2000 Sequencing Systems Sample Sheet v2 Template*. Stellen Sie beim Bearbeiten des Probenblatts sicher, dass die folgenden Abschnitte und Felder in der aufgeführten Reihenfolge enthalten sind und die Anforderungen erfüllen. Übertragen Sie nach der Bearbeitung das Probenblatt mithilfe eines tragbaren Laufwerks oder eines gemounteten Netzwerklaufwerks auf die Sequenziersysteme NextSeq 1000 und NextSeq 2000. Wenn Sie in der Steuerungssoftware zum Probenblatt navigieren, wird dieses in einen Vorabordner für den Lauf auf dem Gerät kopiert, sodass das tragbare Laufwerk entfernt werden kann.

Wenn Sie DRAGEN verwenden, müssen Sie zusätzliche Einstellungen konfigurieren. Weitere Informationen finden Sie unter [Einstellungen für DRAGEN-Probenblätter auf Seite 88](#)

Laden Sie die Vorlage für das Probenblatt der Version 2 herunter, die unter „Product Files“ (Produktdateien) auf der Supportseite für die Sequenziersysteme NextSeq 1000 und NextSeq 2000 zur Verfügung steht. Wenn Sie ein Probenblatt mit der Option „Instrument Run Setup“ (Gerätelaufkonfiguration) erstellt haben, können Änderungen am Probenblatt im Anschluss an den ursprünglichen Download zum Fehlschlagen der Analyse führen.

Dateinamen dürfen keine Sonderzeichen enthalten.

[Header] – Anforderungen

Der Abschnitt [Header] enthält allgemeine Angaben zum Lauf. Im Folgenden finden Sie die verfügbaren Felder für [Header] und die entsprechenden Beschreibungen.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
FileFormatVersion	Ja	Die Probenblattversion. Geben Sie als Wert „2“ ein.
RunName	Nein	Geben Sie einen eindeutigen Namen ein. RunName kann alphanumerische Zeichen, Unterstriche, Bindestriche und Punkte enthalten. Wenn RunName Leer- oder Sonderzeichen enthält, schlägt die Analyse fehl.
RunDescription	Nein	Beschreibung des Laufs.
InstrumentPlatform	Nein	NextSeq 1000/2000

Feld	Erforderlich	Beschreibung
InstrumentType	Nein	NextSeq 1000/2000

[Reads] – Anforderungen

Der Abschnitt [Reads] gibt die Anzahl der Zyklen für Genomik sowie Index-Read 1 und 2 an. Im Folgenden finden Sie die verfügbaren Felder für [Reads] und die entsprechenden Beschreibungen.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
Read1Cycles	Ja	Anzahl der Zyklen im ersten Read. Beim Wert muss es sich um eine Ganzzahl größer als null handeln.
Read2Cycles	Nein	Anzahl der Zyklen im zweiten Read.
Index1Cycles	Nein	Anzahl der Zyklen im ersten Index-Read. Erforderlich, wenn mehr als eine Probe sequenziert wird. Max. 10 Zyklen.
Index2Cycles	Nein	Anzahl der Zyklen im zweiten Index-Read. Max. 10 Zyklen.

BCL-Konvertierung – Anforderungen

Die Abschnitte zur BCL-Konvertierung enthalten Informationen zum Konvertieren Ihrer Daten von BCL zu FASTQ. Die Optionen für die BCL-Konvertierung umfassen zwei separate Abschnitte: [BCLConvert_Settings] und [BCLConvert_Data]. In die Abschnitte zur BCL-Konvertierung müssen Angaben zu Indexadaptersequenzen eingefügt werden. Informationen zur Ermittlung der passenden Adaptersequenz für die einzelnen Reads und Läufe finden Sie unter *Illumina-Adaptersequenzen* (Dokument-Nr. 1000000002694).

Im Folgenden finden Sie die verfügbaren Felder für [BCLConvert_Settings] und die entsprechenden Beschreibungen.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
SoftwareVersion	Ja	Die Version der auf dem System installierten DRAGEN-Software. Verwenden Sie alle drei Ganzzahlen aus der Versionsbezeichnung. Beispiel: 3.5.7.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
BarcodeMismatchesIndex1	Nein	Die Anzahl der zulässigen Nichtübereinstimmungen zwischen dem ersten Index-Read und der Indexsequenz. Zulässige Werte sind 0, 1 oder 2. Der Standardwert ist 1.
BarcodeMismatchesIndex2	Nein	Die Anzahl der zulässigen Nichtübereinstimmungen zwischen dem zweiten Index-Read und der Indexsequenz. Zulässige Werte sind 0, 1 oder 2. Der Standardwert ist 1.
FastqCompressionFormat	Nein	Geben Sie zur Ausgabe von FASTQ-Dateien im GZ-Format <code>gzip</code> ein. Geben Sie zum Speichern von FASTQ-Dateien im ORA-Format und um diese mit DRAGEN zu entpacken <code>dragen</code> ein.
AdapterRead1	Nein	Die Sequenz für das Trimming bzw. die Maskierung vom Ende von Read 1. Read 1-Adaptersequenz mit A, C, G oder T. AdapterRead1 trimmt Zyklen standardmäßig.
AdapterRead2	Nein	Die Sequenz für das Trimming bzw. die Maskierung vom Ende von Read 2. Read 2-Adaptersequenz mit A, C, G oder T. AdapterRead2 trimmt Zyklen standardmäßig.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
OverrideCycles	Nein	<p>Zeichenfolge zur Angabe der UMI-Zyklen und zum Ausschluss von Zyklen aus einem Read. Folgende Werte sind zulässig:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N: Gibt die zu ignorierenden Zyklen an. • Y: Gibt die Sequenzierungszyklen an. • I: Gibt die Indexzyklen an. • U: Gibt die zu trimmenden UMI-Zyklen an. <p>Die einzelnen Elemente werden mit Semikola getrennt. Im Folgenden finden Sie Beispiele für OverrideCycles-Eingaben.</p> <pre>U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66</pre>

Im Folgenden finden Sie die verfügbaren Felder für [BCLConvert_Data] und die entsprechenden Beschreibungen.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
Sample_ID	Ja	Die ID der Probe. Die Proben-ID kann aus bis zu 20 alphanumerischen Zeichen, Bindestrichen und Unterstrichen bestehen. Bei der ID wird zwischen Groß- und Kleinschreibung unterschieden. Trennen Sie ID-Elemente mit einem Binde- oder Unterstrich. Beispiel: Probe1-DQB1-022515.
Index	Nein	Die zur Probe gehörige Indexsequenz. Nur A, C, T und G sind zulässig. Erforderlich, wenn mehr als eine Probe sequenziert wird.
Index2	Nein	Die zur Probe gehörige zweite Indexsequenz. Nur A, C, T und G sind zulässig. Stellen Sie sicher, dass die Adaptersequenzen für den zweiten Index (i5) in Vorwärtsrichtung vorliegen. DRAGEN kehrt komplementäre i5-Indizes während der Sekundäranalyse automatisch um.
Lane	Nein	Die Lane der Fließzelle. Lanes werden als einzelne Ganzzahl angegeben.

Einstellungen für DRAGEN-Probenblätter

Dieser Abschnitt erläutert die Anforderungen an Probenblätter für die einzelnen DRAGEN-Pipelines. Fügen Sie die Einstellungen für die DRAGEN-Pipeline als letzten Abschnitt zu Ihrem Probenblatt hinzu. Sie können nur eine DRAGEN-Pipeline verwenden.

Jede DRAGEN-Pipeline enthält getrennte Abschnitte für Einstellungen und Daten.

Anforderungen für die DRAGEN Germline-Pipeline

Folgende Felder und Beschreibungen für [DragenGermline_Settings] sind verfügbar.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
SoftwareVersion	Ja	Die Version der auf dem System installierten DRAGEN-Software. Verwenden Sie alle drei Ganzzahlen aus der Versionsbezeichnung. Beispiel: 3.5.7. Die Softwareversion muss mit der im Abschnitt „BCLConvert_Settings“ angegebenen Version übereinstimmen.
ReferenceGenomeDir	Ja	Der Name des Referenzgenoms. Beispiel: hg19_alt_aware. Verwenden Sie den Namen des Referenzgenoms unter <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Weitere Informationen zur Verwendung eines anwendungsspezifischen Referenzgenoms finden Sie in der <i>Onlinehilfe zur App Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
MapAlignOutFormat	Nein	Das Format der Ausgabedatei. Zulässige Werte sind „bam“ und „cram“. Wenn kein Wert angegeben wurde, ist der Standardwert „none“ (keines).
KeepFastq	Nein	Geben Sie <code>true</code> ein, um FASTQ-Ausgabedateien zu speichern. Geben Sie <code>false</code> ein, um FASTQ-Ausgabedateien zu entfernen.

Folgende Felder und Beschreibungen für [DragenGermline_Data] sind verfügbar.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
Sample_ID	Ja	Die ID der Probe. Die Proben-ID kann aus bis zu 20 alphanumerischen Zeichen bestehen. Bei der ID wird zwischen Groß- und Kleinschreibung unterschieden. Trennen Sie ID-Elemente mit einem Bindestrich. Beispiel: Probe1-DQB1-022515. Die Proben-IDs müssen mit den im Abschnitt „BCLConvert_Data“ angegebenen IDs übereinstimmen.

Anforderungen für die DRAGEN RNA-Pipeline

Folgende Felder und Beschreibungen für [DragenRNA_Settings] sind verfügbar.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
SoftwareVersion	Ja	Die Version der auf dem System installierten DRAGEN-Software. Verwenden Sie alle drei Ganzzahlen aus der Versionsbezeichnung. Beispiel: 3.5.7. Die Softwareversion muss mit der im Abschnitt „BCLConvert_Settings“ angegebenen Version übereinstimmen.
ReferenceGenomeDir	Ja	Der Name des Referenzgenoms. Beispiel: hg38_noalt_with_decoy. Verwenden Sie den Namen des Referenzgenoms unter <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Weitere Informationen zur Verwendung eines anwendungsspezifischen Referenzgenoms finden Sie in der <i>Onlinehilfe zur App Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
RnaGeneAnnotationFile	Nein	Die Datei mit RNA-Gen-Annotationen. Nur alphanumerische Zeichen sind zulässig. Wird kein Wert angegeben, wird die Standard-Annotation des angegebenen Referenzgenoms verwendet.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
MapAlignOutFormat	Nein	Das Format der Ausgabedatei. Zulässige Werte sind „bam“ und „cram“. Wenn kein Wert angegeben wurde, ist der Standardwert „none“ (keines).
KeepFastq	Nein	Geben Sie <code>true</code> ein, um FASTQ-Ausgabedateien zu speichern. Geben Sie <code>false</code> ein, um FASTQ-Ausgabedateien zu entfernen.

Folgende Felder und Beschreibungen für [DragenRna_Data] sind verfügbar.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
Sample_ID	Ja	Die ID der Probe. Die Proben-ID kann aus bis zu 20 alphanumerischen Zeichen bestehen. Bei der ID wird zwischen Groß- und Kleinschreibung unterschieden. Trennen Sie ID-Elemente mit einem Bindestrich. Beispiel: Probe1-DQB1-022515. Die Proben-IDs müssen mit den im Abschnitt „BCLConvert_Data“ angegebenen IDs übereinstimmen.

Anforderungen für die DRAGEN Enrichment-Pipeline

Folgende Felder und Beschreibungen für [DragenEnrichment_Settings] sind verfügbar.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
SoftwareVersion	Ja	Die Version der auf dem System installierten DRAGEN-Software. Verwenden Sie alle drei Ganzzahlen aus der Versionsbezeichnung. Beispiel: 3.5.7. Die Softwareversion muss mit der im Abschnitt „BCLConvert_Settings“ angegebenen Version übereinstimmen.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
ReferenceGenomeDir	Ja	Der Name des Referenzgenoms. Beispiel: hg38_alt_aware. Referenzgenome befinden sich unter <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Weitere Informationen zur Verwendung eines anwendungsspezifischen Referenzgenoms finden Sie in der <i>Onlinehilfe zur App Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
BedFile	Ja	Die BED-Datei mit den Zielregionen.
GermlineOrSomatic	Ja	Geben Sie <code>germline</code> ein, um die Anreicherungsanalyse „Keimbahn“ durchzuführen. Geben Sie <code>somatic</code> ein, um die Anreicherungsanalyse „Somatisch“ durchzuführen.
KeepFastq	Nein	Geben Sie <code>true</code> ein, um FASTQ-Ausgabedateien zu speichern. Geben Sie <code>false</code> ein, um FASTQ-Ausgabedateien zu entfernen.
MapAlignOutFormat	Nein	Das Format der Ausgabedatei. Zulässige Werte sind „bam“ und „cram“. Wenn kein Wert angegeben wurde, ist der Standardwert „none“ (keines).

Folgende Felder und Beschreibungen für [DragenEnrichment_Data] sind verfügbar.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
Sample_ID	Ja	Die ID der Probe. Die Proben-ID kann aus bis zu 20 alphanumerischen Zeichen bestehen. Bei der ID wird zwischen Groß- und Kleinschreibung unterschieden. Trennen Sie ID-Elemente mit einem Bindestrich. Beispiel: Probe1-DQB1-022515. Die Proben-IDs müssen mit den im Abschnitt „BCLConvert_Data“ angegebenen IDs übereinstimmen.

Anforderungen für die DRAGEN Single Cell RNA-Pipeline

Folgende Felder und Beschreibungen für [DragenSingleCellRNA_Settings] sind verfügbar. Informationen zur Kompatibilität von Drittanbieterkits finden Sie auf der Supportseite „Product Compatibility“ (Produktkompatibilität) zur DRAGEN Bio-IT-Plattform.

Single Cell Library Kit 1–5

Die folgenden Probenblatteinstellungen gelten für Bibliotheksvorbereitungskits mit derselben genetischen Struktur wie bei DRAGEN Single Cell Library Kits 1–5. Prüfen Sie zunächst auf der Supportseite „Product Compatibility“ (Produktkompatibilität) zur DRAGEN Bio-IT-Plattform die genetische Struktur Ihres Kits.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
SoftwareVersion	Ja	Die Version der auf dem System installierten DRAGEN-Software. Verwenden Sie alle drei Ganzzahlen aus der Versionsbezeichnung. Beispiel: 3.5.7. Die Softwareversion muss mit der im Abschnitt „BCLConvert_Settings“ angegebenen Version übereinstimmen.
ReferenceGenomeDir	Ja	Der Name des Referenzgenoms. Beispiel: hg38_alt_aware. Referenzgenome befinden sich unter <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Weitere Informationen zur Verwendung eines anwendungsspezifischen Referenzgenoms finden Sie in der <i>Onlinehilfe zur App Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
RnaLibraryType	Nein	Geben Sie einen der folgenden Werte ein: <ul style="list-style-type: none"> • SF: Stranded forward (Strangrichtung vorwärts). SF ist der Standardwert. • SR: Stranded reverse (Strangrichtung rückwärts). • U: Unstranded (Nicht strangspezifisch).
RnaGeneAnnotationFile	Nein	Die Datei mit RNA-Gen-Annotationen. Nur alphanumerische Zeichen sind zulässig. Wird kein Wert angegeben, wird die Standard-Annotation des angegebenen Referenzgenoms verwendet.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
BarcodeRead	Nein	Der Ort im Sequenzierungslauf des Barcode-Reads, der sowohl den Barcode als auch den UMI enthält. Mögliche Werte sind <code>Read1</code> oder <code>Read2</code> . Der Standardwert ist <code>Read1</code> .
BarcodePosition	Ja	Die Position der Basen entsprechend dem Barcode im für BarcodeRead angegebenen Wert. Basenpositionen werden ab Position Null indiziert. Geben Sie den BarcodePosition-Wert im folgenden Format ein: <code>0_<Position Barcodeende></code> Beispielsweise lautet der Wert für einen Barcode mit 16 Basen <code>0_15</code> .
UmiPosition	Ja	Die Position der Basen entsprechend dem UMI im für BarcodeRead angegebenen Wert. Geben Sie den UmiPosition-Wert im folgenden Format ein: <code><UMI-Startposition>_<UMI-Endposition></code> Beispielsweise lautet der Wert für einen UMI mit 10 Basen und einen Barcode mit 16 Basen <code>16_25</code> .
BarcodeSequenceWhitelist	Nein	Der Name der Datei mit der Barcode-Sequenz für das Whitelisting. Der Dateiname darf nur alphanumerische Zeichen, Bindestriche, Unterstriche und Punkte enthalten.
KeepFastq	Nein	Geben Sie <code>true</code> ein, um FASTQ-Ausgabedateien zu speichern. Geben Sie <code>false</code> ein, um FASTQ-Ausgabedateien zu entfernen.
MapAlignOutFormat	Nein	Das Format der Ausgabedatei. Zulässige Werte sind „bam“ und „cram“. Wenn kein Wert angegeben wurde, ist der Standardwert „none“ (keines).

Folgende Felder und Beschreibungen für [DragenSingleCellRNA_Data] sind verfügbar.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
Sample_ID	Ja	Die ID der Probe. Die Proben-ID kann aus bis zu 20 alphanumerischen Zeichen bestehen. Bei der ID wird zwischen Groß- und Kleinschreibung unterschieden. Trennen Sie ID-Elemente mit einem Bindestrich. Beispiel: Probe1-DQB1-022515. Die Proben-IDs müssen mit den im Abschnitt „BCLConvert_Data“ angegebenen IDs übereinstimmen.

Single Cell Library Kit 6

Die folgenden Probenblatteinstellungen gelten für Bibliotheksvorbereitungskits mit derselben genetischen Struktur wie bei DRAGEN Single Cell Library Kits 6. Prüfen Sie zunächst auf der Supportseite „Product Compatibility“ (Produktkompatibilität) zur DRAGEN Bio-IT-Plattform die genetische Struktur Ihres Kits.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
SoftwareVersion	Ja	Die Version der auf dem System installierten DRAGEN-Software. Verwenden Sie alle drei Ganzzahlen aus der Versionsbezeichnung. Beispiel: 3.5.7. Die Softwareversion muss mit der im Abschnitt „BCLConvert_Settings“ angegebenen Version übereinstimmen.
ReferenceGenomeDir	Ja	Der Name des Referenzgenoms. Beispiel: hg38_alt_aware. Referenzgenome befinden sich unter <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Weitere Informationen zur Verwendung eines anwendungsspezifischen Referenzgenoms finden Sie in der <i>Onlinehilfe zur App Reference Builder for Illumina Instruments v1.0.0</i> .
RnaLibraryType	Nein	Geben Sie einen der folgenden Werte ein: <ul style="list-style-type: none"> • SF: Stranded forward (Strangrichtung vorwärts). • SR: Stranded reverse (Strangrichtung rückwärts). • U: Unstranded (Nicht strangspezifisch).

Feld	Erforderlich	Beschreibung
RnaGeneAnnotationFile	Nein	Die Datei mit RNA-Gen-Annotationen. Nur alphanumerische Zeichen sind zulässig. Wird kein Wert angegeben, wird die Standard-Annotation des angegebenen Referenzgenoms verwendet.
BarcodeRead	Nein	Die Position im Sequenzierungslauf des Barcode-Reads, der sowohl den Barcode als auch den UMI enthält. Mögliche Werte sind <code>Read1</code> oder <code>Read2</code> . Der Standardwert ist <code>Read1</code> .
BarcodePosition	Ja	Die Position der Basen entsprechend den Barcodes im für BarcodeRead angegebenen Wert. Basenpositionen werden ab Position Null indiziert. Geben Sie den BarcodePosition-Wert im folgenden Format ein: <code>0_<Endposition erster Barcode>+<Startposition zweiter Barcode>_<Endposition zweiter Barcode>+<Startposition dritter Barcode>_<Endposition dritter Barcode></code> Beispielsweise ergibt die folgende Struktur den Wert <code>0_8+21_29+43_51</code> : <ul style="list-style-type: none"> • 9 Basen im ersten Barcode (<code>0_8</code>). • 12 Basen zwischen dem ersten und zweiten Barcode. • 9 Basen im zweiten Barcode (<code>21_29</code>). • 13 Basen zwischen dem zweiten und dritten Barcode. • 9 Basen im dritten Barcode (<code>43_51</code>).
UmiPosition	Ja	Die Position der Basen entsprechend dem UMI im angegebenen BarcodeRead. Geben Sie die Zeichenfolge im folgenden Format ein: <code><UMI-Startposition>_<UMI-Endposition></code> Beispiel: Wenn der UMI 8 Basen enthält und vor dem UMI insgesamt 51 Basen vorhanden sind, lautet der Wert <code>52_59</code> .

Feld	Erforderlich	Beschreibung
BarcodeSequenceWhitelist	Nein	Der Name der Datei mit der Barcode-Sequenz für das Whitelisting. Der Dateiname darf nur alphanumerische Zeichen, Bindestriche, Unterstriche und Punkte enthalten.
KeepFastq	Nein	Geben Sie <code>true</code> ein, um FASTQ-Ausgabedateien zu speichern. Geben Sie <code>false</code> ein, um FASTQ-Ausgabedateien zu entfernen.
MapAlignOutFormat	Nein	Das Format der Ausgabedatei. Zulässige Werte sind „bam“ und „cram“. Wenn kein Wert angegeben wurde, ist der Standardwert „none“ (keines).

Folgende Felder und Beschreibungen für [DragenSingleCellRNA_Data] sind verfügbar.

Feld	Erforderlich	Beschreibung
Sample_ID	Ja	Die ID der Probe. Die Proben-ID kann aus bis zu 20 alphanumerischen Zeichen bestehen. Bei der ID wird zwischen Groß- und Kleinschreibung unterschieden. Trennen Sie ID-Elemente mit einem Bindestrich. Beispiel: Probe1-DQB1-022515. Die Proben-IDs müssen mit den im Abschnitt „BCLConvert_Data“ angegebenen IDs übereinstimmen.

Dunkelzyklus-Sequenzierung

In diesem Abschnitt wird die Verwendung der Dunkelzyklus-Sequenzierung in der Rezeptur beschrieben.

Bei der Dunkelzyklus-Sequenzierung werden lediglich die Chemieschritte eines Sequenzierungszyklus durchgeführt. Prüfen Sie auf der [Illumina Support-Website](#) auf der Seite „Compatible Products“ (Kompatible Produkte) für Ihr Bibliotheksvorbereitungskit, ob Dunkelzyklus-Sequenzierung erforderlich ist.

Verwenden Sie die folgenden Schritte für die Dunkelzyklus-Sequenzierung.

Bearbeiten der Rezepturdatei

1. Laden Sie die XML-Rezepturdatei von der [Illumina Support-Website](#) herunter.
2. Bearbeiten Sie die XML-Rezepturdatei.

- a. Ermitteln Sie den geeigneten Protokollabschnitt anhand der Read- und Indexsequenzierungskonfiguration. Pro anwendungsspezifischer Rezeptur sind sechs mögliche Protokolle vorhanden, die bearbeitet werden können.
Beispielsweise lautet das Protokoll für einen einzelnen Read 1 ohne Indexsequenzierungskonfiguration `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
- b. Geben Sie vor `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` und `<ReadRef ReadName="Read 2"/>` den folgenden Dunkelzyklus-Sequenzierungsschritt in eine neue Zeile ein.
`<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />`.
- c. Geben Sie den Dunkelzyklus-Schritt für jeden erforderlichen Dunkelzyklus in eine neue Zeile ein.

3. Speichern Sie die XML-Rezepturdatei.

Im Folgenden finden Sie ein Beispiel für eine Rezeptur mit Dunkelzyklus:

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

Verknüpfen der Rezeptur mit einem Lauf

4. Wählen Sie in der Steuerungssoftware unter „Run Setup“ (Laufkonfiguration) die Option „Custom Recipe“ (Anwendungsspezifische Rezeptur) und dann **Choose** (Auswählen) aus.
5. Navigieren Sie zur aktualisierten XML-Rezepturdatei.
6. Wählen Sie **Open** (Öffnen).
7. Wechseln Sie zurück zu *Starten eines Sequenzierungslaufs auf Seite 45* (Starten eines Sequenzierungslaufs).

Index

%

%PF 59

A

Alkoholtücher 27

Amplifikation 8

Analyse

 Methoden 5, 9

Anzahl der Läufe 6

Audioeinstellungen 20

Auffangschale

 Pads 27

Aus- und Wiedereinschalten des Geräts 78

Ausgabeordner 49, 72

Ausschalten 81

Automatische Updates 73

B

Base-Call-Dateien 9, 54, 61

Base-Calling 5

BaseSpace Sequence Hub 1

 Dokumentation 14

 Einstellungen 14

BCL-Dateien 6

bcl2fastq2 54

Bearbeiten von Laufparametern 49

Benennung

 Computername 6

 Gerätename 20

Betriebssystem 81

Bewegen 4

Bibliotheken

 Denaturieren 8

Bildanalyse 5

Bilder 54

Bildgebung 54-55

Bildstreifen 55-56

Bleichmitteltücher 27

C

CBCL-Dateien 60

CE 54

Cloudbasierte Analyse 1

Clusterintensitäten 57

Clusterpositionen 54, 61

Compute Engine 54

Computername 6

D

Datenqualität 59

Denaturieren 8

Dokumentation 102

Domänen 14

Downgrading der Software 82-83

E

Ein/Aus-Taste 3, 81

Enterprise-Abonnement 14

Ersatzteile 75

Erstmalige Konfiguration 75, 82-83

Ethernet-Anschluss 4

Ethernet-Kabel 4

F

FASTQ-Konvertierung 54

Fehler 6, 81

 Meldungen 78

 Wahrscheinlichkeit 60

Fehlerprotokolle 55

Festplatte 6, 72

Filterdateien 54, 61

Filtern von Clustern 59

G

Garantie 27

Gefrierschrankspezifikationen 28

Geräteleistungsdaten 14
Grüner Kanal 58

H

Hilfe, technische 102
Hosting-Speicherort 14

I

Illumina Proactive Support 14
Index
 Zyklen 30
Initialisierung 81
 Fehlschlag 81
Installation der Software 73
Intensitätswerte 57
Internetverbindung 14
InterOp-Dateien 54, 61
IP-Adresse 6

K

Kameras 55
Kartusche
 Ausrichtung beim Laden 50
Katalognummern 26
Kippschalter 4, 81
Kits 26
 Katalognummern 27
Klappen
 Schließen 50
Kühlschrankspezifikationen 28
Kundendienst 102
Kurzname 20

L

Lanes 55
Läufe
 Kennzahlen 54
Laufgröße 72
Laufkonfiguration
 Beispiele 30

Laufordner 72
Laufparameter
 Bearbeiten 49
Laufstatus 6
Laufwerk D 72
Leistungsdaten 14
Leuchtbalken 3
Local Run Manager 5
Lokale Analyse 1
Löschen von Läufen 6, 72
Lüfter 75
Luftfilter
 Ersatzteile 27
 Lage 75

M

Manuelle Software-Updates 73
Matrizenbildung 57
Maus 4
Miniaturbilder 61
Monitor 3

N

Nachverfolgen von Verbrauchsmaterialien 1
Nanowells 57
Netzkabel 4
Neustart 82-83
NextSeq 1000/2000-Reagenzien 26
No-Calls 57
Nukleotide, No-Calls 58

O

Oberflächennummerierung 56

P

Pads 27
Paired-End 49
PF (Passing Filter, nach Filterung) 59
Phasierung und Vorphasierung 57

PhiX 27
 Alignment 54
PhiX Control v3 26
Phred-Algorithmus 60
Platten 54
Plattenummerierung 56
Private Domäne 14
Protokolldateien 55
Prozessmanagement 72

Q

Q-Scores 60
Qualitätstabellen 60

R

Read-Längen 30
Read-Zyklen 30
Registrierungsfehler 57
Reinheitsfilter 59
Resuspensionspuffer 26
Rezepturbestandteile 6
Rezepturen 73
Roter Kanal 58
RSB-Ersatz 26
RunInfo.xml 61

S

Sequenzierungsanalyse-Viewer 54, 57
Seriennummer 6
Serverspeicherort 14
Single-Read 49
Software
 Downgrading 82-83
 Installation 73
 Warnungen zu Updates 21
Software-Suite 1, 5
Speicherplatz 6, 72
Spezifikationsanpassung 81
Standardausgabeordner 49
Statusleiste 3

Supportseiten 73
Symbole 6
System-Suite-Installationsprogramm 73
Systemprüfungen 78

T

Tastaturen 4
Technische Unterstützung 102
Test-Kit 27
Toneinstellungen 20

U

UNC-Pfade 49
Universal Copy Service 5, 73
USB-Anschlüsse 4

V

Verbrauchsmaterialien
 Nachverfolgen 1
 Scannen 50
Verbrauchsmaterialienkammer 3
Verdünnen von Bibliotheken 8
Verfallsdatum 75
Verlorene Verbindungen 81

W

Warnungen 6, 73, 81
Wechselstrom
 Anschluss 4
Werkseinstellungen 82-83
Whitepaper 60
Windows
 Anmeldung 81

Z

zugeordnete Laufwerke 49
Zusätzliche Zyklen 30
Zweikanal-Sequenzierung 58
Zyklus-Nummern 30

Technische Unterstützung

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

Website: www.illumina.com
E-Mail: techsupport@illumina.com

Telefonnummern des technischen Supports von Illumina

Region	Gebührenfrei	International
Australien	+61 1800 775 688	
Belgien	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
China		+86 400 066 5835
Dänemark	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
Deutschland	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Finnland	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
Frankreich	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Großbritannien	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
Hongkong, China	+852 800 960 230	
Indien	+91 8006500375	
Indonesien		0078036510048
Irland	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Italien	+39 800 985513	+39 236003759
Japan	+81 0800 111 5011	
Kanada	+1 800 809 4566	
Malaysia	+60 1800 80 6789	
Neuseeland	+64 800 451 650	
Niederlande	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Norwegen	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Österreich	+43 800 006249	+43 1 9286540
Philippinen	+63 180016510798	
Schweden	+46 2 00883979	+46 8 50619671

Region	Gebührenfrei	International
Schweiz	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Singapur	1 800 5792 745	
Spanien	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Südkorea	+82 80 234 5300	
Taiwan, China	+886 8 06651752	
Thailand	+66 1800 011 304	
USA	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Vietnam	+84 1206 5263	

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

Die **Produktdokumentation** steht unter support.illumina.com zum Herunterladen zur Verfügung.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Kalifornien 92122, USA

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in Diagnoseverfahren.

© 2020 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

illumina[®]