

NextSeq 550Dx – Forschungsmodus

Referenzhandbuch für das Gerät



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

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

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

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

© 2018 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind das Eigentum von Illumina, Inc. oder ihrer jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.

Versionshistorie

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 1000000041922 v01	März 2018	Informationen zum Überwachungsservice Illumina Proactive im Abschnitt „Anpassen der Systemeinstellungen“ hinzugefügt.
Dokument-Nr. 1000000041922 v00	November 2017	Erste Version

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1 Überblick	1
Über dieses Handbuch	1
Einleitung	1
Weitere Ressourcen	2
Gerätekomponenten	3
Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien – Überblick	6
Kapitel 2 Erste Schritte	11
Starten des Geräts	11
Anpassen der Systemeinstellungen	12
Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien und Geräte	13
Kapitel 3 Sequenzierung	15
Einleitung	15
Sequenzierungsworkflow	16
Vorbereiten der Reagenzienkartusche	16
Vorbereiten der Fließzelle	17
Vorbereiten von Bibliotheken für die Sequenzierung	17
Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs	18
Überwachen des Lauffortschritts	25
Automatische Nachwaschung	27
Kapitel 4 Scannen	29
Einleitung	29
Scan-Workflow	30
Herunterladen des DMAP-Ordners	30
Einsetzen des BeadChips in den Adapter	31
Konfigurieren eines Scan-Vorgangs	32
Überwachen des Scan-Fortschritts	34
Kapitel 5 Wartung	37
Einleitung	37
Durchführen eines manuellen Waschlaufrs	37
Austausch des Luftfilters	40
Software-Updates	41
Optionen für das Ausschalten und Neustarten des Geräts	43
Anhang A Fehlerbehebung	45
Einleitung	45
Dateien für die Fehlerbehebung	45
Beheben von Fehlern der automatischen Prüfung	46
Behälter für verbrauchte Reagenzien ist voll	48
Workflow für die Rehybridisierung	49

BeadChip- und Scan-Fehler	51
Anwendungsspezifische Rezepturen und Rezepturordner	52
RAID-Fehlermeldung	53
Konfigurieren der Systemeinstellungen	53
Anhang B Echtzeitanalyse	57
Überblick über die Echtzeitanalyse	57
Echtzeitanalyse-Workflow	58
Anhang C Ausgabedateien und -ordner	63
Sequenzierungsausgabedateien	63
Ordnerstruktur der Sequenzierungsausgabedaten	66
Scan-Ausgabedateien	67
Ordnerstruktur der ausgegebenen Scan-Daten	67
Index	69
Technische Unterstützung	73

Kapitel 1 Überblick

Über dieses Handbuch	1
Einleitung	1
Weitere Ressourcen	2
Gerätekomponenten	3
Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien – Überblick	6

Über dieses Handbuch

Dieses Gerätehandbuch enthält Anweisungen zur Verwendung des NextSeq 550Dx-Geräts im Forschungsmodus (RUO).

Einleitung

Das Illumina® NextSeq™ 550Dx-Gerät ist eine einzelne Lösung, die einen nahtlosen Übergang zwischen der Hochdurchsatzsequenzierung und dem Array-Scannen bietet.

Sequenzierungsfunktionen

- ▶ **Hochdurchsatzsequenzierung:** Das NextSeq™ 550-Gerät ermöglicht das Sequenzieren von Exomen, Gesamtgenomen und Transkriptomen. Es unterstützt TruSeq™ - und Nextera™ -Bibliotheken.
- ▶ **Fließzellentypen:** Fließzellen stehen in Konfigurationen für hohe und mittlere Leistung zur Verfügung. Im Kit eines jeden Fließzellentyps befindet sich eine kompatible vorgefüllte Reagenzienkartusche.
- ▶ **Echtzeitanalyse (RTA):** Die integrierte Analysesoftware führt eine Datenanalyse im Gerät durch. Dies umfasst eine Bildanalyse und das Base-Calling. Das NextSeq 550Dx verwendet eine Implementierung von RTA namens RTA v2 mit wichtigen Unterschieden bei der Architektur und den Funktionen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Echtzeitanalyse auf Seite 57*.
- ▶ **BaseSpace®-Integration:** Der Sequenzierungsworkflow ist mit BaseSpace, der Genomik-Computing-Umgebung von Illumina für Datenanalyse, Speicherung und Zusammenarbeit, integriert. Die Bibliotheksinformationen und Laufparameter für Geräte, die für BaseSpace konfiguriert sind, werden auf der Registerkarte „BaseSpace Prep“ (BaseSpace-Vorbereitung) angegeben. Läufe, die in BaseSpace eingerichtet wurden, erscheinen während der Laufkonfiguration auf der Benutzeroberfläche des Geräts. Beim Durchführen des Laufs werden die Ausgabedateien in Echtzeit nach BaseSpace bzw. BaseSpace Onsite gestreamt.

Funktionen für das Array-Scannen

- ▶ **Integriertes Array-Scannen in der Steuerungssoftware:** Das NextSeq 550Dx-Gerät ermöglicht den Wechsel vom Array-Scannen zur Hochdurchsatzsequenzierung auf demselben Gerät und mit derselben Steuerungssoftware.
- ▶ **Erweiterte Bildgebungsfunktion:** Das Bildgebungssystem des NextSeq 550Dx-Geräts bietet Software- und Tischanpassungen, die das Abbilden einer größeren Fläche für das BeadChip-Scannen ermöglichen.
- ▶ **BeadChip-Typen:** Zu den kompatiblen BeadChip-Typen gehören CytoSNP-12, CytoSNP-850K und Karyomap-12.
- ▶ **BeadChip-Adapter:** Ein wiederverwendbarer BeadChip-Adapter ermöglicht das einfache Laden eines BeadChips auf das Gerät.
- ▶ **Datenanalyse:** Verwenden Sie die BlueFuse® Multi-Software zum Analysieren von Array-Daten.

Weitere Ressourcen

Die folgenden Dokumente stehen auf der Illumina-Website zum Herunterladen zur Verfügung.

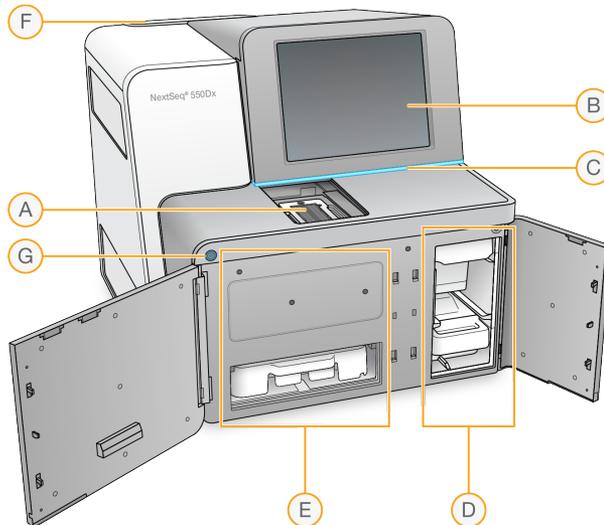
Ressource	Beschreibung
<i>NextSeq 550Dx Referenzhandbuch für das Gerät (Dokument-Nr. 1000000009513)</i>	Stellt im Diagnosemodus Anweisungen zum Gerätebetrieb sowie zur Fehlersuche bereit.
<i>NextSeq 550Dx Handbuch zur Standortvorbereitung für das Gerät (Dokument-Nr. 1000000009869)</i>	Enthält Spezifikationen für den Arbeitsplatz, die elektrischen Anforderungen und die Umgebungsbedingungen.
<i>NextSeq 550Dx Sicherheits- und Compliance-Handbuch für das Gerät (Dokument-Nr. 1000000009868)</i>	Bietet Informationen zur Betriebssicherheit, zu Compliance-Erklärungen sowie zu Gerätekennzeichnungen.
<i>RFID Reader Compliance-Handbuch (Dokument-Nr. 10000000030332)</i>	Bietet Informationen zum integrierten RFID Reader des Geräts, Compliance-Zertifizierungen sowie sicherheitsbezogene Informationen.
<i>Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken für das NextSeq-System (Dokument-Nr. 15048776)</i>	Bietet Anweisungen zum Denaturieren und Verdünnen von vorbereiteten Bibliotheken für einen Sequenzierungslauf sowie zum Vorbereiten einer optionalen PhiX-Kontrolle. Dieser Schritt gilt für die meisten Bibliothekstypen.
<i>NextSeq Handbuch für anwendungsspezifische Primer (Dokument-Nr. 15057456)</i>	Bietet Informationen über die Verwendung von anwendungsspezifischen Sequenzierungs-Primern anstelle von Illumina-Sequenzierungs-Primern.
<i>Hilfe zu BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Bietet Informationen zur Verwendung von BaseSpace® und den verfügbaren Analyseoptionen.

Auf der [NextSeq 550Dx-Gerätesupportseite](#) der Illumina-Website können Sie auf Dokumentationen, Software-Downloads, Online-Schulungen und häufig gestellte Fragen zugreifen.

Gerätekomponenten

Zum NextSeq 550Dx-Gerät gehören ein Touchscreen-Monitor, eine Statusleiste und vier Kammern.

Abbildung 1 Gerätekomponenten



- A **Bildgebungskammer:** Enthält die Fließzelle für den Sequenzierungslauf bzw. den BeadChip für das Scannen.
- B **Touchscreen-Monitor:** Ermöglicht die Systemkonfiguration und -einrichtung am Gerät über die Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware.
- C **Statusleiste:** Gibt den Gerätestatus an: „Verarbeitung läuft“ (blau), „Überprüfung erforderlich“ (orange) oder „Bereit zum Sequenzieren“ (grün).
- D **Pufferkammer:** Enthält die Pufferflasche und den Behälter für die verbrauchten Reagenzien.
- E **Reagenzienkammer:** Enthält die Reagenzienkartusche.
- F **Luftfilterkammer:** Enthält den Luftfilter. Der Filter ist an der Rückseite des Geräts zugänglich.
- G **Ein/Aus-Taste:** Mit dieser Taste werden das Gerät und der Gerätecomputer ein- oder ausgeschaltet.

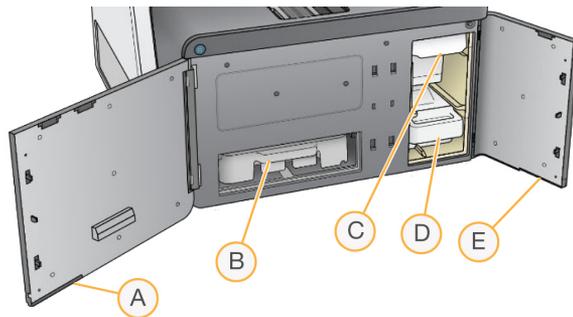
Bildgebungskammer

Die Bildgebungskammer enthält den Tisch, zu dem drei Ausrichtungsstifte zur Positionierung der Fließzelle für die Sequenzierung bzw. des BeadChip-Adapters zum Scannen gehören. Nach dem Laden der Fließzelle bzw. des BeadChip-Adapters wird die Tür der Bildgebungskammer automatisch geschlossen und die Komponenten werden in Position gebracht.

Reagenzien- und Pufferkammer

Zum Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs auf dem NextSeq 550Dx-Gerät ist der Zugang zur Reagenzienkammer und zur Pufferkammer erforderlich, um die Verbrauchsmaterialien für den Lauf zu laden und den Behälter für verbrauchte Reagenzien zu leeren.

Abbildung 2 Reagenzien- und Pufferkammer



- A **Tür der Reagenzienkammer:** Schließt die Reagenzienkammer mit einem Riegel unterhalb des rechten unteren Türbereichs. Die Reagenzienkammer enthält die Reagenzienkartusche.
- B **Reagenzienkartusche:** Bei der Reagenzienkartusche handelt es sich um ein vorgefülltes Verbrauchsmaterial für den Einmalgebrauch.
- C **Pufferflasche:** Die Pufferflasche ist ein vorgefülltes Verbrauchsmaterial für den Einmalgebrauch.
- D **Behälter für verbrauchte Reagenzien:** Hierin werden verbrauchte Reagenzien nach jedem Lauf zur Entsorgung gesammelt.
- E **Tür der Pufferkammer:** Schließt die Pufferkammer mit einem Riegel unterhalb der unteren linken Türkante.

Luftfilterkammer

In der Luftfilterkammer an der Rückseite des Geräts befindet sich der Luftfilter. Wechseln Sie den Luftfilter alle 90 Tage. Weitere Informationen zum Austausch des Filters finden Sie unter [Austausch des Luftfilters auf Seite 40](#).

NextSeq 550Dx-Software

Die Gerätesoftware umfasst integrierte Anwendungen, die Sequenzierungsläufe oder das Array-Scannen durchführen.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS):** Die Steuerungssoftware führt Sie durch die Schritte zum Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs bzw. eines Array-Scans.
- ▶ **Echtzeitanalyse-Software (RTA):** Bei Sequenzierungsläufen führt RTA eine Bildanalyse sowie Base-Calling während des Laufs durch. Das NextSeq 550Dx-Gerät verwendet RTA v2, die gegenüber vorherigen Versionen wichtige Unterschiede bei der Architektur und den Funktionen aufweist. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter [Echtzeitanalyse auf Seite 57](#).

Statussymbole

Ein Statussymbol in der oberen rechten Ecke der Steuerung informiert Sie über Änderungen der Bedingungen während der Laufkonfiguration bzw. des Laufs.

Statussymbol	Statusname	Beschreibung
	Status OK	Das System funktioniert normal.
	Verarbeitung	Das Gerät führt die Verarbeitung durch.

Statussymbol	Statusname	Beschreibung
	Warnung	Eine Warnung ist aufgetreten. Warnungen stoppen einen Lauf nicht und es ist keine Aktion erforderlich, damit der Lauf fortgesetzt werden kann.
	Fehler	Ein Fehler ist aufgetreten. Bei Fehlern sind Maßnahmen erforderlich, bevor der Lauf fortgesetzt werden kann.
	Service erforderlich	Eine Meldung verlangt Ihre Aufmerksamkeit. Lesen Sie den Meldungstext, um genaue Informationen zu erhalten.

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



HINWEIS

Wenn Sie die Meldung bestätigen, wird das Symbol zurückgesetzt und die Meldung wird deaktiviert. Der Benutzer kann die Meldung noch sehen, wenn er das Symbol auswählt. Nach dem Neustart von NCS wird sie jedoch nicht mehr angezeigt.

Ein/Aus-Taste

Mit der Ein/Aus-Taste auf der Vorderseite des NextSeq 550Dx-Geräts werden das Gerät und der Gerätecomputer eingeschaltet. Die Ein/Aus-Taste des Geräts führt je nach Status der GeräteNetzspannung die folgenden Aktionen durch. Das NextSeq 550Dx-Gerät startet standardmäßig im Diagnosemodus.

Informationen zum Ausschalten des Geräts finden Sie unter *Ausschalten des Geräts auf Seite 43*.

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



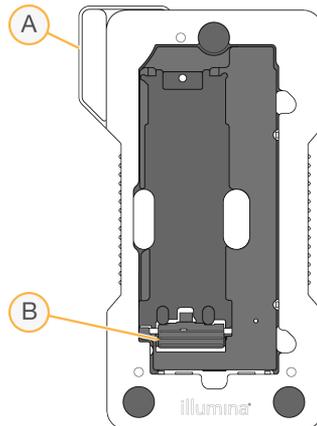
HINWEIS

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

Wiederverwendbarer BeadChip-Adapter – Überblick

Der wiederverwendbare BeadChip-Adapter hält den BeadChip während des Scan-Vorgangs. Mit der Halteklammer des Adapterfachs wird der BeadChip sicher befestigt. Anschließend wird der BeadChip-Adapter auf den Tisch in der Bildgebungskammer geladen.

Abbildung 3 Wiederverwendbarer BeadChip-Adapter



- A BeadChip-Adapter
- B Halteklammer

Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien – Überblick

Zur Durchführung eines Sequenzierungslaufs auf dem NextSeq 550Dx-Gerät im Forschungsmodus ist ein NextSeq 500/550-Kit (NextSeq 500/550 Kit) oder ein NextSeq 550Dx-Reagenzien-Kit für hohe Leistung (NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit) zum Einmalgebrauch erforderlich. Jedes Kit enthält eine Fließzelle sowie die für den Sequenzierungslauf erforderlichen Reagenzien.

Bei der Fließzelle, der Reagenzienkartusche und der Pufferflasche wird das RFID-Tracking (Radio Frequency Identification) für die genaue Nachverfolgung von Verbrauchsmaterialien und das Prüfen der Kompatibilität verwendet.



HINWEIS

Lagern Sie die Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien bis zu ihrer Verwendung in ihren Kartons.

Bei der Verwendung eines NextSeq 550Dx-Reagenzien-Kits für hohe Leistung für einen Lauf im Forschungsmodus müssen sämtliche Komponenten aus derselben Kit-Charge stammen. Ein NextSeq 500/550-Kit kann nicht für einen Lauf im Diagnosemodus verwendet werden.

Beschriftungen zur Kit-Kompatibilität

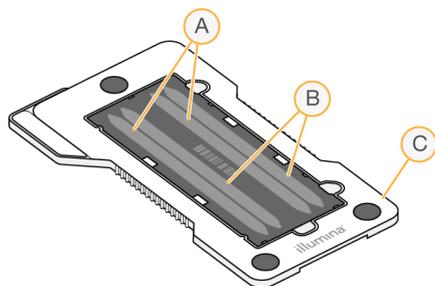
Die Kit-Komponenten sind farbkodiert, um die Kompatibilität zwischen Fließzellen und Reagenzienkartuschen aufzuzeigen. Verwenden Sie stets eine kompatible Reagenzienkartusche und Fließzelle. Der Pufferflasche ist universell einsetzbar.

Jede Fließzelle und Reagenzienkartusche ist mit **High** (Hoch) oder **Mid** (Mittel) beschriftet. Überprüfen Sie immer das Etikett, wenn Sie Verbrauchsmaterialien für einen Lauf vorbereiten.

Kit-Typ	Markierung auf Etikett
High Output Kit Components (Kit-Komponenten für hohe Leistung)	
Mid Output Kit Components (Kit-Komponenten für mittlere Leistung)	

Fließzelle – Überblick

Abbildung 4 Fließzellenkartusche



- A Lane-Paar A: Lanes 1 und 3
- B Lane-Paar B: Lanes 2 und 4
- C Rahmen der Fließzellenkartusche

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

Die Fließzelle enthält vier Lanes, die paarweise aufgenommen werden.

- ▶ Lanes 1 und 3 (Lane-Paar A) werden gleichzeitig aufgenommen.
- ▶ Lanes 2 und 4 (Lane-Paar B) werden aufgenommen, sobald Lane-Paar A aufgenommen wurde.

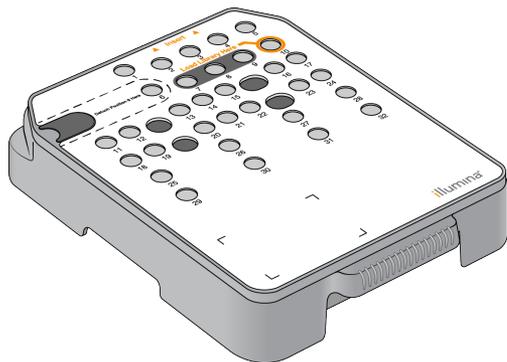
Obwohl die Fließzelle vier Lanes enthält, wird nur eine Bibliothek oder ein Pool aus mehreren Bibliotheken auf der Fließzelle sequenziert. Bibliotheken werden in einen einzelnen Behälter auf der Reagenzienkartusche geladen und automatisch auf die Fließzelle in allen vier Lanes übertragen.

Jede Lane wird in kleinen Bildgebungsbereichen, sogenannten Platten, aufgenommen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter [Fließzellenplatten auf Seite 63](#).

Reagenzienkartusche – Überblick

Die Reagenzienkartusche ist ein für den einmaligen Gebrauch vorgesehenes Verbrauchsmaterial mit RFID-Tracking und folienversiegelten Behältern, die mit Clusterbildungs- und Sequenzierungsreagenzien vorgefüllt sind.

Abbildung 5 Reagenzienkartusche



Die Reagenzienkartusche enthält einen designierten Behälter zum Laden von vorbereiteten Bibliotheken. Nach Beginn des Laufs werden die Bibliotheken automatisch vom Behälter an die Fließzelle übertragen. Mehrere Behälter sind für den automatischen Nachwaschlauf reserviert. Die Waschlösung wird von der Pufferflasche durch das System in die reservierten Behälter und anschließend in den Behälter für verbrauchte Reagenzien gepumpt.

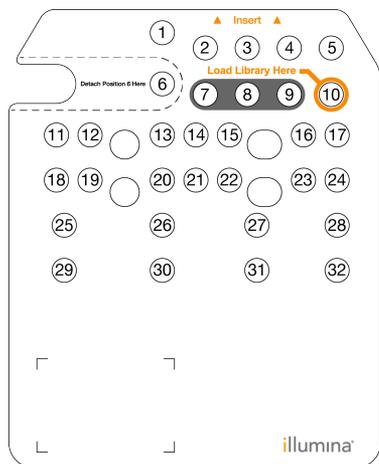


WARNUNG

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

Reservierte Behälter

Abbildung 6 Nummerierte Behälter



Position	Beschreibung
7, 8 und 9	Reserviert für optionale anwendungsspezifische Primer
10	Laden der Bibliotheken

Weitere Informationen zu anwendungsspezifischen Primern finden Sie im *Benutzerhandbuch zu anwendungsspezifischen Primern* (Dokument-Nr. 15057456).

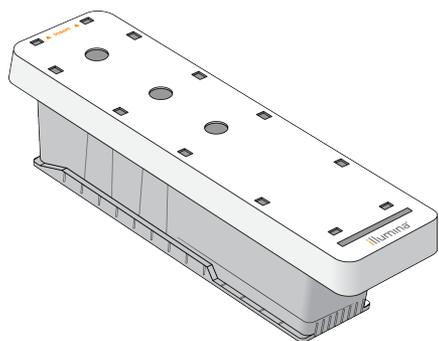
Herausnehmbarer Behälter in Position 6

Die vorgefüllte Reagenzienkartusche beinhaltet ein Denaturierungsreagenz in Position 6, das Formamid enthält. Um die sichere Entsorgung nicht verwendeter Reagenzien nach dem Sequenzierungslauf zu erleichtern, kann der Behälter in Position 6 entfernt werden. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Herausnehmen des gebrauchten Behälters in Position 6* auf Seite 22.

Pufferflasche – Überblick

Die Pufferflasche ist ein Verbrauchsmaterial für den Einmalgebrauch mit drei mit Puffern und mit Waschlösung vorgefüllten Behältern. Der Inhalt der Pufferflasche ist für das Sequenzieren einer Fließzelle ausreichend.

Abbildung 7 Pufferflasche



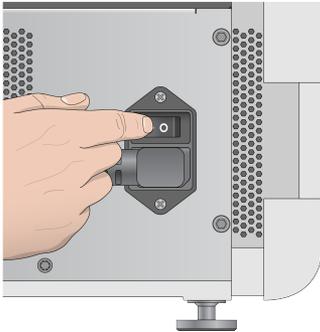
Kapitel 2 Erste Schritte

Starten des Geräts	11
Anpassen der Systemeinstellungen	12
Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien und Geräte	13

Starten des Geräts

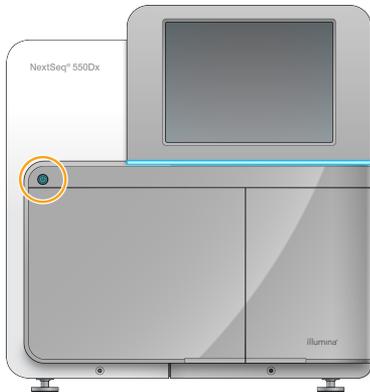
Bringen Sie den Hauptnetzschalter in die Position I (EIN).

Abbildung 8 Netzschalter auf der Rückseite des Geräts



- 1 Drücken Sie die Ein/Aus-Taste über der Reagenzienkammer. Die Ein/Aus-Taste schaltet das Gerät ein und startet den integrierten Gerätecomputer und die Software. Das Gerät startet standardmäßig im Diagnosemodus.

Abbildung 9 Ein/Aus-Taste auf der Vorderseite des Geräts



- 2 Warten Sie, bis das Betriebssystem vollständig geladen wurde. Die NextSeq 550Dx Operating Software (NOS) wird gestartet und führt automatisch die Initialisierung des Systems durch. Wenn die Initialisierung abgeschlossen ist, wird der Startbildschirm geöffnet.
- 3 Geben Sie Ihren Benutzernamen und Ihr Kennwort für Local Run Manager ein. Weitere Informationen zu Local Run Manager-Kennwörtern finden Sie im *Referenzhandbuch für das NextSeq 550Dx-Gerät (Dokument-Nr. 100000009513)*.
- 4 Wählen Sie **Login** (Anmelden). Der Startbildschirm mit den Symbolen „Sequence“ (Sequenzieren), „Local Run Manager“, „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) und „Perform Wash“ (Waschlauf durchführen) wird geöffnet.

- 5 Wählen Sie in der NOS den Befehl „Reboot to RUO“ (Im Forschungsmodus neu starten), um das Gerät sicher herunterzufahren und im Forschungsmodus neu zu starten.
 - ▶ Wählen Sie **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
 - ▶ Wählen Sie **Reboot / Shut Down** (Neustart / Ausschalten).
 - ▶ Wählen Sie **Reboot to RUO** (Im Forschungsmodus neu starten).
- 6 Warten Sie, bis das Betriebssystem vollständig geladen wurde.
Die NCS wird gestartet und initialisiert das System automatisch. Wenn die Initialisierung abgeschlossen ist, wird der Startbildschirm geöffnet.
- 7 Melden Sie sich mit dem Benutzernamen und dem Kennwort für den Standort bei Windows an, wenn das System so konfiguriert wurde, dass Anmeldeinformationen erforderlich sind.



HINWEIS

Wenn Sie nicht sicher sind, in welchem Modus sich das Gerät befindet, finden Sie unter *Gerätemodusanzeigen* weitere Informationen.

Gerätemodusanzeigen

Die folgende Tabelle enthält die Gerätemodusanzeigen auf dem NCS- bzw. NOS-Bildschirm. Informationen zum Wechsel vom Forschungs- in den Diagnosemodus finden Sie auf Seite 1 unter *Optionen für das Ausschalten und Neustarten des Geräts auf Seite 43*.

Modus	Startbildschirm	Farbleiste	Ausrichtung des Statussymbols
Diagnosemodus	Welcome to NextSeqDx (Willkommen bei NextSeqDx)	Blau	Horizontal
Forschungsmodus	Welcome to NextSeq (Willkommen bei NextSeq)	Orange	Vertikal

Anpassen der Systemeinstellungen

In der Steuerungssoftware lassen sich Systemeinstellungen für Folgendes festlegen.

- ▶ Eingangsvoreinstellungen
- ▶ Audioeinstellungen
- ▶ Gerätenamen
- ▶ Voreinstellungen für die Laufkonfiguration
- ▶ Entsorgung nicht verwendeter Reagenzien

Ändern des Avatarbilds und des Kurznamens des Geräts

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

Festlegen der Tastaturoption und Audio-Signale

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 2 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Use on-screen keyboard** (Bildschirmtastatur verwenden), um die Bildschirmtastatur des Geräts für Eingaben zu aktivieren.
- 3 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Play audio** (Audio abspielen), um die Audio-Signale für die folgenden Ereignisse einzuschalten:
 - ▶ Bei der Geräte-Initialisierung
 - ▶ Wenn ein Lauf gestartet wird
 - ▶ Wenn bestimmte Fehler auftreten
 - ▶ Wenn eine Benutzerinteraktion erforderlich ist
 - ▶ Wenn ein Lauf beendet wurde
- 4 Wählen Sie **Save** (Speichern), um die Einstellungen zu speichern und den Bildschirm zu schließen.

Festlegen von Laufkonfigurationsoptionen

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 2 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Use Advanced Load Consumables** (Erweiterte Option zum Laden von Verbrauchsmaterialien verwenden), um die Verbrauchsmaterialien für den Lauf von einem einzelnen Bildschirm aus zu laden.
- 3 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Bestätigung des Selbsttests überspringen), um die Sequenzierung bzw. das Scannen automatisch zu starten, nachdem der automatische Selbsttest erfolgreich durchgeführt wurde.
- 4 Wählen Sie **Save** (Speichern), um die Einstellungen zu speichern und den Bildschirm zu schließen.

Festlegen der Option zur automatischen Entsorgung von Verbrauchsmaterialien

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 2 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Purge Consumables at End of Run** (Verbrauchsmaterialien am Ende des Laufs entsorgen), damit am Ende jedes Laufs nicht verwendete Reagenzien automatisch aus der Reagenzienkartusche in den Behälter für verbrauchte Reagenzien entsorgt werden.



HINWEIS

Durch die automatische Entsorgung von Verbrauchsmaterialien nimmt der Workflow mehr Zeit in Anspruch.

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

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien und Geräte

Die folgenden Verbrauchsmaterialien und Geräte werden für die Vorbereitung der Verbrauchsmaterialien, die Sequenzierung und die Gerätewartung verwendet.

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien für Sequenzierungsläufe

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
1 N NaOH (Natriumhydroxid)	Allgemeiner Laborlieferant	Bibliotheksdenaturierung, verdünnt auf 0,2 N
200 mM Tris-HCl, pH7	Allgemeiner Laborlieferant	Bibliotheksdenaturierung
Alkoholtupfer, 70 % Isopropyl oder Ethanol, 70 %	VWR, Katalog-Nr. 95041-714 (oder vergleichbar) Allgemeiner Laborlieferant	Reinigung der Fließzelle und allgemeine Verwendung
Labortücher, fusselfrei	VWR, Katalog-Nr. 21905-026 (oder vergleichbar)	Reinigung der Fließzelle und allgemeine Verwendung

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien für die Geräterwartung

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
NaOCl, 5 % (Natriumhypochlorit)	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. 239305 (oder vergleichbares Produkt in Laborqualität)	Waschen des Geräts mithilfe des manuellen Nachwaschlaufs; verdünnt auf 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. P7949	Waschen des Geräts mit manuellen Waschoptionen; verdünnt auf 0,05 %
Wasser, Laborqualität	Allgemeiner Laborlieferant	Waschen des Geräts (manueller Waschlauf)
Luftfilter	Illumina, Katalog-Nr. 20022240	Reinigen der Luft, die das Gerät zur Kühlung aufnimmt

Richtlinien für Wasser in Laborqualität

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

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

Vom Benutzer bereitzustellende Ausstattung

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

Kapitel 3 Sequenzierung

Einleitung	15
Sequenzierungsworkflow	16
Vorbereiten der Reagenzienkartusche	16
Vorbereiten der Fließzelle	17
Vorbereiten von Bibliotheken für die Sequenzierung	17
Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs	18
Überwachen des Lauffortschritts	25
Automatische Nachwaschung	27

Einleitung

Um auf dem NextSeq 550Dx-Gerät einen Sequenzierungslauf durchzuführen, bereiten Sie die Reagenzienkartusche und die Fließzelle vor und befolgen Sie die Anweisungen der Software für das Konfigurieren und Starten des Laufs. Die Clusterbildung und die Sequenzierung werden im Gerät durchgeführt. Nach dem Lauf wird automatisch ein Gerätewaschlauf unter Verwendung bereits auf dem Gerät geladener Komponenten durchgeführt.

Clusterbildung

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

Sequenzierung

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

Überwachen Sie den Lauffortschritt und die Statistiken über die Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware, die Registerkarte „Run“ (Lauf) auf BaseSpace oder unter Verwendung der Sequenzierungsanalyse-Viewer-Software (SAV) von einem Netzwerkcomputer aus. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter [Sequenzierungsanalyse-Viewer auf Seite 27](#).

Analyse

Während der Durchführung des Laufs überträgt die Steuerungssoftware automatisch Base-Call-Dateien (BCL) an BaseSpace oder an den angegebenen Ausgabespeicherort für die Sekundäranalyse.

Je nach verwendeter Anwendung stehen verschiedene Analysemethoden zur Verfügung. Weitere Informationen hierzu finden Sie in der *Hilfe zu BaseSpace* (help.basespace.illumina.com).

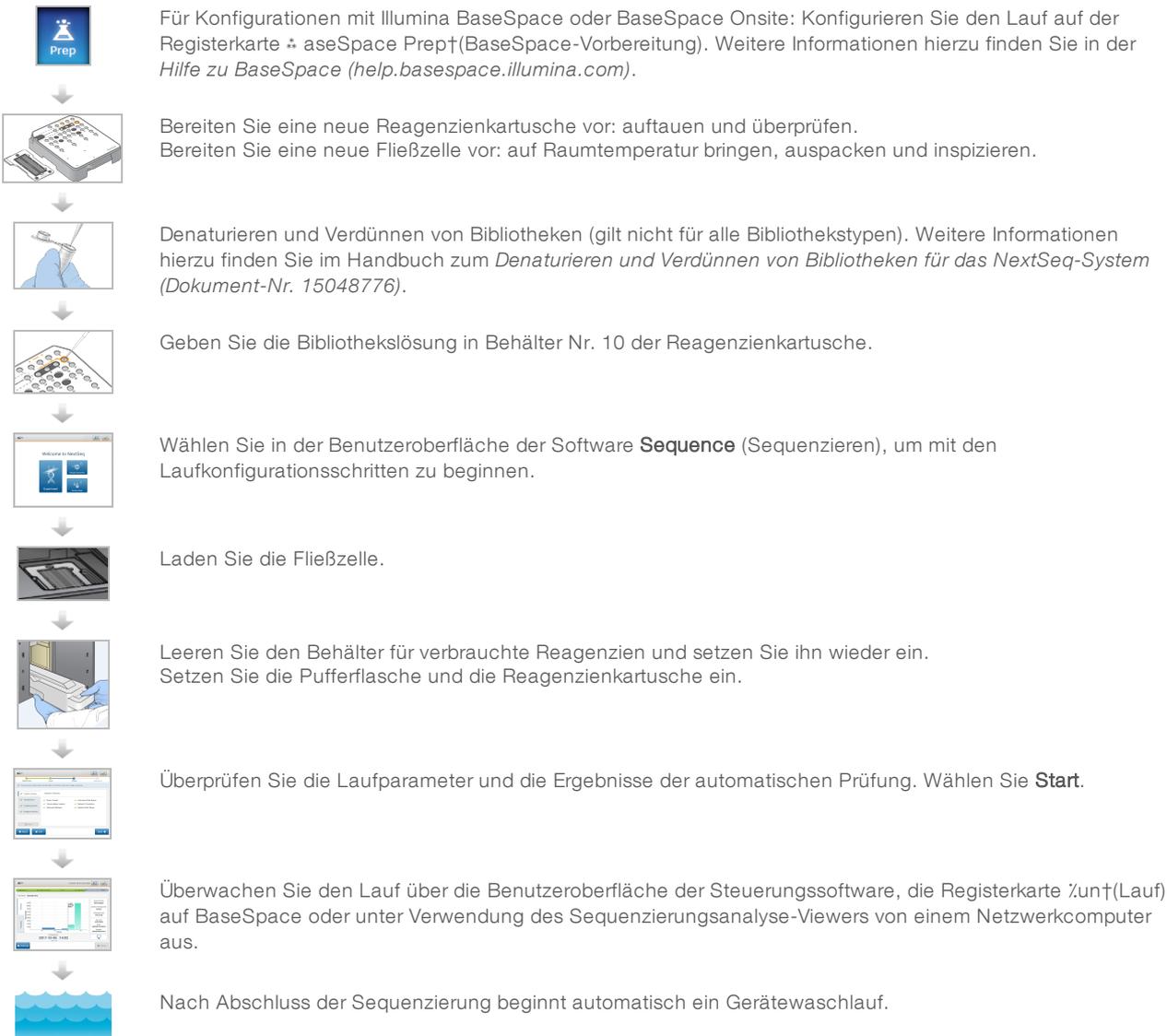
Dauer eines Sequenzierungslaufs

Die Dauer eines Sequenzierungslaufs hängt von der Anzahl der durchgeführten Zyklen ab. Die maximale Lauflänge ist ein Paired-End-Lauf von 150 Zyklen pro Read (2 x 150) und bis zu je acht Zyklen für zwei Index-Reads.

Anzahl der Zyklen in einem Read

Bei einem Sequenzierungslauf ist die Anzahl der in einem Read ausgeführten Zyklen um einen Zyklus höher als die Anzahl der analysierten Zyklen. Beispiel: Bei einem Paired-End-Lauf mit 150 Zyklen werden Reads von 151 Zyklen (2 x 151) ausgeführt, sodass sich eine Gesamtanzahl von 302 Zyklen ergibt. Am Ende des Laufs werden 2 x 150 Zyklen analysiert. Der zusätzliche Zyklus ist für Phasierungs- und Vorphasierungsberechnungen erforderlich.

Sequenzierungsworkflow



Vorbereiten der Reagenzienkartusche

Befolgen Sie die Anweisungen zur Reagenzienkartusche sorgfältig, um eine erfolgreiche Sequenzierung zu gewährleisten.

- 1 Nehmen Sie die Reagenzienkartusche aus dem -25 °C bis -15 °C kalten Lagerort heraus.
- 2 Wählen Sie eine der folgenden Methoden zum Auftauen der Reagenzien. Tauchen Sie die Kartusche nicht in Wasser. Trocknen Sie die Kartusche nach dem Auftauen ab, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren.

Temperatur	Auftauzeit	Stabilitätsgrenze
Wasserbad bei 15 °C bis 30 °C	60 Minuten	Nicht länger als 6 Stunden
2 °C bis 8 °C	7 Stunden	Nicht länger als 5 Tage



HINWEIS

Wenn mehrere Kartuschen im selben Wasserbad aufgetaut werden, verlängert sich die Auftauzeit.

- 3 Invertieren Sie die Kartuschen fünfmal, um die Reagenzien zu mischen.
- 4 Untersuchen Sie den Boden der Kartusche, um sicherzustellen, dass die Reagenzien aufgetaut und frei von Ausfällungen sind. Vergewissern Sie sich, dass die Positionen 29, 30, 31 und 32 aufgetaut sind. Sie sind größer als die anderen und haben die längste Auftaudauer.
- 5 Klopfen Sie leicht auf den Tisch, um die Anzahl der Luftblasen zu verringern. Die besten Ergebnisse erzielen Sie, wenn Sie direkt mit dem Laden der Probe und dem Konfigurieren des Laufs fortfahren.



WARNUNG

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

Vorbereiten der Fließzelle

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



HINWEIS

Sofern die Folienverpackung intakt ist, kann die Fließzelle bis zu 12 Stunden bei Raumtemperatur gelagert werden. Vermeiden Sie ein mehrmaliges Abkühlen und Erwärmen der Fließzelle.

Vorbereiten von Bibliotheken für die Sequenzierung

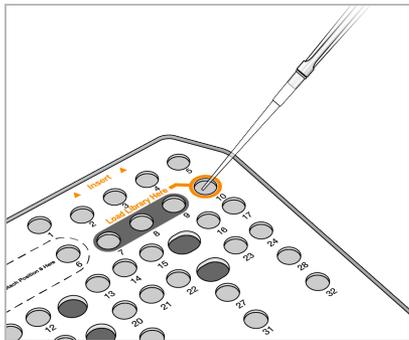
Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken

Denaturieren und verdünnen Sie Ihre Bibliotheken auf ein Ladevolumen von 1,3 ml und eine Ladekonzentration von 1,8 pM. In der Praxis kann die Ladekonzentration je nach Bibliotheksvorbereitungs- und Quantifizierungsmethode variieren. Anweisungen finden Sie im *Handbuch zum Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken für das NextSeq-System (Dokument-Nr. 15048776)*.

Laden der Bibliotheken in die Reagenzienkartusche

- 1 Reinigen Sie die Verschlussfolie, die den mit **Load Library Here** (Bibliothek hier laden) beschrifteten Behälter 10 abdeckt, mit einem fusselfreien Tuch.
- 2 Durchstechen Sie die Folie mit einer sauberen 1-ml-Pipettenspitze.
- 3 Geben Sie 1,3 ml der vorbereiteten 1,8-pM-Bibliotheken in den mit **Load Library Here** (Bibliothek hier laden) beschrifteten Behälter Nr. 10. Achten Sie beim Zuführen der Bibliotheken darauf, die Verschlussfolie nicht zu berühren.

Abbildung 10 Laden der Bibliotheken



Konfigurieren eines Sequenzierungsverlaufs

- 1 Wählen Sie im Startbildschirm **Experiment** (Versuch) und anschließend **Sequence** (Sequenzieren). Der „Sequence“-Befehl öffnet die Tür der Bildgebungskammer, gibt die Verbrauchsmaterialien aus dem vorherigen Lauf frei und öffnet eine Reihe von Bildschirmen für die Laufkonfiguration. Eine kurze Verzögerung ist normal.

Wenn das Gerät für BaseSpace konfiguriert ist, werden Sie aufgefordert, sich bei BaseSpace anzumelden. Wenn das Gerät für den eigenständigen Modus konfiguriert ist, ist der nächste Schritt das Laden der Fließzelle.

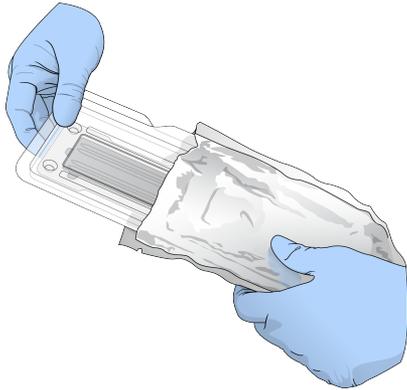
Anmelden bei BaseSpace

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

Laden der Fließzelle

- 1 Entfernen Sie die gebrauchte Fließzelle aus dem vorherigen Lauf.
- 2 Nehmen Sie die Fließzelle aus der Folienverpackung.

Abbildung 11 Entnehmen der Fließzelle aus der Folienverpackung



- 3 Öffnen Sie die klare, aufklappbare Plastikverpackung und nehmen Sie die Fließzelle heraus.

Abbildung 12 Herausnehmen aus der aufklappbaren Verpackung



- 4 Reinigen Sie die Glasoberfläche der Fließzelle mit einem fusselfreien Alkoholtupfer. Trocknen Sie das Glas mit einem fusselfreien Labortuch.

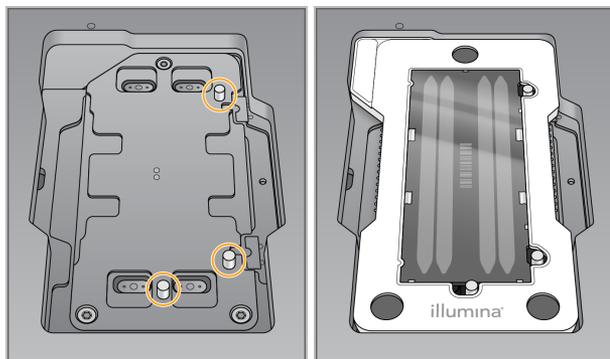


HINWEIS

Vergewissern Sie sich, dass die Glasoberfläche der Fließzelle sauber ist. Wiederholen Sie gegebenenfalls den Reinigungsschritt.

- 5 Richten Sie die gebrauchte Fließzelle über den Ausrichtungsstiften aus und legen Sie sie auf den Fließzellentisch.

Abbildung 13 Laden der Fließzelle



- 6 Wählen Sie **Load** (Laden).
Die Tür wird automatisch geschlossen, die Fließzellen-ID wird angezeigt und die Sensoren sind markiert.



HINWEIS

Greifen Sie nicht an die Fließzellentür, während diese sich schließt, um Quetschungen zu vermeiden.

- 7 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Leeren des Behälters für verbrauchte Reagenzien

- 1 Öffnen Sie die Pufferkammer mit dem Riegel unterhalb der unteren linken Türkante.
- 2 Entfernen Sie den Behälter für verbrauchte Reagenzien und entsorgen Sie den Inhalt gemäß den geltenden Vorschriften.

Abbildung 14 Entfernen des Behälters für verbrauchte Reagenzien



HINWEIS

Halten Sie Ihre andere Hand beim Entfernen unter den Behälter, um ihn zu stützen.

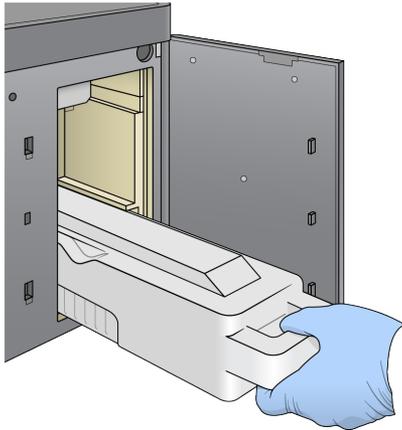


WARNUNG

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

- 3 Schieben Sie den leeren Behälter für verbrauchte Reagenzien bis zum Anschlag in die Pufferkammer. Ein hörbares Klicken gibt an, dass der Behälter positioniert ist.

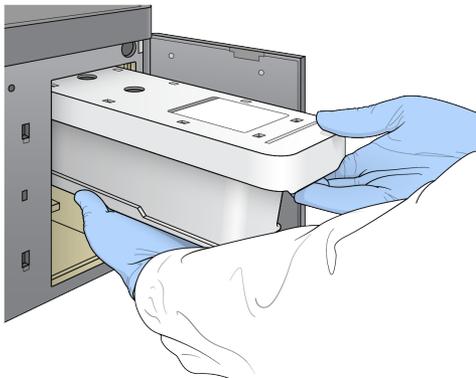
Abbildung 15 Einsetzen des Behälters für verbrauchte Reagenzien



Einsetzen der Pufferflasche

- 1 Entfernen Sie die gebrauchte Pufferflasche aus der oberen Kammer.
Zum Anheben und Herausziehen der Pufferflasche ist etwas Kraft erforderlich.
- 2 Schieben Sie eine neue Pufferflasche bis zum Anschlag in die Pufferkammer.
Ein hörbares Klicken gibt an, dass die Flasche positioniert ist. Auf dem Bildschirm wird die Pufferflaschen-ID angezeigt und der Sensor ist markiert.

Abbildung 16 Einsetzen der Pufferflasche



- 3 Schließen Sie die Pufferkammertür und wählen Sie **Next** (Weiter).

Laden der Reagenzienkartusche

- 1 Öffnen Sie die Tür der Reagenzienkammer mit dem Riegel unterhalb der unteren rechten Türkante.
- 2 Entfernen Sie die gebrauchte Reagenzienkartusche aus der Reagenzienkammer. Entsorgen Sie die nicht verbrauchten Inhalte gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften.



WARNUNG

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

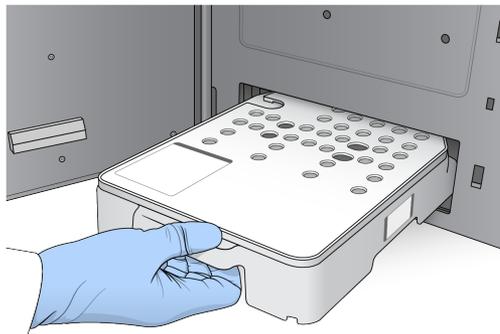


HINWEIS

Um die sichere Entsorgung nicht verwendeter Reagenzien zu erleichtern, kann der Behälter in Position 6 entfernt werden. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Herausnehmen des gebrauchten Behälters in Position 6 auf Seite 22*.

- Schieben Sie die Reagenzienkartusche bis zum Anschlag in die Reagenzienkammer und schließen Sie dann die Tür der Reagenzienkammer.

Abbildung 17 Laden der Reagenzienkartusche

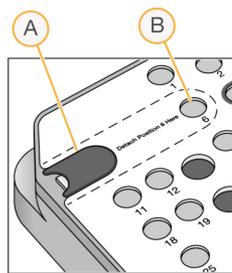


- Wählen Sie **Load** (Laden).
Die Software bringt die Kartusche automatisch in Position (ca. 30 Sekunden), die ID der Reagenzienkartusche wird angezeigt und die Sensoren sind markiert.
- Wählen Sie **Next** (Weiter).

Herausnehmen des gebrauchten Behälters in Position 6

- Nachdem Sie die **gebrauchte** Reagenzienkartusche aus dem Gerät entfernt haben, nehmen Sie die Gummischutzabdeckung über dem Schlitz neben Position 6 ab.

Abbildung 18 Entfernbare Position 6



- A Gummiabdeckung
- B Position 6

- 2 Drücken Sie auf den durchsichtigen Plastikgriff und schieben Sie ihn nach links, um den Behälter zu entfernen.
- 3 Entsorgen Sie den Behälter gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften.

Festlegen von Laufparametern

Die Schritte im Laufkonfigurationsbildschirm unterscheiden sich je nach Systemkonfiguration:

- ▶ **BaseSpace oder BaseSpace Onsite:** Im Laufkonfigurationsbildschirm werden Läufe aufgeführt, die auf der Registerkarte „BaseSpace Prep“ (BaseSpace-Vorbereitung) konfiguriert wurden. Falls der beabsichtigte Lauf nicht auf dem Laufkonfigurationsbildschirm angezeigt wird, vergewissern Sie sich, dass in BaseSpace der Lauf für die Sequenzierung markiert wurde.
- ▶ **Eigenständig:** Der Laufkonfigurationsbildschirm verfügt über Felder zum Definieren der Laufparameter.

Auswählen eines verfügbaren Laufs (BaseSpace-Konfiguration)

- 1 Wählen Sie den Namen eines Laufs aus der Liste der verfügbaren Läufe aus.
Verwenden Sie die Nach-oben- und Nach-unten-Pfeile, um durch die Liste zu blättern, oder geben Sie den Namen eines Laufs im Feld „Search“ (Suchen) ein.
- 2 Wählen Sie **Next** (Weiter).
- 3 Prüfen Sie die Laufparameter.
 - ▶ **Run Name** (Name des Laufs): Name des Laufs, wie er in BaseSpace zugewiesen wurde.
 - ▶ **Library ID** (Bibliotheks-ID): Name der Pool-Bibliotheken, wie sie in BaseSpace zugewiesen wurden.
 - ▶ **Recipe** (Rezeptur): Name der Rezeptur, entweder **NextSeq High** oder **NextSeq Mid**, je nachdem, welche Reagenzienkartusche für den Lauf verwendet wird.
 - ▶ **Read Type** (Read-Typ): Single Read oder Paired End.
 - ▶ **Read Length** (Read-Länge): Anzahl der Zyklen für jeden Read.
 - ▶ **[Optional]** Anwendungsspezifische Primer, falls anwendbar.
- 4 **[Optional]** Wählen Sie zum Ändern der Laufparameter die Schaltfläche **Edit** (Bearbeiten). Wenn Sie fertig sind, wählen Sie **Save** (Speichern).
 - ▶ **Run parameters** (Laufparameter): Ändern Sie die Anzahl der Reads oder die Anzahl der Zyklen pro Read.
 - ▶ **Custom primers** (Anwendungsspezifische Primer): Ändern Sie die Einstellungen für anwendungsspezifische Primer. Weitere Informationen finden Sie im *NextSeq-Benutzerhandbuch für anwendungsspezifische Primer (Dokument-Nr. 15057456)*.

- ▶ **Purge consumables for this run** (Verbrauchsmaterialien für diesen Lauf entsorgen): Ändern Sie die Einstellung, um nach dem aktuellen Lauf Verbrauchsmaterialien automatisch zu entsorgen.

5 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Eingeben der Laufparameter (eigenständige Konfiguration)

- Geben Sie einen beliebigen Namen ein.
- [Optional]** Geben Sie eine beliebige Bibliotheks-ID ein.
- Wählen Sie einen Read-Typ aus: **Single Read** oder **Paired End**.
- Geben Sie die Anzahl der Zyklen für jeden Read des Sequenzierungslaufs an:
 - ▶ **Read 1:** Geben Sie einen Wert von bis zu 151 Zyklen ein.
 - ▶ **Index 1:** Geben Sie die Anzahl der Zyklen ein, die für den Index 1 (i7) Primer erforderlich sind.
 - ▶ **Index 2:** Geben Sie die Anzahl der Zyklen ein, die für den Index 2 (i5) Primer erforderlich sind.
 - ▶ **Read 2:** Geben Sie einen Wert von bis zu 151 Zyklen ein. Dieser Wert ist in der Regel mit dem Wert von Read 1 identisch.

Die Steuerungssoftware überprüft Ihre Eingaben anhand der folgenden Kriterien:

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

5 **[Optional]** Wenn Sie anwendungsspezifische Primer verwenden, aktivieren Sie das jeweilige Kontrollkästchen für die verwendeten Primer. Weitere Informationen finden Sie im *NextSeq-Benutzerhandbuch zu anwendungsspezifischen Primern (Dokument-Nr. 15057456)*.

- ▶ **Read 1:** Anwendungsspezifischer Primer für Read 1.
- ▶ **Index 1:** Anwendungsspezifischer Primer für Index 1.
- ▶ **Index 2:** Anwendungsspezifischer Primer für Index 2.
- ▶ **Read 2:** Anwendungsspezifischer Primer für Read 2.

6 **[Optional]** Wählen Sie zum Ändern der Laufparameter die Schaltfläche **Advanced Settings**  (Erweiterte Einstellungen).

- ▶ Wählen Sie aus der Dropdown-Liste **Recipe** (Rezeptur) eine Rezeptur aus. Es werden nur kompatible Rezepturen aufgelistet.
- ▶ **Output folder location** (Speicherort des Ausgabeordners): Ändern Sie den Speicherort für den Ausgabeordner des aktuellen Laufs. Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zu einem Netzwerkspeicherort.
- ▶ **Included file** (Enthaltene Datei): Wählen Sie Dateien aus, die für mögliche weitere Analysen im Ausgabeordner enthalten sein sollen, z. B. Manifestdateien und Probenlisten.
- ▶ **Purge consumables for this run** (Verbrauchsmaterialien für diesen Lauf entsorgen): Ändern Sie die Einstellung, um nach dem aktuellen Lauf Verbrauchsmaterialien automatisch zu entsorgen.
- ▶ **Use run monitoring for this run** (Laufüberwachung für diesen Lauf verwenden): Ändern Sie diese Einstellung, um die Laufüberwachung in BaseSpace zu verwenden.

7 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Überprüfen des Selbsttests

Die Software führt einen automatisierten Selbsttest des Systems durch. Während dieses Tests werden die folgenden Symbole auf dem Bildschirm angezeigt:

- ▶ **Graues Häkchen:** Zeigt an, dass der Test noch nicht durchgeführt wurde.

- ▶ **Fortschrittsymbol** : Zeigt an, dass die Prüfung läuft.
- ▶ **Grünes Häkchen**: Zeigt an, dass die Prüfung bestanden wurde.
- ▶ **Rotes X**: Zeigt an, dass der Test nicht bestanden wurde. Bei allen Elementen, die den Test nicht bestehen, ist eine Aktion erforderlich, bevor Sie fortfahren können. Siehe *Beheben von Fehlern der automatischen Prüfung auf Seite 46*.

Wählen Sie die Schaltfläche **Cancel** (Abbrechen), um laufende automatische Tests zu beenden. Wählen Sie die Schaltfläche **Retry** (Wiederholen), um den Test erneut zu starten. Der Selbsttest wird beim ersten unvollständigen oder fehlgeschlagenen Test fortgesetzt.

Wählen Sie die Registerkarte „Category“ (Kategorie), um die Ergebnisse der einzelnen Tests einer Kategorie anzuzeigen.

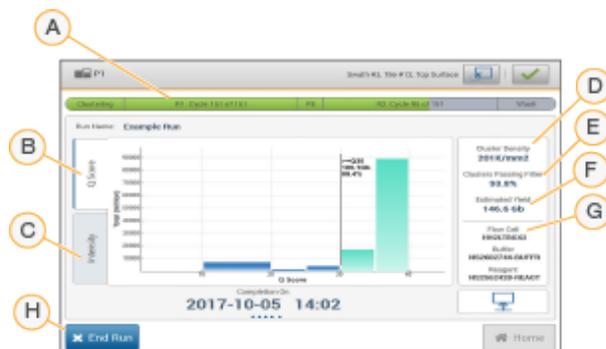
Starten des Laufs

Wählen Sie nach Abschluss des automatisierten Selbsttests **Start**. Der Sequenzierungslauf wird gestartet. Informationen darüber, wie Sie das System so konfigurieren, dass nach einem bestandenen Test der Lauf automatisch gestartet wird, finden Sie unter *Festlegen von Laufkonfigurationsoptionen auf Seite 13*.

Überwachen des Lauffortschritts

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

Abbildung 19 Fortschritt und Kennzahlen eines Sequenzierungslaufs



- A **Run progress** (Lauffortschritt): Zeigt den aktuellen Schritt und die Anzahl der durchgeführten Zyklen für jeden Read-Vorgang an. Die Fortschrittsanzeige steht nicht im Verhältnis zur Laufgeschwindigkeit der einzelnen Schritte. Das geschätzte Datum und die geschätzte Uhrzeit für den Abschluss des Laufs werden unten im Fenster angezeigt.
- B **Q-Score**: Zeigt die Verteilung der Qualitäts-Scores (Q-Scores) an. Siehe *Qualitätsbewertung auf Seite 61*.
- C **Intensity** (Intensität): Zeigt den Wert der Clusterintensitäten auf der 90. Perzentile für jede Platte an. Die Basen werden durch die Plot-Farben gekennzeichnet: A ist rot, C ist grün, G ist blau und T ist schwarz.
- D **Cluster Density (K/mm²)** (Clusterdichte): Zeigt die Anzahl an Clustern, die für den Lauf erkannt wurden.
- E **Clusters Passing Filter (%)** (Cluster nach Filterung): Zeigt den Prozentsatz der Cluster nach Filterung an. Siehe *Cluster nach Filterung auf Seite 60*.
- F **Estimated Yield (Gb)** (Geschätzte Menge): Zeigt die beabsichtigte Anzahl der Basen für den geplanten Lauf an.

- G **Lot Information** (Chargeninformationen): Zeigt die Chargennummern der Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien. Für die Fließzellenummer wird die Seriennummer aufgeführt.
- H **End Run** (Lauf beenden): Stoppt den aktuellen Sequenzierungslauf. Die Verbrauchsmaterialien können nicht erneut verwendet werden.



HINWEIS

Nachdem Sie „Home“ (Startseite) ausgewählt haben, können Sie nicht mehr zur Anzeige der Laufkennzahlen zurückkehren. Die Laufkennzahlen sind allerdings auf BaseSpace vorhanden und können zudem von einem eigenständigen Computer aus mit dem Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) angezeigt werden.

Zyklen für Laufkennzahlen

Laufkennzahlen erscheinen zu verschiedenen Zeitpunkten während eines Laufs.

- ▶ Während der Schritte für die Clusterbildung werden keine Kennzahlen angezeigt.
- ▶ Die ersten fünf Zyklen sind der Matrizenbildung vorbehalten.
- ▶ Laufkennzahlen werden nach Zyklus 25 angezeigt und umfassen Clusterdichte, Cluster nach Filterung, Menge und Qualitäts-Scores.

Datenübertragung

Status	Illumina BaseSpace	BaseSpace Onsite	Eigenständiges Gerät
Verbunden			
Verbunden und überträgt Daten			
Nicht verbunden			
Deaktiviert			

Je nach ausgewählter Analysekonfiguration erscheint während des Laufs ein Symbol auf dem Bildschirm, um den Status der Datenübertragung anzuzeigen.

Falls während des Laufs die Datenübertragung unterbrochen wird, werden die Daten vorübergehend auf dem Gerätecomputer gespeichert. Nach Wiederherstellung der Verbindung wird die Datenübertragung automatisch fortgesetzt. Falls die Verbindung nicht vor Abschluss des Laufs wiederhergestellt wird, löschen Sie manuell die auf dem Gerätecomputer temporär gespeicherten Daten, bevor Sie einen neuen Lauf starten.

Laufkopierdienst

Die NextSeq 550Dx System Software Suite enthält einen Laufkopierdienst. RTA v2 sendet die Anforderung an den Dienst, Dateien von einer Quelle auf ein Ziel zu kopieren. Der Dienst verarbeitet Anforderungen in der Reihenfolge, in der sie eingeht. Falls eine Ausnahme eintritt, wird je nach Anzahl der Dateien in der Warteschlange die Datei wieder in die Warteschlange eingereiht.

Sequenzierungsanalyse-Viewer

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

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

Automatische Nachwaschung

Nach Abschluss des Sequenzierungslaufs wird ein automatischer Nachwaschlauf mit der Waschlösung in der Pufferflasche und dem NaOCl in der Reagenzienkartusche initiiert. Wenn die Option „Purge consumables“ (Verbrauchsmaterialien entsorgen) für den Lauf aktiviert ist, erfolgt die Entsorgung vor der automatischen Nachwaschung.

Der automatische Nachwaschlauf dauert etwa 90 Minuten. Nach Abschluss des Waschlaufs wird die Schaltfläche „Home“ (Startseite) wieder aktiviert. Während des Waschlaufs bleiben die Sequenzierungsergebnisse auf dem Bildschirm eingeblendet.

Nach dem Waschlauf

Nach dem Waschlauf bleiben die Sipper in der unteren Position, wodurch verhindert wird, dass Luft in das System eindringt. Lassen Sie die Kartuschen bis zur nächsten Ausführung stehen.

Scannen

Einleitung	29
Scan-Workflow	30
Herunterladen des DMAP-Ordners	30
Einsetzen des BeadChips in den Adapter	31
Konfigurieren eines Scan-Vorgangs	32
Überwachen des Scan-Fortschritts	34

Einleitung

Zur Durchführung eines Scan-Vorgangs auf dem NextSeq 550Dx-Gerät benötigen Sie folgende Laufkomponenten:

- ▶ Einen hybridisierten und mit Stain versetzten BeadChip
- ▶ Den wiederverwendbaren BeadChip-Adapter
- ▶ DMAP-Dateien für den von Ihnen verwendeten BeadChip
- ▶ Eine Manifestdatei für den von Ihnen verwendeten BeadChip-Typ
- ▶ Eine Clusterdatei für den von Ihnen verwendeten BeadChip-Typ

Beim Scan-Vorgang werden Ausgabedateien generiert und in eine Warteschlange zum Übertragen an den angegebenen Ausgabeordner eingereiht.

Führen Sie die Analyse mithilfe der BlueFuse Multi-Software durch. Dies setzt voraus, dass die Scan-Daten im Dateiformat GTC (Genotypaufruf) vorliegen. Das NextSeq 550Dx-Gerät generiert standardmäßig normalisierte Daten und zugeordnete Genotypaufrufe im Format einer GTC-Datei. Optional können Sie das Gerät so konfigurieren, dass zusätzliche IDAT-Dateien (Intensitätsdaten) generiert werden. Weitere Informationen finden Sie unter *BeadChip-Scan-Konfiguration* auf Seite 55.

Decode File Client

Der DMAP-Ordner enthält Informationen, die die Position der Beads auf dem BeadChip identifizieren, und quantifiziert das jedem Bead zugeordnete Signal. Für jeden BeadChip-Barcode gibt es einen eindeutigen DMAP-Ordner.

Mit der Decode File Client Utility können Sie unter Verwendung des Standard-HTTP-Protokolls DMAP-Ordner direkt von Illumina-Servern herunterladen.

Der Decode File Client steht auf der [Decode File Client-Supportseite](https://support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html) der Illumina-Website (support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html) zur Verfügung. Installieren Sie den Decode File Client auf einem Computer mit Zugriff auf den Netzwerkspeicherort des DMAP-Ordners.

Weitere Informationen finden Sie unter *Herunterladen des DMAP-Ordners* auf Seite 30.

Manifest- und Clusterdateien

Für jeden BeadChip muss die Software auf eine Manifest- und eine Clusterdatei zugreifen. Die Manifest- und Clusterdateien sind für jeden BeadChip-Typ eindeutig. Stellen Sie sicher, dass im Namen der von Ihnen verwendeten Clusterdateien „NS550“ vorkommt. Diese Dateien sind mit dem NextSeq 550Dx-System kompatibel.

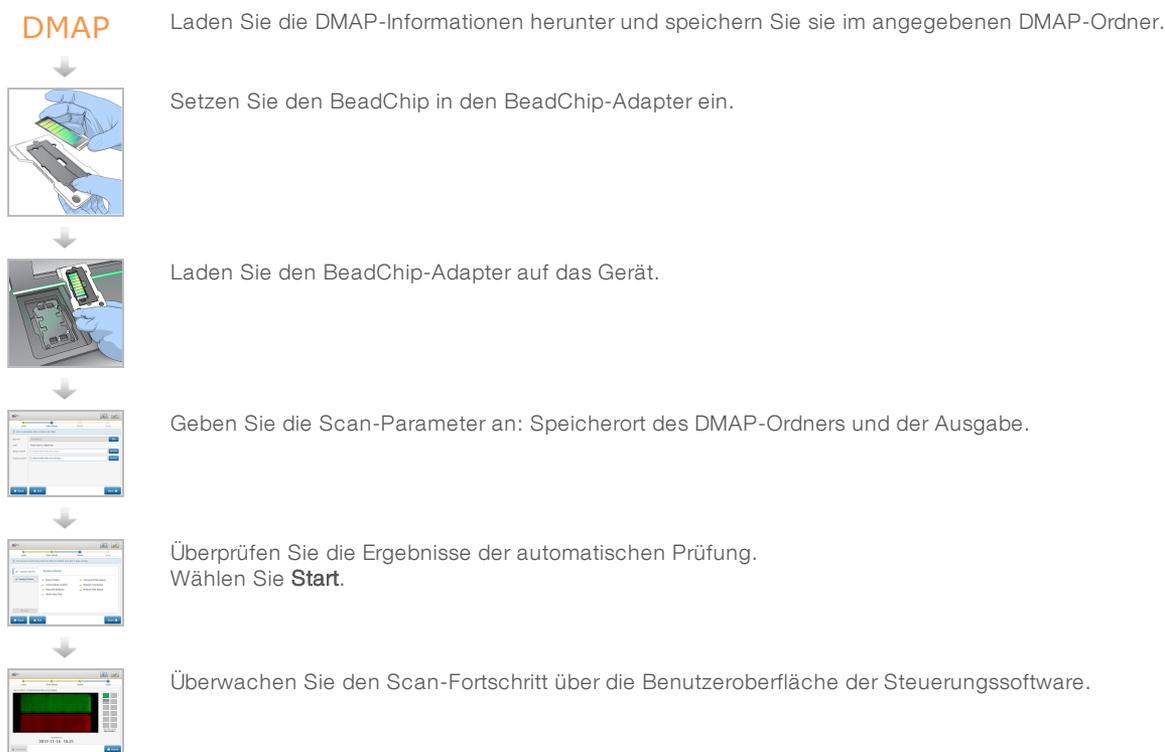
- ▶ **Manifestdatei:** Manifestdateien beschreiben den SNP- (Einzelnukleotid-Polymorphismus) oder Sondeninhalt auf einem BeadChip. Das Dateiformat der Manifestdateien ist *.bpm.

- ▶ **Clusterdateien:** Clusterdateien beschreiben die Clusterpositionen für den Illumina-Genotypisierungsarray und werden beim Analysieren der Daten für den Genotypaufruf verwendet. Das Dateiformat der Clusterdateien ist *.egt.

Der Speicherort der Dateien wird auf dem Bildschirm „BeadChip Scan Configuration“ (BeadChip-Scan-Konfiguration) angegeben. Wählen Sie im NCS-Startbildschirm **Manage Instrument** (Gerät verwalten), **System Configuration** (Systemkonfiguration) und anschließend **BeadChip Scan Configuration** (BeadChip-Scan-Konfiguration).

Beim Installieren des NextSeq 550Dx-Geräts lädt der Illumina-Mitarbeiter diese Dateien herunter und legt den Pfad in der Steuerungssoftware fest. Außer im Falle von Verlust oder der Verfügbarkeit einer neuen Version besteht keine Notwendigkeit, diese Dateien zu ersetzen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter [Ersetzen von Manifest- und Clusterdateien auf Seite 52](#).

Scan-Workflow



Herunterladen des DMAP-Ordners

Sie können mithilfe des Decode File Client nach Konto oder nach BeadChip (Standardansicht) auf den DMAP-Ordner zugreifen.

Zugriff auf den DMAP-Ordner nach Konto

- 1 Wählen Sie auf der Hauptregisterkarte des Decode File Client eine Option für das Herunterladen:
 - ▶ AutoPilot
 - ▶ All BeadChips not yet downloaded (Alle BeadChips noch nicht heruntergeladen)
 - ▶ All BeadChips (Alle BeadChips)
 - ▶ BeadChips by Purchase Order (BeadChips nach Auftragsbestätigung)

- ▶ BeadChips by barcode (BeadChips nach Barcode)
- 2 Geben Sie die erforderlichen Informationen ein.
 - 3 Wählen Sie den DMAP-Ordner aus, den Sie herunterladen möchten.
 - 4 Stellen Sie sicher, dass genügend freier Speicherplatz für den Ordner verfügbar ist.
 - 5 Laden Sie den Ordner herunter. Auf der Registerkarte „Download Status and Log“ (Download-Status und Protokoll) können Sie den Download-Status ansehen.
 - 6 Speichern Sie den DMAP-Ordner im angegebenen Speicherort.

Zugriff auf den DMAP-Ordner nach BeadChip

- 1 BeadChips können mit zwei der folgenden Optionen identifiziert werden:
 - ▶ BeadChip-Barcode
 - ▶ BeadChips-Box-ID
 - ▶ Auftragsbestätigungs-Nr.
 - ▶ Auftragsnummer
- 2 Wählen Sie den DMAP-Ordner aus, den Sie herunterladen möchten.
- 3 Stellen Sie sicher, dass genügend freier Speicherplatz für den Ordner verfügbar ist.
- 4 Laden Sie den Ordner herunter. Auf der Registerkarte „Download Status and Log“ (Download-Status und Protokoll) können Sie den Download-Status ansehen.
- 5 Speichern Sie den DMAP-Ordner im angegebenen Speicherort.

Einsetzen des BeadChips in den Adapter

- 1 Drücken Sie die Halteklammer des Adapters nach unten. Die Klammer kippt leicht nach hinten.
- 2 Halten Sie den BeadChip an den Kanten fest, positionieren Sie ihn so, dass der Barcode zur Halteklammer weist, und setzen Sie den BeadChip in das Adapterfach ein.

Abbildung 20 Einsetzen des BeadChips in den Adapter



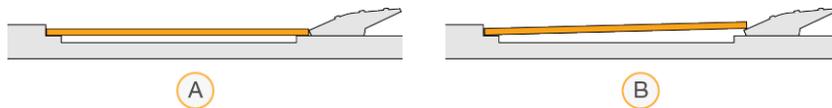
- 3 Verwenden Sie die seitlichen Öffnungen des BeadChips, um ihn sicher im Adapterfach zu platzieren.

Abbildung 21 Einsetzen und Befestigen des BeadChips



- 4 Lassen Sie die Halteklammer behutsam los, um den BeadChip zu befestigen.
- 5 Prüfen Sie durch seitliches Betrachten, ob der BeadChip flach auf dem Adapter sitzt. Positionieren Sie ggf. den BeadChip neu.

Abbildung 22 Überprüfen der korrekten Position des BeadChips



- A Richtige Position: Der BeadChip liegt flach auf dem Adapter, wenn die Klammer losgelassen wird.
B Falsche Position: Der BeadChip liegt nicht flach auf dem Adapter, wenn die Klammer losgelassen wird.

Konfigurieren eines Scan-Vorgangs

- 1 Wählen Sie im Startbildschirm **Experiment** (Versuch) und anschließend **Scan** (Scannen).
Der „Scan“-Befehl öffnet die Tür der Bildgebungskammer, gibt die Verbrauchsmaterialien aus dem vorherigen Lauf frei (sofern vorhanden) und öffnet eine Reihe von Bildschirmen für die Konfiguration des Scan-Vorgangs. Eine kurze Verzögerung ist normal.

Entladen der Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien

Falls beim Konfigurieren eines Scan-Vorgangs verbrauchte Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien vorhanden sind, werden Sie aufgefordert, die Reagenzienkartusche und die Pufferflasche zu entladen, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren.

- 1 Wenn Sie dazu aufgefordert werden, entfernen Sie die verbrauchten Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien eines vorherigen Sequenzierungslaufs.
 - a Entfernen Sie die Reagenzienkartusche aus der Reagenzienkammer. Entsorgen Sie die nicht verbrauchten Inhalte gemäß den geltenden Sicherheitsvorschriften.
 - b Entfernen Sie die gebrauchte Pufferflasche aus der Pufferkammer.



WARNUNG

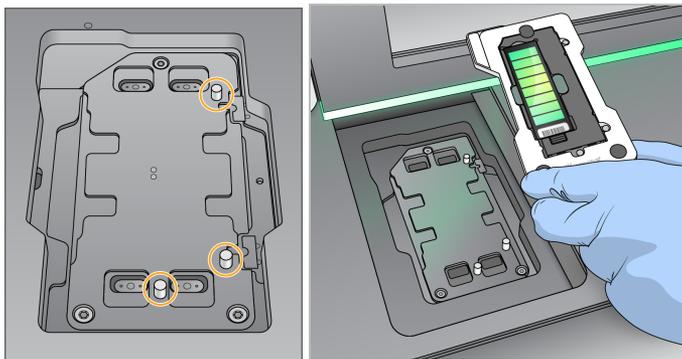
Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille,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

- 2 Nehmen Sie die Fließzelle aus der Bildgebungskammer.
- 3 Schließen Sie die Tür der Reagenzien- und der Pufferkammer.

Laden des BeadChip-Adapters

- 1 Verwenden Sie zum Positionieren des BeadChip-Adapters auf dem Tisch die Ausrichtungsstifte.

Abbildung 23 Laden des BeadChip-Adapters



- 2 Wählen Sie **Load** (Laden).
Die Tür wird automatisch geschlossen, die BeadChip-ID wird auf dem Bildschirm angezeigt und die Sensoren sind markiert. Eine kurze Verzögerung ist normal. Falls der BeadChip-Barcode nicht eingelesen werden kann, erscheint ein Dialogfeld, in das Sie den Barcode manuell eingeben können. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Software kann den BeadChip-Barcode nicht einlesen* auf Seite 51.
- 3 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Scan-Konfiguration

- 1 Überprüfen Sie im Bildschirm „Scan Setup“ (Scan-Konfiguration) die folgenden Informationen:
 - ▶ **Barcode**: Die Software liest den BeadChip-Barcode, wenn der BeadChip eingesetzt wird. Sofern der Barcode manuell eingegeben wurde, erscheint die Schaltfläche „Edit“ (Bearbeiten), um ggf. Änderungen vorzunehmen.
 - ▶ **Type** (Typ): Die Angabe in diesem Feld wird automatisch eingetragen. Sie basiert auf dem BeadChip-Barcode.
 - ▶ **DMAP Location** (DMAP-Speicherort): Der Speicherort des DMAP-Ordners wird auf dem Bildschirm „BeadChip Scan Configuration“ (BeadChip-Scan-Konfiguration) angegeben. Wenn Sie nur den Speicherort des aktuellen Scan-Vorgangs ändern möchten, wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zum entsprechenden Speicherort.

- ▶ **Output Location** (Ausgabespeicherort): Der Speicherort der Ausgabedateien wird auf dem Bildschirm „BeadChip Scan Configuration“ (BeadChip-Scan-Konfiguration) angegeben. Wenn Sie nur den Speicherort des aktuellen Scan-Vorgangs ändern möchten, wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zum gewünschten Speicherort.

2 Wählen Sie **Next** (Weiter).

Überprüfen des Selbsttests

Die Software führt einen automatisierten Selbsttest des Systems durch. Während dieses Tests werden die folgenden Symbole auf dem Bildschirm angezeigt:

- ▶ **Graues Häkchen:** Zeigt an, dass der Test noch nicht durchgeführt wurde.
- ▶ **Fortschrittsymbol** : Zeigt an, dass die Prüfung läuft.
- ▶ **Grünes Häkchen:** Zeigt an, dass die Prüfung bestanden wurde.
- ▶ **Rotes X:** Zeigt an, dass der Test nicht bestanden wurde. Bei allen Elementen, die den Test nicht bestehen, ist eine Aktion erforderlich, bevor Sie fortfahren können. Siehe *Beheben von Fehlern der automatischen Prüfung auf Seite 46*.

Wählen Sie die Schaltfläche **Cancel** (Abbrechen), um laufende automatische Tests zu beenden. Wählen Sie die Schaltfläche **Retry** (Wiederholen), um den Test erneut zu starten. Der Selbsttest wird beim ersten unvollständigen oder fehlgeschlagenen Test fortgesetzt.

Wählen Sie die Registerkarte „Category“ (Kategorie), um die Ergebnisse der einzelnen Tests einer Kategorie anzuzeigen.

Starten des Scan-Vorgangs

Wählen Sie nach Abschluss der automatischen Prüfung **Start** (Starten). Der Scan-Vorgang beginnt.

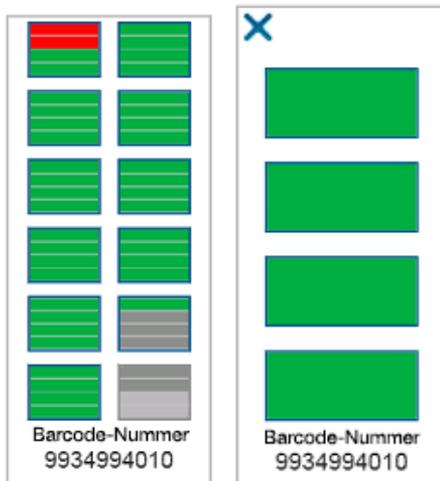
Informationen darüber, wie Sie das System so konfigurieren, dass nach einer bestandenen Prüfung der Scan-Vorgang automatisch gestartet wird, finden Sie unter *Festlegen von Laufkonfigurationsoptionen auf Seite 13*.

Überwachen des Scan-Fortschritts

- 1 Sie überwachen den Scan-Fortschritt mithilfe des BeadChip-Bilds. Jede Farbe des Bilds gibt den Status des Scans an.
 - ▶ **Hellgrau:** Nicht gescannt
 - ▶ **Dunkelgrau:** Gescannt, aber nicht registriert
 - ▶ **Grün:** Gescannt und erfolgreich registriert
 - ▶ **Rot:** Das Scannen und die Registrierung sind fehlgeschlagen.

Falls die Registrierung fehlschlägt, können Sie die Proben mit fehlgeschlagenen Abschnitten erneut scannen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Fehlerhafter BeadChip-Scan-Vorgang auf Seite 51*.
- 2 Wählen Sie das BeadChip-Bild, um zwischen einer Gesamt- und einer Detailansicht umzuschalten.
 - ▶ In der Gesamtansicht werden sowohl die Proben auf dem BeadChip als auch die Abschnitte in den einzelnen Proben angezeigt.
 - ▶ In der Detailansicht wird jeder Abschnitt innerhalb der ausgewählten Probe angezeigt.

Abbildung 24 BeadChip-Bild: Gesamt- und Detailansicht

**HINWEIS**

Das Beenden eines Scan-Vorgangs ist endgültig. Falls Sie den Scan-Vorgang beenden, bevor er abgeschlossen ist, werden die Scan-Daten *nicht* gespeichert.

Datenübertragung

Daten werden für die Übertragung an den Scan-Ausgabeordner in die Warteschlange eingereiht, sobald der Scan-Vorgang abgeschlossen ist. Die Daten werden vorübergehend im Gerätecomputer gespeichert. Der temporäre Ordner auf dem Gerätecomputer wird automatisch gelöscht, sobald der nächste Scan-Vorgang gestartet wird.

Die Datenübertragungsdauer hängt von der Geschwindigkeit der Netzwerkverbindung ab. Stellen Sie vor Beginn des nächsten Scan-Vorgangs sicher, dass die Daten im Ausgabeordner gespeichert wurden. Dies ist der Fall, wenn sich GTC-Dateien im Barcode-Ordner befinden. Weitere Informationen finden Sie unter *Ordnerstruktur der ausgegebenen Scan-Daten* auf Seite 67.

Falls die Verbindung unterbrochen wird, wird die Datenübertragung automatisch fortgesetzt, sobald die Verbindung wiederhergestellt wurde. Jede Datei muss innerhalb einer Stunde nach ihrer Einreihung in die Warteschlange an den Ausgabeordner übertragen werden. Nach Ablauf dieser Frist oder wenn das Gerät vor dem Ende der Übertragung neu gestartet wird, werden die Daten nicht an den Ausgabeordner übertragen.

Kapitel 5 Wartung

Einleitung	37
Durchführen eines manuellen Waschlaufrs	37
Austausch des Luftfilters	40
Software-Updates	41
Optionen für das Ausschalten und Neustarten des Geräts	43

Einleitung

Zu den Wartungsverfahren gehören manuelle Gerätewaschläufe und Systemsoftware-Updates (wenn verfügbar).

- ▶ **Gerätewaschläufe:** Die Geräte bleiben einsatzbereit, wenn Sie einen automatischen Nachwaschlauf nach jedem Sequenzierungslauf durchführen. Ein manueller Waschlauf ist jedoch regelmäßig unter bestimmten Bedingungen erforderlich. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Durchführen eines manuellen Waschlaufrs* auf Seite 37.
- ▶ **Software-Updates:** Wenn eine aktualisierte Version der Systemsoftware verfügbar ist, können Sie das Update automatisch über eine Verbindung mit BaseSpace oder manuell nach dem Herunterladen des Installationsprogramms von der Illumina-Website durchführen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Software-Updates* auf Seite 41.
- ▶ **Luftfilterwechsel:** Der regelmäßige Austausch des Luftfilters gewährleistet eine gute Luftzirkulation im Gerät.

Präventive Wartung

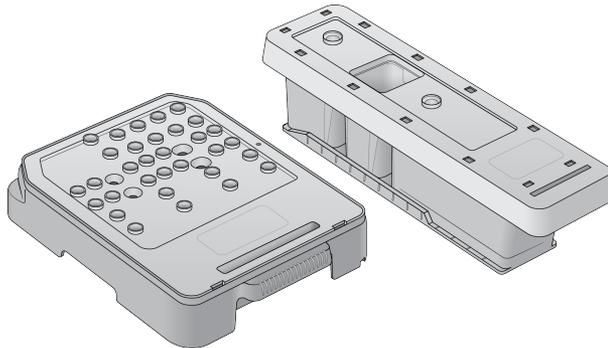
Illumina empfiehlt, jährlich eine präventive Wartung durchführen zu lassen. Wenn Sie keinen Servicevertrag abgeschlossen haben, wenden Sie sich an den für Ihre Region zuständigen Kundenbetreuer oder an den technischen Support von Illumina, um einen Termin für eine kostenpflichtige präventive Wartung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

Durchführen eines manuellen Waschlaufrs

Manuelle Waschläufe werden vom Startbildschirm aus initiiert. Zu den Waschlaufoptionen gehören der Schnellwaschlauf und der manuelle Nachwaschlauf.

Waschlauftypen	Beschreibung
Schnellwaschlauf Dauer: 20 Minuten	Spült das System mit einer vom Benutzer bereitgestellten Waschlösung aus Wasser in Laborqualität und Tween 20 (Pufferflasche für den Waschlauf). <ul style="list-style-type: none">• Alle 14 Tage erforderlich, wenn sich das Gerät mit eingesetzter Reagenzienkartusche und Pufferflasche im Leerlauf befindet.• Alle 7 Tage erforderlich, wenn sich das Gerät in trockenem Zustand befindet (Reagenzienkartusche und Pufferflasche sind nicht eingesetzt).• Nach dem Ausschalten erforderlich.
Manueller Nachwaschlauf Dauer: 90 Minuten	Spült das System mit einer vom Benutzer bereitgestellten Waschlösung aus Wasser in Laborqualität und Tween 20 (Pufferflasche für den Waschlauf) sowie 0,12 % Natriumhypochlorit (Reagenzienkartusche für den Waschlauf). Erforderlich, wenn der automatische Nachwaschlauf nicht durchgeführt wurde.

Zum Durchführen eines manuellen Waschlaufrs werden die im Lieferumfang des Geräts enthaltene Reagenzienkartusche und Pufferflasche für den Waschlauf sowie eine gebrauchte Fließzelle benötigt. Eine gebrauchte Fließzelle kann für bis zu 20 Gerätewaschläufe verwendet werden.

Abbildung 25 Reagenzienkartusche für den Waschlauf und Pufferflasche für den Waschlauf

Vorbereiten eines manuellen Nachwaschlaufs

Entscheiden Sie sich entweder, wie unten beschrieben, für einen manuellen Nachwaschlauf oder bereiten Sie einen Schnellwaschlauf vor (nächster Abschnitt). Wenn Sie einen manuellen Nachwaschlauf durchführen möchten, überspringen Sie den Abschnitt für den Schnellwaschlauf und fahren Sie mit *Laden einer gebrauchten Fließzelle und der Waschlaufkartuschen auf Seite 39* fort.

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien	Volumen und Beschreibung
NaOCl	1 ml, verdünnt auf 0,12 % Wird in die Reagenzienkartusche für den Waschlauf gegeben (Position 28)
100 % Tween 20 Wasser in Laborqualität	Wird verwendet, um 125 ml 0,05-%-Tween-20-Waschlösung zu erzeugen Wird in die Pufferflasche für den Waschlauf gegeben (mittlerer Behälter)

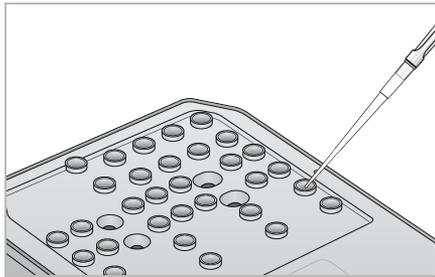


HINWEIS

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

- Mischen Sie die folgenden Volumina in einem Mikrozentrifugenröhrchen, um 1 ml 0,12%iges NaOCl vorzubereiten:
 - ▶ 5 % NaOCl (24 µl)
 - ▶ Wasser in Laborqualität (976 µl)
- Invertieren Sie das Röhrchen zum Mischen.
- Geben Sie 1 ml 0,12%iges NaOCl in die Reagenzienkartusche für den Waschlauf. Der richtige Behälter entspricht Position **28** auf der vorgefüllten Kartusche.

Abbildung 26 Einfüllen von NaOCl



- 4 Mischen Sie folgende Volumina, um eine 0,05-%-Tween-20-Waschlösung zu erhalten:
 - ▶ 100 % Tween 20 (62 µl)
 - ▶ Wasser in Laborqualität (125 ml)
- 5 Geben Sie 125 ml Waschlösung in den mittleren Behälter der Pufferflasche für den Waschlauf.
- 6 Wählen Sie **Perform Wash** (Waschlauf durchführen) und anschließend **Manual Post-Run Wash** (Manueller Nachwaschlauf).

Vorbereiten eines Schnellwaschlaufs

Alternativ zu dem unter *Vorbereiten eines manuellen Nachwaschlaufs auf Seite 38* beschriebenen Vorgehen können Sie wie unten beschrieben einen Schnellwaschlauf vorbereiten.

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien	Volumen und Beschreibung
100 % Tween 20	Wird verwendet, um 40 ml 0,05-%-Tween-20-Waschlösung zu erzeugen
Wasser in Laborqualität	Wird in die Pufferflasche für den Waschlauf gegeben (mittlerer Behälter)

- 1 Mischen Sie folgende Volumina, um eine 0,05-%-Tween-20-Waschlösung zu erhalten:
 - ▶ 100 % Tween 20 (20 µl)
 - ▶ Wasser in Laborqualität (40 ml)
- 2 Geben Sie 40 ml Waschlösung in den mittleren Behälter der Pufferflasche für den Waschlauf.
- 3 Wählen Sie **Perform Wash** (Waschlauf durchführen) und anschließend **Quick Wash** (Schnellwaschlauf).

Laden einer gebrauchten Fließzelle und der Waschlaufkartuschen

- 1 Wenn keine gebrauchte Fließzelle vorhanden ist, setzen Sie eine gebrauchte Fließzelle ein. Wählen Sie **Load** (Laden) und anschließend **Next** (Weiter).

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



WARNUNG

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

- Schieben Sie den leeren Behälter für verbrauchte Reagenzien bis zum Anschlag in die Pufferkammer.
- Entfernen Sie ggf. die gebrauchte Pufferflasche des vorherigen Laufs.
- Laden Sie die Pufferflasche für den Waschlauf mit der Waschlösung.
- Entfernen Sie ggf. die gebrauchte Reagenzienkartusche des vorherigen Laufs.
- Setzen Sie die Reagenzienkartusche für den Waschlauf ein.
- Wählen Sie **Next** (Weiter). Die Prüfung vor dem Waschlauf beginnt automatisch.

Starten des Waschlaufs

- Wählen Sie **Start**.
- Wählen Sie nach Abschluss des Waschlaufs **Home** (Startseite).

Nach dem Waschlauf

Nach dem Waschlauf bleiben die Sipper in der unteren Position, wodurch verhindert wird, dass Luft in das System eindringt. Lassen Sie die Kartuschen bis zur nächsten Ausführung stehen.

Austausch des Luftfilters

Der Luftfilter stellt den Luftstrom durch das Gerät sicher. Im Diagnosemodus zweigt die NextSeq 550Dx-Betriebssoftware eine Meldung an, dass der Luftfilter alle 90 Tage gewechselt werden muss. Wenn Sie diese Benachrichtigung erhalten, wählen Sie **Remind in 1 day** (Erinnerung in 1 Tag) oder führen Sie die nachfolgenden Schritte durch und wählen Sie **Filter Changed** (Filter ausgetauscht). Nach der Auswahl von **Filter Changed** (Filter ausgetauscht) wird der 90-Tage-Countdown zurückgesetzt.

- Nehmen Sie den neuen Luftfilter aus der Verpackung und notieren Sie auf dem Rahmen des Filters das Datum, an dem Sie den Filter einsetzen.
- Drücken Sie an der Rückseite des Geräts auf die Oberseite des Filtereinsatzes, um den Einsatz zu entriegeln.
- Fassen Sie die Oberseite des Filtereinsatzes, ziehen Sie ihn nach oben und nehmen Sie ihn vollständig aus dem Gerät heraus.
- Entfernen und entsorgen Sie den alten Luftfilter.
- Setzen Sie den neuen Luftfilter in den Einsatz ein.

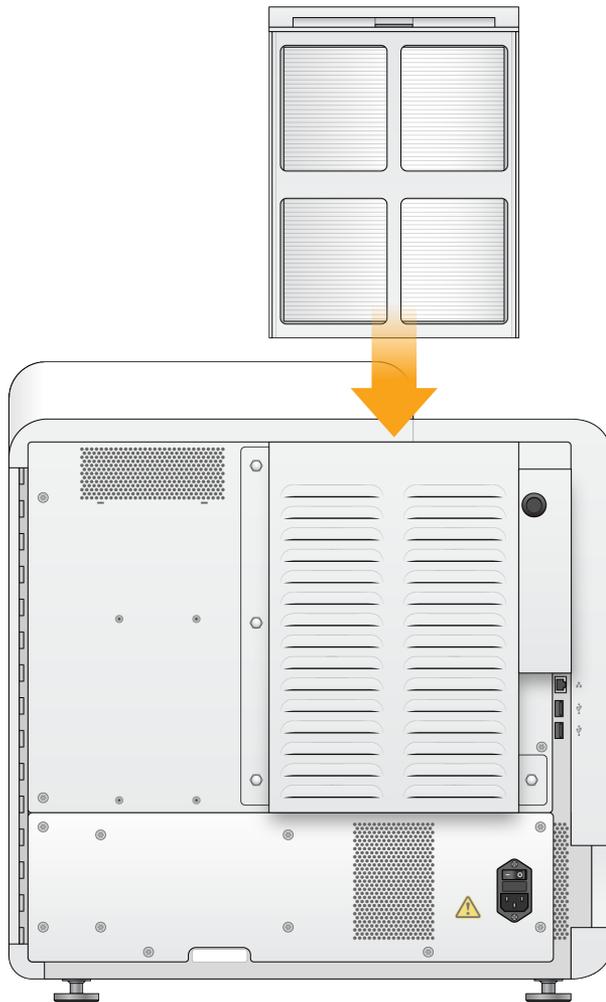


HINWEIS

Der Luftfilter funktioniert nicht ordnungsgemäß, wenn er falsch herum eingesetzt wird. Stellen Sie sicher, dass der Luftfilter mit dem grünen „Up“-Pfeil in den Einsatz eingelegt wird und dass der Warnhinweis nicht sichtbar ist. Der Pfeil sollte in Richtung des Griffs des Filtereinsatzes zeigen.

- 6 Schieben Sie den Filtereinsatz in das Gerät. Drücken Sie auf die Oberseite des Filtereinsatzes, bis er einrastet.

Abbildung 27 Einsetzen des Luftfilters



Software-Updates

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

- ▶ NextSeq Control Software (NCS)
- ▶ NextSeq-Rezepturen
- ▶ RTA2
- ▶ NextSeq Service Software (NSS)

- ▶ Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV)
- ▶ BaseSpace Broker

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

- ▶ **Automatische Updates:** Wenn Geräte mit einem Netzwerk mit Internetzugang verbunden sind, wird bei Verfügbarkeit eines Software-Updates ein entsprechendes Symbol  auf der Schaltfläche „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) im Startbildschirm angezeigt.
- ▶ **Manuelle Updates:** Laden Sie das System Suite-Installationsprogramm von der [NextSeq 550Dx-Gerätesupportseite](#) auf der Illumina-Website herunter.

Automatisches Software-Update

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

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



HINWEIS

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

Manuelles Software-Update

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

- c Lesen Sie die Liste der Software, die in diesem Update enthalten ist.

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



HINWEIS

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

Optionen für das Ausschalten und Neustarten des Geräts

Wenn Sie die Schaltfläche „Shut Down Options“ auswählen, haben Sie Zugang zu den folgenden Funktionen:

- ▶ **Restart (Neu starten):** Das Gerät wird im Dx-Modus gestartet.
- ▶ **Shutdown (Ausschalten):** Das Gerät wird im Dx-Modus heruntergefahren.
- ▶ **Exit to Windows (Beim Beenden Windows aufrufen):** Wenn Sie über die entsprechenden Berechtigungen verfügen, können Sie NCS schließen und Windows aufrufen.

Neustart im Diagnosemodus

Wählen Sie den Befehl „Restart“ (Neu starten), um das Gerät sicher herunterzufahren und im Diagnosemodus neu zu starten. Der Diagnosemodus ist der Standard-Startmodus.

- 1 Wählen Sie **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
- 2 Wählen Sie **Shutdown options** (Ausschaltoptionen).
- 3 Wählen Sie **Restart** (Neu starten).

Ausschalten des Geräts

- 1 Wählen Sie **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
- 2 Wählen Sie **Shutdown options** (Ausschaltoptionen).
- 3 Wählen Sie **Shut Down** (Ausschalten).

Der Befehl „Shut Down“ (Ausschalten) fährt die Software sicher herunter und schaltet das Gerät aus. Warten Sie mindestens 60 Sekunden, bevor Sie das Gerät erneut einschalten.



HINWEIS

Das Gerät startet nach dem Einschalten standardmäßig im Diagnosemodus.



VORSICHT

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

Exit to Windows (Beim Beenden Windows aufrufen)

Der Befehl „Exit to Windows“ (Beim Beenden Windows aufrufen) ermöglicht den Zugriff auf das Betriebssystem des Geräts und die Ordner auf dem Gerätecomputer. Durch den Befehl wird die Software ordnungsgemäß beendet und der Benutzer kehrt zu Windows zurück:

- 1 Wählen Sie **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
- 2 Wählen Sie **Shutdown options** (Ausschaltoptionen).
- 3 Wählen Sie **Exit to Windows** (Beim Beenden Windows aufrufen).

Anhang A Fehlerbehebung

Einleitung	45
Dateien für die Fehlerbehebung	45
Beheben von Fehlern der automatischen Prüfung	46
Behälter für verbrauchte Reagenzien ist voll	48
Workflow für die Rehybridisierung	49
BeadChip- und Scan-Fehler	51
Anwendungsspezifische Rezepturen und Rezepturordner	52
RAID-Fehlermeldung	53
Konfigurieren der Systemeinstellungen	53

Einleitung

Falls Sie technische Fragen haben, besuchen Sie die NextSeq 550Dx-Gerätesupportseiten der Illumina-Website. Die Supportseiten bieten Zugriff auf Dokumentation, Downloads und häufig gestellte Fragen.

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

Wenden Sie sich hinsichtlich Problemen mit der Laufqualität oder der Leistung an den technischen Support von Illumina. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Technische Unterstützung auf Seite 73*.

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

Dateien für die Fehlerbehebung

Ein Mitarbeiter des technischen Supports von Illumina kann Kopien von lauf- oder scanspezifischen Dateien anfordern, um Fehler zu beheben. In der Regel werden die folgenden Dateien für die Fehlersuche verwendet.

Dateien für die Fehlerbehebung bei Sequenzierungsläufen

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

Schlüsseldatei	Ordner	Beschreibung
Globale Protokolldateien (*GlobalLog*.tsv)	RTA-Protokolle	In diesen Dateien werden alle RTA-Ereignisse protokolliert. Die globalen Protokolldateien werden während des Laufs aktualisiert.

RTA-Fehler

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

Dateien für die Fehlerbehebung bei Array-Scan-Vorgängen

Schlüsseldatei	Ordner	Beschreibung
Scan-Parameter-Datei (ScanParameters.xml)	Stammordner	Enthält Informationen zu den Scan-Parametern. Zu diesen Informationen gehören das Datum des Scan-Vorgangs, der BeadChip-Barcode sowie die Speicherorte der Cluster- und der Manifestdatei.
Protokolldateien	Logs	In den Protokolldateien werden die einzelnen Schritte des Scan-Vorgangs auf dem Gerät aufgezeichnet.
Kennzahlendateien	[Barcode]	Kennzahlen gibt es als Probe- und Abschnittskennzahlen. [Barcode]_Probe_Kennzahlen.csv: Für jede Probe und jeden Kanal (rot und grün) werden folgende Kennzahlen aufgelistet: Percent Off Image, Percent Outliers, P05, P50, P95, Avg FWHM Avg, FWHM Stddev und Min Registration Score. [Barcode]_Abschnitt_Kennzahlen.csv: Für jeden Abschnitt und jede Platte werden folgende Kennzahlen aufgelistet: Laser Z-position, Through Focus Z-position, Red FWHM, Green FWHM, Red Avg Pixel Intensity, Green Avg Pixel Intensity, Red Registration Score und Green Registration Score.
Rescan-Datei	[Barcode]	[Barcode]_rescan.flowcell: Listet die für einen erneuten Scan-Vorgang angepassten Plattenpositionen auf, die eine erhöhte Platte-auf-Platte-Überlappung einschließen.

Beheben von Fehlern der automatischen Prüfung

Falls während der automatischen Prüfung Fehler auftreten, können Sie die folgenden empfohlenen Aktionen verwenden, um den Fehler zu beheben. Die automatischen Prüfungen für Sequenzierungsläufe und Array-Scans unterscheiden sich.

Tests für Sequenzierungsläufe

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

Systemprüfungen	Empfohlene Aktion
Doors closed (Türen geschlossen)	Stellen Sie sicher, dass die Kammertüren geschlossen sind.
Consumables loaded (Verbrauchsmaterialien geladen)	Die Verbrauchsmaterialsensoren funktionieren nicht. Stellen Sie sicher, dass alle Verbrauchsmaterialien ordnungsgemäß geladen sind. Wählen Sie in den Laufkonfigurationsbildschirmen die Option Back (Zurück), um zum Ladeschritt zurückzukehren, und wiederholen Sie die Laufkonfiguration.

Systemprüfungen	Empfohlene Aktion
Required Software (Software erforderlich)	Wichtige Software-Komponenten fehlen. Führen Sie manuell ein Software-Update durch, damit alle Software-Komponenten installiert werden.
Instrument Disk Space (Speicherplatz auf dem Gerät)	Auf der Festplatte des Geräts ist nicht genügend Speicherplatz für die Durchführung eines Laufs verfügbar. Möglicherweise wurden Daten aus einem vorherigen Lauf nicht übertragen. Löschen Sie die Laufdaten von der Festplatte des Geräts.
Network connection (Netzwerkverbindung)	Die Netzwerkverbindung wurde unterbrochen. Überprüfen Sie den Netzwerkstatus und die physische Netzwerkverbindung.
Network Disk Space (Netzwerkspeicherplatz)	Das BaseSpace-Konto oder der Netzwerkspeicher ist voll.
Temperatur	Empfohlene Aktion
Temperature (Temperatur)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Temperature sensors (Temperatursensoren)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Fans (Lüfter)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Bildgebungssystem	Empfohlene Aktion
Imaging limits (Bildgebungsbeschränkungen)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Z Steps-and-Settle (Z-Tisch – Schritt und Positionseinnahme)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Bit Error Rate (Bit-Fehlerrate)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Flow Cell Registration (Fließzellenregistrierung)	Möglicherweise ist die Fließzelle nicht korrekt positioniert. <ul style="list-style-type: none"> Wählen Sie in den Laufkonfigurationsbildschirmen die Option Back (Zurück), um zum Fließzellenschritt zurückzukehren. Die Tür der Bildgebungskammer wird geöffnet. Nehmen Sie die Fließzelle heraus und setzen Sie sie erneut ein, um sicherzustellen, dass sie korrekt positioniert ist.
Reagenzienzugabe	Empfohlene Aktion
Valve Response (Ventilreaktionszeit)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Pump (Pumpe)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Buffer Mechanism (Puffermechanismus)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Spent Reagents Empty (Verbrauchte Reagenzien leeren)	Leeren Sie den Behälter für verbrauchte Reagenzien und laden Sie den leeren Behälter neu.

Tests für Array-Scans

Systemprüfungen	Empfohlene Aktion
Doors closed (Türen geschlossen)	Stellen Sie sicher, dass die Kammertüren geschlossen sind.
Consumables loaded (Verbrauchsmaterialien geladen)	Die Verbrauchsmaterialsensoren funktionieren nicht. Stellen Sie sicher, dass alle Verbrauchsmaterialien ordnungsgemäß geladen sind. Wählen Sie in den Laufkonfigurationsbildschirmen die Option Back (Zurück), um zum Ladeschritt zurückzukehren, und wiederholen Sie die Laufkonfiguration.
Required Software (Software erforderlich)	Wichtige Software-Komponenten fehlen. Führen Sie manuell ein Software-Update durch, damit alle Software-Komponenten installiert werden.
Verify Input Files (Eingabedateien überprüfen)	Stellen Sie sicher, dass der Pfad von Cluster- und Manifest-Datei korrekt ist und die Dateien vorhanden sind.
Instrument Disk Space (Speicherplatz auf dem Gerät)	Auf der Festplatte des Geräts ist nicht genügend Speicherplatz für die Durchführung eines Laufs verfügbar. Möglicherweise wurden Daten aus einem vorherigen Lauf nicht übertragen. Löschen Sie die Laufdaten von der Festplatte des Geräts.
Network connection (Netzwerkverbindung)	Die Netzwerkverbindung wurde unterbrochen. Überprüfen Sie den Netzwerkstatus und die physische Netzwerkverbindung.
Network Disk Space (Netzwerkspeicherplatz)	Das BaseSpace-Konto oder der Netzwerkspeicher ist voll.

Bildgebungssystem	Empfohlene Aktion
Imaging limits (Bildgebungsbeschränkungen)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Z Steps-and-Settle (Z-Tisch – Schritt und Positionseinnahme)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Bit Error Rate (Bit-Fehlerrate)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Auto-Center (Automatisch zentrieren)	Entfernen Sie den BeadChip-Adapter. Stellen Sie sicher, dass der BeadChip im Adapter sitzt, und laden Sie den Adapter neu.

Behälter für verbrauchte Reagenzien ist voll

Starten Sie einen Lauf stets mit einem leeren Behälter für verbrauchte Reagenzien.

Wenn Sie einen Lauf starten, ohne den Behälter für verbrauchte Reagenzien zu leeren, sorgen Systemsensoren dafür, dass der Lauf unterbrochen wird, sobald der Behälter voll ist. Die Systemsensoren können einen Lauf nicht während des Clusterings, der Paired-End-Resynthese oder des automatischen Nachwaschlaufs anhalten.

Wenn der Lauf angehalten wird, wird ein Dialogfeld mit Optionen zum Anheben der Sipper und zum Leeren des vollen Behälters angezeigt.

Leeren des Behälters für verbrauchte Reagenzien

- 1 Wählen Sie **Raise Sippers** (Sipper anheben).
- 2 Entfernen Sie den Behälter für verbrauchte Reagenzien und entsorgen Sie den Inhalt ordnungsgemäß.
- 3 Stellen Sie den leeren Behälter zurück in die Pufferkammer.

4 Wählen Sie **Continue** (Fortfahren). Der Lauf wird automatisch fortgesetzt.

Workflow für die Rehybridisierung

Ein Rehybridisierungslauf ist ggf. erforderlich, wenn die Kennzahlen der ersten durchgeführten Zyklen Intensitäten unter 2500 zeigen. Einige Bibliotheken mit geringer Diversität können Intensitäten unter 1000 aufweisen, was normal ist und durch eine Rehybridisierung nicht geändert werden kann.



HINWEIS

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

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

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

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

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

Zeitpunkte für das Beenden eines Laufs für die Rehybridisierung

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

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

Erforderliche Verbrauchsmaterialien

Zur Durchführung eines Rehybridisierungslaufs sind eine neue NextSeq 550Dx-Reagenzienkartusche und -Pufferflasche erforderlich, unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt der Lauf gestoppt wurde.

Beenden des aktuellen Laufs

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



HINWEIS

Sie können die Fließzelle bis zu sieben Tage bei 2 °C bis 8 °C in der aufklappbaren Schachtel aus Kunststoff **ohne** die feuchteabsorbierende Verpackung aufbewahren. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sollten Sie die gespeicherte Fließzelle innerhalb von drei Tagen rehybridisieren.

Durchführen eines manuellen Waschlaufts

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



HINWEIS

Wenn Sie die Reagenzienkartusche und die Pufferflasche aus dem angehaltenen Lauf nicht entfernt haben, können Sie sie für den manuellen Waschlauf verwenden. Andernfalls führen Sie den manuellen Waschlauf mit der Reagenzienkartusche und der Pufferflasche für den Waschlauf durch.

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

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



TIPP

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

Konfigurieren eines Laufs auf dem Gerät

- 1 Bereiten Sie eine neue Reagenzienkartusche vor.
- 2 Wenn die gespeicherte Fließzelle aufbewahrt wurde, lassen Sie sie vor dem Gebrauch Raumtemperatur erreichen (15–30 Minuten).
- 3 Reinigen und laden Sie die gespeicherte Fließzelle.
- 4 Entfernen Sie den Behälter für verbrauchte Reagenzien und entsorgen Sie den Inhalt ordnungsgemäß. Laden Sie dann den leeren Behälter neu.
- 5 Setzen Sie eine neue Pufferflasche und eine neue Reagenzienkartusche ein.

- 6 Wählen Sie im Laufkonfigurationsbildschirm eine der folgenden Konfigurationsoptionen aus:
 - ▶ **BaseSpace oder BaseSpace Onsite:** Wählen Sie den Lauf aus und bestätigen Sie die Laufparameter.
 - ▶ **Eigenständig:** Geben Sie den Namen des Laufs ein und legen Sie dieselben Parameter wie für den ursprünglichen Lauf fest.
- 7 Wählen Sie **Next** (Weiter), um mit dem Selbsttest fortzufahren und den Lauf zu starten.

BeadChip- und Scan-Fehler

Software kann den BeadChip-Barcode nicht einlesen

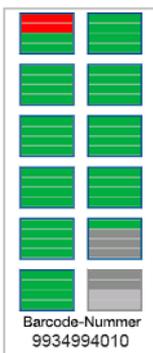
Wählen Sie eine der folgenden Optionen, wenn das Barcodefehler-Dialogfeld angezeigt wird:

- ▶ Wählen Sie **Rescan** (Erneut scannen). Die Software versucht erneut, den Barcode einzulesen.
- ▶ Wählen Sie das Textfeld und geben Sie den numerischen Barcode (wie im Bild angezeigt) ein. Je nach BeadChip kann die Barcodenummer bis zu 12 Ziffern enthalten. Wählen Sie **Save** (Speichern). Das Barcode-Bild wird im Ausgabeordner gespeichert.
- ▶ Wählen Sie **Cancel** (Abbrechen). Die Tür der Bildgebungskammer wird zum Entladen des BeadChip-Adapters geöffnet.

Fehlerhafter BeadChip-Scan-Vorgang

Bilder werden nach dem Scannen registriert. Die Registrierung identifiziert Beads durch Korrelieren von Positionen auf dem gescannten Bild mit den Informationen auf der Bead-Kartendatei oder im DMAP-Ordner. Alle Abschnitte, bei denen die Registrierung fehlschlagen ist, werden auf dem BeadChip-Bild rot dargestellt.

Abbildung 28 Fehlerhafte Abschnitte eines BeadChips



Nach Abschluss des Scan-Vorgangs und dem Speichern der Scan-Daten im Ausgabeordner wird die Schaltfläche „Rescan“ (Erneut scannen) aktiviert.

Wenn der Benutzer „Rescan“ (Erneut scannen) wählt, führt die Software die folgenden Schritte durch:

- ▶ Scant mithilfe einer erhöhten Platte-an-Platte-Überschneidung die Proben mit fehlerhaften Abschnitten erneut.
- ▶ Generiert Ausgabedateien im ursprünglichen Ausgabeordner.
- ▶ Überschreibt für fehlerhafte Abschnitte bestehende Ausgabedateien.
- ▶ Erhöht für jeden erneuten Scan-Vorgang den Scan-Zähler um eins (dies erfolgt im Hintergrund). Der Ausgabeordner wird nicht durch die Software umbenannt.

Erneut scannen oder einen neuen Scan-Vorgang starten

- 1 Wählen Sie **Rescan** (Erneut scannen), um Proben mit fehlgeschlagenen Abschnitten zu scannen.
- 2 Falls der Scan-Vorgang weiterhin fehlschlägt, beenden Sie ihn.
- 3 Entfernen Sie den BeadChip und den Adapter und überprüfen Sie den BeadChip auf Staub und andere Schmutzpartikel. Verwenden Sie Druckluft oder eine andere druckluftbetriebene Staubentfernungsmethode, um die Schmutzpartikel zu entfernen.
- 4 Laden Sie den BeadChip erneut und starten Sie einen neuen Scan-Vorgang.
Wenn ein neuer Scan-Vorgang gestartet wird, führt die Software die folgenden Schritte durch:
 - ▶ Scant den gesamten BeadChip.
 - ▶ Generiert Ausgabedateien in einem neuen Ausgabeordner.
 - ▶ Erhöht den Scan-Zähler um eins gegenüber dem Zählerstand des letzten erneuten Scan-Vorgangs.

Ersetzen von Manifest- und Clusterdateien

- 1 Rufen Sie die Illumina-Supportseite (support.illumina.com) für den von Ihnen verwendeten BeadChip auf und klicken Sie auf die Registerkarte **Downloads**.
- 2 Laden Sie die Dateien herunter, die ersetzt bzw. aktualisiert werden sollen, und kopieren Sie die Dateien an Ihren bevorzugten Netzwerkspeicherort.



HINWEIS

Stellen Sie sicher, dass Sie Manifest- und Clusterdateien auswählen, die mit dem NextSeq 550Dx-Gerätesystem kompatibel sind. Bei kompatiblen Dateien steht **NS550** im Dateinamen.

- 3 Falls sich der Speicherort geändert hat, ändern Sie ihn im Bildschirm „BeadChip Scan Configuration“ (BeadChip-Scan-Konfiguration) wie folgt:
 - a Wählen Sie im NCS-Startbildschirm **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
 - b Wählen Sie **System Configuration** (Systemkonfiguration).
 - c Wählen Sie **BeadChip Scan Configuration** (BeadChip-Scan-Konfiguration).
- 4 Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zum Speicherort der ersetzten bzw. aktualisierten Dateien.

Anwendungsspezifische Rezepturen und Rezepturordner

Ändern Sie nicht die Originalrezepturen. Erstellen Sie immer eine Kopie der Originalrezeptur unter einem neuen Namen. Wenn eine Originalrezeptur geändert wurde, kann der Software-Updater die Rezeptur für künftige Updates nicht erkennen und neuere Versionen werden nicht installiert.

Speichern Sie angepasste Rezepturen im entsprechenden Rezepturordner. Rezepturordner haben die folgende Ordnerstruktur:

📁 Custom

📁 **High**: Angepasste Rezepturen, die mit einem Hochleistungskit verwendet werden.

📁 **Mid**: Angepasste Rezepturen, die mit einem Kit für mittlere Leistung verwendet werden.

📁 **High**: Originalrezepturen, die mit einem Hochleistungskit verwendet werden.

📁 **Mid**: Originalrezepturen, die mit einem Kit für mittlere Leistung verwendet werden.

📁 **Wash**: Enthält die Rezeptur für den manuellen Waschlaufl.

RAID-Fehlermeldung

Der NextSeq 550Dx-Computer hat vier Festplatten, zwei für den Diagnosemodus und zwei für den Forschungsmodus. Falls auf einer Festplatte Probleme auftreten und ein Ausfall droht, wird eine RAID-Fehlermeldung auf dem Gerät angezeigt, die empfiehlt, dass Sie den technischen Support von Illumina kontaktieren. Oft muss die Festplatte ausgetauscht werden.

Die Laufkonfiguration und der normale Betrieb sind weiterhin möglich. Zweck der Meldung ist, Sie im Voraus über erforderliche Servicemaßnahmen zu informieren, um Unterbrechungen im normalen Betrieb des Geräts zu vermeiden. Wählen Sie zum Fortfahren **Close** (Schließen).

Konfigurieren der Systemeinstellungen

Das System wird während der Installation konfiguriert. Falls jedoch eine Änderung erforderlich ist oder das System neu konfiguriert werden muss, verwenden Sie die Systemkonfigurationsoptionen. Der Zugang zu den Systemkonfigurationsoptionen ist nur über ein Windows-Administratorkonto möglich.

- ▶ **Network Configuration** (Netzwerkkonfiguration): Bietet Optionen zum Festlegen der IP-Adresse, der Adresse des DNS-Servers, des Computernamens und des Domännennamens.
- ▶ **Analysis Configuration** (Analysekonfiguration): Bietet Optionen für Analysemethoden, darunter BaseSpace, BaseSpace Onsite, der eigenständige Modus und die Laufüberwachung in BaseSpace, sowie Einstellungen für eine BaseSpace-Standardanmeldung und die Berichterstellung zum Gerätezustand.
- ▶ **BeadChip Scan Configuration** (BeadChip-Scan-Konfiguration): Bietet Optionen zum Festlegen des Standardspeicherorts des DMAP- und des Ausgabeordners, des Dateiformats gespeicherter Bilder und des Typs der Ausgabedatei.

Einrichten der Netzwerkkonfiguration

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



HINWEIS

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

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

- ▶ Geben Sie die IP-Adresse ein. Eine IP-Adresse ist eine Reihe von vier Zahlen, die jeweils durch einen Punkt getrennt sind, z. B. 168.62.20.37.
 - ▶ Geben Sie die Subnetzmaske ein, die eine Untergruppe des IP-Netzes ist.
 - ▶ Geben Sie das Standard-Gateway ein, bei dem es sich um den Router im Netzwerk handelt, der die Verbindung mit dem Internet herstellt.
- 4 Wählen Sie **Obtain a DNS server address automatically** (DNS-Server-Adresse automatisch beziehen), um das Gerät mit dem DNS-Server zu verbinden, dem diese IP-Adresse zugeordnet ist.

Alternativ können Sie die Option **Use the following DNS server addresses** (Folgende DNS-Server-Adressen verwenden) wählen, um das Gerät manuell mit dem DNS-Server zu verbinden. Führen Sie hierzu die folgenden Schritte aus.

- ▶ Geben Sie die bevorzugte DNS-Adresse ein. Die DNS-Adresse ist der Name des Servers, der zum Übersetzen von Domännennamen in IP-Adressen verwendet wird.
- ▶ Geben Sie die alternative DNS-Adresse ein. Die alternative Adresse wird verwendet, wenn der bevorzugte DNS-Server einen bestimmten Domännennamen nicht in eine IP-Adresse übersetzen kann.

- 5 Wählen Sie **Save** (Speichern), um mit dem Bildschirm „Computer“ fortzufahren.



HINWEIS

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

- 6 Verbinden Sie den Gerätecomputer wie im Folgenden beschrieben mit einer Domäne oder Arbeitsgruppe.
 - ▶ **Bei Geräten, die mit dem Internet verbunden sind:** Aktivieren Sie die Option **Member of Domain** (Mitglied der Domäne) und geben Sie den Namen der Domäne ein, die der Internetverbindung Ihrer Einrichtung zugewiesen ist. Zur Änderung der Domäne werden der Benutzername und das Kennwort eines Administrators benötigt.
 - ▶ **Bei Geräten ohne Internetzugang:** Wählen Sie **Member of Work Group** (Mitglied der Arbeitsgruppe) und geben Sie den Namen einer Arbeitsgruppe an. Der Name der Arbeitsgruppe ist unternehmensspezifisch.
- 7 Wählen Sie **Save** (Speichern).

Einrichten der Analysekonfiguration

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Configuration** (Systemkonfiguration).
- 2 Wählen Sie **Analysis Configuration** (Analysekonfiguration).
- 3 Wählen Sie eine der folgenden Optionen, um den Speicherort auszuwählen, an den die Daten für die spätere Analyse übertragen werden sollen.
 - ▶ Wählen Sie **BaseSpace**, um die Sequenzierungsdaten an BaseSpace zu senden. **[Optional]** Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Output Folder** (Ausgabeordner), wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zu einem sekundären Netzwerkspeicherort, an dem neben dem Speicherort auf BaseSpace BCL-Dateien gespeichert werden.
 - ▶ Wählen Sie **BaseSpace Onsite**. Geben Sie im Feld „Server Name“ (Servername) den vollständigen Dateipfad zu Ihrem BaseSpace Onsite-Server ein. **[Optional]** Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Output Folder** (Ausgabeordner), wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zu einem sekundären Netzwerkspeicherort, an dem neben dem Speicherort auf dem BaseSpace Onsite-Server BCL-Dateien gespeichert werden.
 - ▶ Wählen Sie **Standalone instrument** (Eigenständiges Gerät), um die Daten nur an einem Netzwerkspeicherort zu speichern. Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zum bevorzugten Netzwerkspeicherort. Die Steuerungssoftware generiert den Namen des Ausgabeordners automatisch.
 - ▶ **[Optional]** Wählen Sie **Use Run Monitoring** (Laufüberwachung verwenden), um den Lauf mithilfe von Darstellungstools auf BaseSpace zu überwachen. Hierfür sind eine Internetverbindung und eine Anmeldung bei BaseSpace erforderlich.

- 4 Wenn Sie „BaseSpace“ oder „BaseSpace Onsite“ ausgewählt haben, legen Sie die folgenden BaseSpace-Parameter fest:
 - ▶ Geben Sie unter **User Name** (Benutzername) und **Password** (Kennwort) einen Benutzernamen und ein Kennwort ein, um das Gerät bei BaseSpace zu registrieren.
 - ▶ Wählen Sie **Use default login and bypass the BaseSpace login screen** (Standardanmeldung verwenden und BaseSpace-Anmeldebildschirm überspringen), um den registrierten Benutzernamen und das Kennwort als Standardanmeldedaten festzulegen. Durch diese Einstellung wird der BaseSpace-Bildschirm während der Laufkonfiguration übersprungen.
- 5 Aktivieren Sie (Geräteleistungsdaten an Illumina senden)**Send instrument health information to Illumina** (Gerätstatusdaten an Illumina senden), um den Überwachungsservice Illumina Proactive zu aktivieren. Je nach verwendeter NCS-Version kann der Name dieser Einstellung auf der Benutzeroberfläche der Software von dem in diesem Handbuch abweichen.
 Nach Aktivierung dieser Einstellung werden Performance-Daten des Geräts an Illumina gesendet. Diese Daten erleichtern Illumina die Fehlerbehebung und das Erkennen möglicher Ausfälle. Sie dienen der proaktiven Wartung und der Maximierung der Geräteverfügbarkeit. Weitere Informationen zu den Vorteilen dieses Dienstes finden Sie im *technischen Hinweis zu Illumina Proactive (Dokument-Nr. 1000000052503)*.
 Dieser Dienst:
 - ▶ Sendet keine Sequenzierungsdaten.
 - ▶ Das Gerät muss mit einem Netzwerk mit Internetzugang verbunden sein.
 - ▶ Das Gerät muss mit BaseSpace



HINWEIS

Diese Option steht für BaseSpace Onsite

- ▶ Der Service ist in der Standardeinstellung aktiviert. Für die Abmeldung bei diesem Service deaktivieren Sie die Einstellung **Send instrument health information to Illumina** (Gerätstatusdaten an Illumina senden).

- 6 Wählen Sie **Save** (Speichern).

BeadChip-Scan-Konfiguration

- 1 Wählen Sie im Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Configuration** (Systemkonfiguration).
- 2 Wählen Sie **BeadChip Scan Configuration** (BeadChip-Scan-Konfiguration).
- 3 Um einen Standardspeicherort für den DMAP-Ordner anzugeben, wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zum gewünschten Speicherort im Netzwerk Ihrer Einrichtung.



HINWEIS

Übertragen bzw. kopieren Sie vor jedem Scan-Vorgang den DMAP-Inhalt an diesen Speicherort. DMAP-Inhalt wird für jeden BeadChip benötigt und ist für jeden BeadChip-Barcode eindeutig.

- 4 Um einen Standardspeicherort für die Ausgabe anzugeben, wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zum gewünschten Speicherort im Netzwerk Ihrer Einrichtung.
- 5 Wählen Sie ein Bilddateiformat für gespeicherte Bilder. Das Standardformat für Bilddateien ist **JPG**.
- 6 Wählen Sie das Dateiformat der Scan-Daten-Ausgabedateien. Das Standardformat der Ausgabedateien ist **GTC only** (nur GTC).

- 7 Wählen Sie **Save** (Speichern).
- 8 Geben Sie im Bildschirm „Scan Map“ (Scan-Übersicht) für jeden BeadChip-Typ den vollständigen Dateipfad zur entsprechenden Manifest- und Clusterdatei an. Wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) für jeden Dateityp und navigieren Sie zu dem Ordner, der diese Dateien enthält.
- 9 **[Optional]** Wählen Sie **Hide Obsolete BeadChips** (Nicht benötigte BeadChips ausblenden), um die nicht benötigten BeadChips aus der Ansicht zu entfernen.
- 10 Wählen Sie **Save** (Speichern).

Anhang B Echtzeitanalyse

Überblick über die Echtzeitanalyse	57
Echtzeitanalyse-Workflow	58

Überblick über die Echtzeitanalyse

Das NextSeq 550Dx-Gerät nutzt RTA2, eine Implementierung der Echtzeitanalyse-Software (Real-Time Analysis, RTA). RTA2 wird auf dem Gerätecomputer ausgeführt und extrahiert Intensitäten aus Bildern, führt das Base-Calling durch und weist dem Base-Call einen Qualitäts-Score zu. RTA2 und die Steuerungssoftware kommunizieren über ein HTTP-Webinterface und gemeinsame Speicherbereiche. Wenn RTA2 beendet wird, wird die Verarbeitung nicht wieder aufgenommen und die Laufdaten werden nicht gespeichert.



HINWEIS

Die Demultiplexierungsleistung wird nicht berechnet. Daher wird die Registerkarte „Index“ im Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) nicht ausgefüllt.

RTA2-Eingabedaten

RTA 2 benötigt für die Verarbeitung Folgendes:

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

RTA2 erhält Befehle von der Steuerungssoftware, die über den Speicherort von RunInfo.xml und darüber informieren, ob ein optionaler Ausgabeordner angegeben wurde.

RTA v2-Ausgabedateien

Bilder aus jedem Kanal werden im Speicher als Platten übergeben. Platten sind kleine Bildgebungsbereiche auf der Fließzelle, die von der Kamera als das Bildfeld betrachtet werden. Die Software generiert von diesen Bildern die Primäranalyse-Ausgabe, die mehrere hinsichtlich ihrer Qualität ausgewertete Base-Call-Dateien und Filter-Dateien umfasst. Alle anderen Dateien sind ergänzende Dateien für die Ausgabe.

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

Ausgabedateien werden für die nachgeschaltete Analyse in BaseSpace verwendet. Wahlweise können Sie für die FASTQ-Konversion und Analyselösungen von Drittanbietern auch die Konvertierungssoftware bcl2fastq verwenden. Für NextSeq 550Dx-Dateien ist bcl2fastq v2.0 oder höher erforderlich. Die neueste Version von bcl2fastq finden Sie auf der [NextSeq 550Dx-Downloadseite](#) der Illumina-Website.

RTA v2 liefert Echtzeitkennzahlen zur Laufqualität, die in InterOp-Dateien gespeichert werden. InterOp-Dateien sind binäre Ausgabedateien mit Kennzahlen zu Platten, Zyklen und zur Read-Ebene. Sie werden benötigt, um Echtzeitkennzahlen im Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) ansehen zu können. Die neueste Version von SAV finden Sie auf der [SAV-Downloadseite](#) der Illumina-Website.

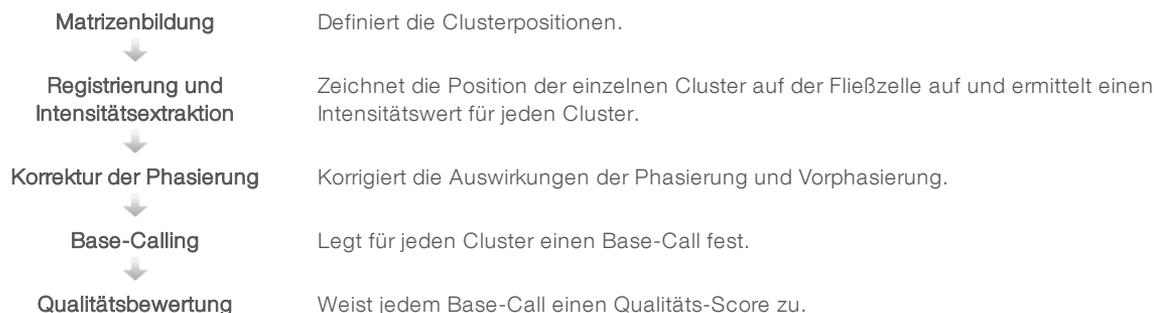
Fehlerbehandlung

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

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

- ▶ *GlobalLog*.tsv enthält eine Zusammenfassung wichtiger Lauf-Ereignisse.
- ▶ *Error*.tsv protokolliert während des Laufs aufgetretene Fehler.
- ▶ *WarningLog*.tsv führt während des Laufs aufgetretene Warnungen auf.

Echtzeitanalyse-Workflow



Matrizenbildung

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

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



HINWEIS

Damit bei der Matrizenbildung Cluster erkannt werden, muss mindestens eine andere Base als G in den ersten **fünf** Zyklen vorhanden sein. Für Indexsequenzen benötigt RTA v2 mindestens eine andere Base als G in den ersten **zwei** Zyklen.

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

Registrierung und Intensitätsextraktion

Die Registrierung und Intensitätsextraktion beginnen nach der Matrizenbildung.

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

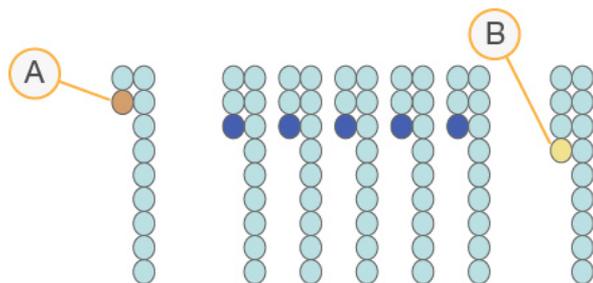
Wenn die Registrierung für ein Bild in einem Zyklus fehlschlägt, werden für diese Platte in diesem Zyklus keine Base-Calls erzeugt. Sehen Sie sich im Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) die Miniaturbilder an und überprüfen Sie, ob die Registrierung bei einzelnen Bildern fehlgeschlagen ist.

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 29 Phasierung und Vorphasierung



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

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

Base-Calling

Beim Base-Calling wird eine Base (A, C, G oder T) für jeden Cluster einer bestimmten Platte eines bestimmten Zyklus festgelegt. Das NextSeq 550Dx-Gerät verwendet die Zweikanal-Sequenzierung, bei der nur zwei Bilder benötigt werden, um die Daten für vier DNA-Basen zu codieren: ein Bild aus dem roten Kanal und ein Bild aus dem grünen Kanal.

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

Abbildung 30 Darstellung der Clusterintensitäten

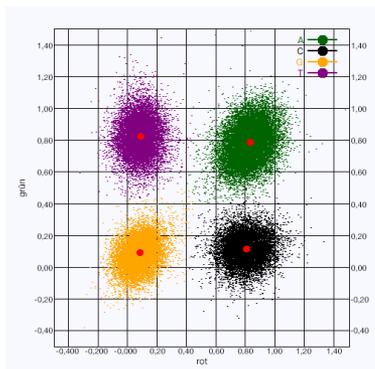


Tabelle 1 Base-Calls bei einer Zweikanal-Sequenzierung

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

Cluster nach Filterung

Während des Laufs filtert RTA2 Rohdaten, um Reads zu entfernen, die dem Schwellenwert für Datenqualität nicht genügen. Überlappende Cluster sowie Cluster niedriger Qualität werden entfernt.

Bei der Zweikanalanalyse verwendet RTA2 ein populationsbasiertes System zum Feststellen der Reinheit eines Base-Calls. Cluster passieren Filter, wenn nicht mehr als ein Base-Call in den ersten 25 Zyklen eine Reinheit von $< 0,63$ aufweist. Für Cluster, die die Filter nicht passieren, erfolgt kein Base-Call.

Hinweise zur Indizierung

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

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

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

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

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

Qualitätsbewertung

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

Der Q-Score ist eine kompakte Möglichkeit, kleine Fehlerwahrscheinlichkeiten zu kommunizieren. Qualitäts-Scores werden als Q(X) dargestellt, wobei X der Score-Wert ist. Die folgende Tabelle zeigt die Beziehung zwischen dem Qualitäts-Score und der Fehlerwahrscheinlichkeit.

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



HINWEIS

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

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

Nachdem der Q-Score ermittelt wurde, werden die Ergebnisse in Base-Call-Dateien (*.bcl.bgzf) gespeichert.

Anhang C Ausgabedateien und -ordner

Sequenzierungsausgabedateien	63
Ordnerstruktur der Sequenzierungsausgabedaten	66
Scan-Ausgabedateien	67
Ordnerstruktur der ausgegebenen Scan-Daten	67

Sequenzierungsausgabedateien

Dateityp	Dateibeschreibung, Speicherort und Name
Base-Call-Dateien	Jede analysierte Platte wird in eine für jede Lane und für jeden Zyklus zusammengefasste Base-Call-Datei aufgenommen. Die zusammengefasste Datei enthält den Base-Call und den codierten Qualitäts-Score für jeden Cluster dieser Lane. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Die Dateien werden in einem Ordner pro Lane gespeichert. [Zyklus].bcl.bgzf, wobei [Zyklus] die vierstellige Zyklusnummer ist. Die Base-Call-Dateien werden mit dem Block-gzip-Verfahren komprimiert.
Base-Call-Indexdatei	Für jede Lane listet eine binäre Indexdatei die ursprünglichen Platteninformationen anhand zweier Werte für jede Platte auf: die Plattennummer und die Anzahl der Cluster für die Platte. Base-Call-Indexdateien werden erstellt, sobald eine Base-Call-Datei für eine Lane erzeugt wird. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Die Dateien werden in einem Ordner pro Lane gespeichert. s_[Lane].bci
Clusterpositionsdateien	Für jede Platte werden die XY-Koordinaten jedes Clusters in einer Clusterpositionsdatei für jede Lane zusammengefasst. Clusterpositionsdateien werden bei der Matrizenbildung generiert. Data\Intensities\L00[X]: Die Dateien werden in einem Ordner pro Lane gespeichert. s_[Lane].locs
Filterdateien	Die Filterdatei gibt an, ob ein Cluster die Filter passiert hat. Die Filterinformationen werden in einer Filterdatei für jede Lane und jeden Read zusammengefasst. Filterdateien werden bei Zyklus 26 generiert und verwenden 25 Datenzyklen. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Die Dateien werden in einem Ordner pro Lane gespeichert. s_[Lane].filter
InterOp-Dateien	InterOp-Dateien sind binäre Berichtsdateien, die im Sequenzierungsanalyse-Viewer (SAV) verwendet werden. InterOp-Dateien werden während des Laufs aktualisiert. InterOp-Ordner
RTA-Konfigurationsdatei	Die RTA-Konfigurationsdatei wird zu Beginn des Laufs generiert. Sie enthält die Einstellungen für den Lauf. [Stammordner], RTAConfiguration.xml
Laufinformationsdatei	Enthält den Namen des Laufs, die Anzahl der Zyklen in jedem Read, die Angabe, ob der Read indiziert ist, sowie die Anzahl der Bildstreifen und Platten auf der Fließzelle. Die Laufinformationsdatei wird am Anfang des Laufs generiert. [Stammordner], RunInfo.xml

Fließzellenplatten

Platten sind kleine Bildgebungsbereiche auf der Fließzelle, die von der Kamera als das Bildfeld betrachtet werden. Die Gesamtzahl der Platten hängt von der Anzahl der Lanes, Bildstreifen und Oberflächen ab, die auf der Fließzelle aufgenommen werden, und davon, wie die Kameras beim Erfassen der Bilder zusammenarbeiten. Hochleistungsfließzellen verfügen über insgesamt 864 Platten.

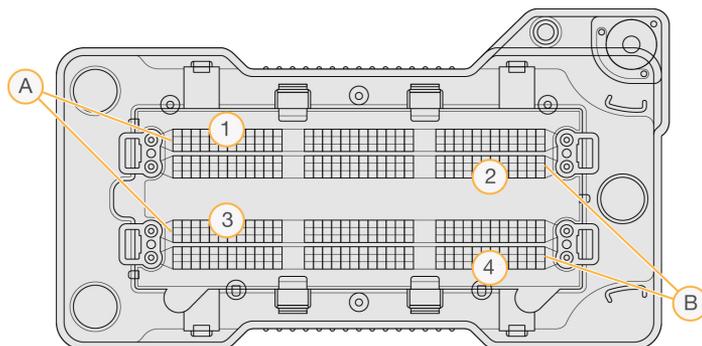
Tabelle 2 Fließzellenplatten

Fließzellenkomponente	Hochleistung	Beschreibung
Lanes	4	Eine Lane ist ein physischer Kanal mit dedizierten Einlass- und Auslassöffnungen.
Oberflächen	2	Es werden zwei Oberflächen der Fließzelle aufgenommen: die obere und die untere Oberfläche. Zuerst wird die obere Oberfläche einer Platte und anschließend die untere Oberfläche derselben Platte aufgenommen, bevor mit der nächsten Platte fortgefahren wird.
Bildstreifen pro Lane	3	Ein Bildstreifen ist eine Spalte von Platten in einer Lane.
Kamerasegmente	3	Das Gerät nutzt sechs Kameras, um die Fließzelle in drei Segmenten für jede Lane aufzunehmen.
Platten pro Bildstreifen pro Kamerasegment	12	Eine Platte ist der Bereich der Fließzelle, den die Kamera als ein Bild sieht.
Gesamtzahl der aufgenommenen Platten	864	Die Gesamtzahl der Platten ist Lanes × Oberflächen × Bildstreifen × Kamerasegmente × Platten pro Bildstreifen pro Segment.

Lane-Nummerierung

Lanes 1 und 3 (Lane-Paar A) werden gleichzeitig aufgenommen. Lanes 2 und 4, zusammen bilden sie Lane-Paar B, werden aufgenommen, sobald Lane-Paar A aufgenommen wurde.

Abbildung 31 Lane-Nummerierung

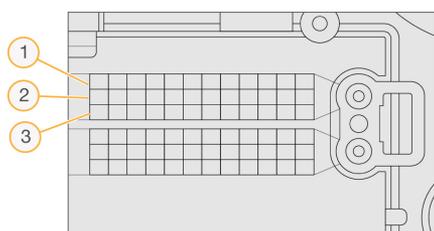


- A Lane-Paar A: Lanes 1 und 3
- B Lane-Paar B: Lanes 2 und 4

Bildstreifenummerierung

Jede Lane wird mit drei Bildstreifen aufgenommen. Die Bildstreifen haben bei Hochleistungsfließzellen die Nummern 1–3.

Abbildung 32 Bildstreifenummerierung

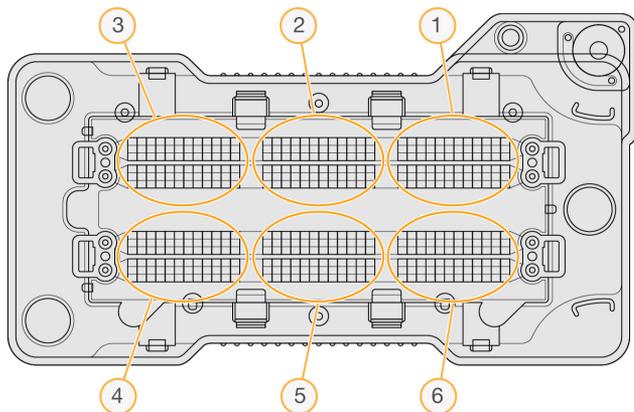


Kameranummerierung

Das NextSeq 550Dx-System verwendet sechs Kameras, um die Fließzelle abzubilden.

Die Kameras haben die Nummern 1–6. Die Kameras 1–3 nehmen Lane 1 auf. Die Kameras 4–6 nehmen Lane 3 auf. Sobald die Lanes 1 und 3 aufgenommen wurden, bewegt sich das Bildmodul entlang der X-Achse, um die Lanes 2 und 4 aufzunehmen.

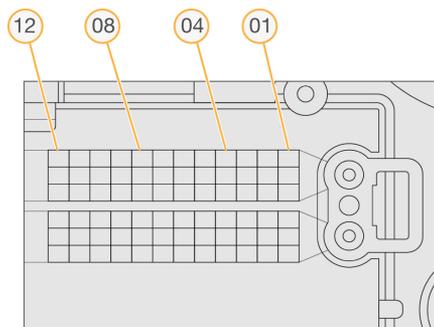
Abbildung 33 Kamera- und Segmentnummerierung (Hochleistungsfließzelle abgebildet)



Plattenummerierung

Es gibt 12 Platten in jedem Bildstreifen eines Kamerasegments. Die Platten sind ungeachtet der Bildstreifennummer und des Kamerasegments mit 01–12 nummeriert und werden mit zwei Ziffern dargestellt.

Abbildung 34 Plattenummerierung



Die vollständige Plattenummer umfasst fünf Ziffern, um die Position wie folgt darzustellen:

- ▶ **Oberfläche:** 1 stellt die obere Oberfläche dar, 2 die untere Oberfläche
- ▶ **Bildstreifen:** 1, 2 oder 3
- ▶ **Kamera:** 1, 2, 3, 4, 5 oder 6
- ▶ **Platte:** 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 oder 12

Beispiel: Die Plattenummer 12508 bedeutet obere Oberfläche, Bildstreifen 2, Kamera 5 und Platte 8.

Die vollständige fünfstellige Plattenummer wird im Dateinamen von Miniaturbildern und empirischen Phasierungsdateien verwendet. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter [Sequenzierungsausgabedateien](#) auf Seite 63.

Ordnerstruktur der Sequenzierungsausgabedaten

Die Steuerungssoftware generiert den Namen des Ausgabeordners automatisch.

📁 Data

📁 Intensities

📁 BaseCalls

📁 L001: Base-Call-Dateien für Lane 1, zusammengefasst in einer Datei pro Zyklus.

📁 L002: Base-Call-Dateien für Lane 2, zusammengefasst in einer Datei pro Zyklus.

📁 L003: Base-Call-Dateien für Lane 3, zusammengefasst in einer Datei pro Zyklus.

📁 L004: Base-Call-Dateien für Lane 4, zusammengefasst in einer Datei pro Zyklus.

📁 L001: Eine zusammengefasste *.locs-Datei für Lane 1.

📁 L002: Eine zusammengefasste *.locs-Datei für Lane 2.

📁 L003: Eine zusammengefasste *.locs-Datei für Lane 3.

📁 L004: Eine zusammengefasste *.locs-Datei für Lane 4.

📁 Images

📁 Focus

📁 L001: Fokusbilder für Lane 1.

📁 L002: Fokusbilder für Lane 2.

📁 L003: Fokusbilder für Lane 3.

📁 L004: Fokusbilder für Lane 4.

📁 **InterOp**: Binärdateien, die von Sequencing Analysis Viewer (SAV) verwendet werden.

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

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

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

📄 RTAConfiguration.txt

📄 RunInfo.xml

📄 RunNotes.xml

📄 RunParameters.xml

Scan-Ausgabedateien

Dateityp	Dateibeschreibung, Speicherort und Name
GTC-Dateien	Genotypaufrufdatei. Eine GTC-Datei wird für jede auf dem BeadChip gescannte Probe generiert. Der Dateiname besteht aus dem Barcode und dem Namen der gescannten Probe. [Barcode]_[Probe].gtc
Bilddateien	Die Namen der Bilddateien entsprechen dem gescannten Bereich auf dem BeadChip. Der Name besteht aus dem Barcode, dem Namen der Probe und dem Abschnitt auf dem BeadChip sowie dem Bildstreifen und dem Bildgebungskanal (rot oder grün). [Barcode]_[Probe]_[Abschnitt]_[Bildstreifen]_[Kamera]_[Platte]_[Kanal].jpg <ul style="list-style-type: none"> • Barcode: Der Dateiname beginnt mit dem BeadChip-Barcode. • Probe: Ein Bereich des BeadChips, der als Reihe (R0X), von oben bis unten, und Spalte (C0X), von links nach rechts, nummeriert ist. • Abschnitt: Eine nummerierte Zeile innerhalb einer Probe. • Bildstreifen: BeadChips werden als eine Sammlung überlappender Platten abgebildet. Daher wird nur ein Bildstreifen zum Abbilden des Abschnitts verwendet. • Kamera: Die zum Erstellen des Bilds verwendete Kamera. • Platte: Ein von der Kamera als Sichtfeld definierter Bildgebungsbereich. • Kanal: Ein Kanal ist entweder rot oder grün.

Ordnerstruktur der ausgegebenen Scan-Daten

📁 [Datum]_[Gerätename]_[Scan-Nr.]_[Barcode]

📁 [Barcode]

📁 Config

📄 Effective.cfg: Zeichnet die während des Scan-Vorgangs verwendeten Konfigurationseinstellungen auf.

📁 **Focus:** Enthält Bilddateien, die zum Fokussieren des Scans verwendet werden.

📁 **Logs:** Enthält Protokolldateien, in denen die einzelnen Schritte des Scan-Vorgangs protokolliert wurden.

📁 PreScanDiagnosticFiles

📁 [Datum_Uhrzeit] Barcode-Scan

📄 ProcessedBarcode.jpg: Bild des BeadChip-Barcodes.

📄 Scanning Diagnostics (Protokolldateien)

📄 PreScanChecks.csv: Zeichnet die Ergebnisse der automatischen Prüfung auf.

📄 GTC-Dateien: Genotypaufrufdateien (eine Datei pro Probe).

📄 IDAT-Dateien: [Optional] Intensitätsdatendateien (zwei Dateien pro Probe; eine Datei pro Kanal).

📄 Bilddateien: Scan-Bilder für jede Probe, jeden Abschnitt, jeden Bildstreifen, jede Kamera, jede Platte und jeden Kanal.

📄 [Barcode]_sample_metrics.csv

📄 [Barcode]_section_metrics.csv

📄 ScanParameters.xml

Index

A

- Adapter
 - BeadChip-Ausrichtung 31
 - BeadChip laden 33
 - Überblick 5
- Analyse
 - Ausgabedateien 63
- Analyse, primär
 - Signalreinheit 60
- Audio 13
- Ausgabedateien 63
- Ausgabedateien, Scannen
 - GTC, IDAT 67
- Ausgabedateien, Sequenzierung 63
- Ausschalten des Geräts 43

B

- Base-Call-Dateien 63
- Base-Calling 59
 - Indizierungshinweise 60
- BaseSpace 1, 54
 - Anmeldung 18
 - Übertragungssymbole 26
- BaseSpace-Konfiguration 23
- BeadChip
 - Adapter 5, 31
 - Analyse 1
 - Barcode-Ausrichtung 31
 - Einlesen des Barcodes nicht möglich 51
 - Laden 33
 - Registrierungsfehler 51
 - Typen 1
- Benutzername und Kennwort 11
- Bildgebung, Zweikanal-Sequenzierung 59
- Bildgebungskammer 3
- Bildstreifennummerierung 64
- BlueFuse Multi-Software 1

C

- Cluster nach Filterung 60
- Clusterbildung 15, 26
- Clusterspeicherort
 - Dateien 63
 - Matrizenbildung 58

D

- Datenübertragung
 - Aktivitätssymbole 26
 - allgemeiner Kopierdienst 26
 - Laufkopierdienst 26
 - Scannen von Daten 35
- Decode File Client 29
 - Zugriff nach BeadChip 31
 - Zugriff nach Konto 30
- DMAP-Ordner
 - Decode File Client 29
 - Herunterladen 30
- Dokumentation 2, 73

E

- Echtzeitanalyse-Software 1, 4
 - Ergebnisse 63
 - Phasierung 59
 - Workflow 58
- Eigenständige Konfiguration 24
- Ein/Aus-Taste 5, 11
- Eingabedateien, Scannen
 - Clusterdateien 29, 52
 - DMAP-Ordner 29
 - DMAP-Ordner, heruntergeladen 30
 - Manifestdateien 29, 52
- Empirische Phasierung 59
- Entsorgen von Verbrauchsmaterialien 13
- Erweiterte Ladeoption 13

F

- Fehler und Warnungen 4
 - in Ausgabedateien 58
- Fehlerbehebung
 - Behälter für verbrauchte Reagenzien 48
 - Einlesen des BeadChip-Barcodes nicht möglich 51
 - Kennzahlen mit geringer Intensitätszahl 49
 - Kontaktmöglichkeiten 45
 - Laufspezifische Dateien 45
 - Manifest- und Clusterdateien ersetzen 52
 - Scan-Registrierungsfehler 51
 - Scanspezifische Dateien 46
 - Selbsttest 46
- Fehlerwahrscheinlichkeit 61

Filterdateien 63
Fließzelle
 Ausrichtungsstifte 18
 Bildgebung 65
 Bildstreifennummer 64
 Lane-Nummerierung 64
 Lane-Paare 7
 Paketierung 17
 Platten 63
 Plattenummerierung 65
 Rehybridisierung 49
 Reinigen 17
 Typen 1
 Überblick 7
Formamid, Position 6 22

G

Gerät
 Ausschalten 43
 Avatar 12
 Ein/Aus-Taste 5
 Konfigurationseinstellungen 53
 Kurzname 12
 Modusanzeigen 12
 Neu starten 43
 Neustart durchführen 43
 Starten 11
Gerät verwalten
 Ausschalten 43
Gerätewartung
 Verbrauchsmaterialien 14
Gerätewaschlauf 37
GTC-Dateien 67

H

Hilfe
 Dokumentation 2
Hilfe, technische 73

I

Im Forschungsmodus neu starten 12
Indizierungshinweise 60
Intensitäten 59
InterOp-Dateien 45, 63

K

Kameranummerierung 65
Kennzahlen
 Base-Calling 59
 Clusterdichtezyklen 26
 Intensitätszyklen 26
Kompatibilität
 Fließzelle, Reagenzienkartusche 6
 RFID-Tracking 6, 8
Komponenten
 Bildgebungskammer 3
 Pufferkammer 3
 Reagenzienkammer 3
 Statusleiste 3
Konfiguration 54
Konfigurationseinstellungen 53
Kundendienst 73

L

Lane-Nummerierung 64
Lane-Paare 64
Laufdauer 15-16
Laufkennzahlen 25
Laufkonfiguration, erweiterte Option 13
Laufkopierdienst 26
Laufparameter
 BaseSpace-Modus 23
 Eigenständiger Modus 24
 Parameter bearbeiten 23
locs-Dateien 63
Luftfilter 4, 40

M

Matrizenbildung 58

N

Nach Filterung 60
Nachwaschung 27
Natriumhypochlorit, Waschlauf 38
Netzschalter 11
Neustart 43
 Gerät 43

O

Online-Schulungen 2
 Ordnerspeicherort 24

P

Phasierung, Vorphasierung 59
 Phred-Algorithmus 61
 Plattenummerierung 65
 Präventive Wartung 37
 Primer-Rehybridisierung 49
 Protokolldateien
 GlobalLog 58
 LaneNLog 58
 Pufferflasche 9, 21
 Pufferkammer 3

Q

Q-Scores 61

R

RAID-Fehlermeldung 53
 Read-Länge 15-16
 Reagenzien
 Im Kit 6
 Ordnungsgemäße Entsorgung 21
 Reagenzienkammer 3
 Reagenzienkartusche
 Behälter in Position 28 38
 Überblick 8
 Rehybridisierung, Read 1 49
 Reinheitsfilter 60
 RFID-Tracking 6
 Richtlinien für Wasser in Laborqualität 14
 RTA2
 Fehlerbehandlung 58
 RunInfo.xml 45, 63
 RUO-Modus 12

S

Scan-Ausgabedateien
 GTC, IDAT 67
 Selbsttest 24, 34
 Selbsttestfehler 46

Sequenzierung
 Einleitung 15
 Vom Benutzer bereitzustellende
 Verbrauchsmaterialien 14
 Sequenzierungsworkflow 58

Software

Automatisch aktualisieren 42
 Bildanalyse, Base-Calling 4
 im Gerät 4
 Initialisierung 11
 Konfigurationseinstellungen 53
 Laufdauer 15-16
 Manuelles Update 42
 Statusalarme 4
 Statusleiste 3
 Steuerungssoftware 4
 Symbole
 Fehler und Warnungen 4
 Status 4
 Systembenutzername und -kennwort 11
 Systemeinstellungen 12

T

Tastatur 13
 Technische Unterstützung 73

U

Überwachungsservice Illumina Proactive 54
 Update der Software 41

V

Verbrauchsmaterialien 6
 Fließzelle 7
 Gerätewartung 14
 Pufferflasche 9
 Reagenzienkartusche 8
 Sequenzierungsläufe 14
 Waschlauf-Verbrauchsmaterialien 37-38
 Wasser in Laborqualität 14
 Verbrauchte Reagenzien
 Behälter voll 48
 Entsorgung 20, 39
 Verwalten des Geräts
 Ausschalten 43
 Vom Benutzer bereitzustellende
 Verbrauchsmaterialien 14

W

Wartung, präventive 37

Waschlauf

Automatisch 27

Manueller Waschlauf 37

Vom Benutzer bereitzustellende

Verbrauchsmaterialien 37

Waschlaufkomponenten 37

Windows

Beenden 43

Workflow

BaseSpace-Anmeldung 18

BaseSpace-Modus 23

BeadChip 33

Eigenständiger Modus 24

Erweiterte Ladeoption 13

Fließzelle 18

Fließzelle vorbereiten 17

Indizierungshinweise 60

Laufdauer 15-16

Laufkennzahlen 25

Natriumhypochlorit 38

Pufferflasche 21

Reagenzienkartusche 21

Selbsttest 24, 34

Sequenzierung 58

Überblick 16, 30

Verbrauchte Reagenzien 20

Z

Zyklen in einem Read 15-16

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 Illumina-Kundendiensts

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

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

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



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Kalifornien 92122, USA

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Nur für Forschungszwecke. Nicht zur Verwendung in Diagnoseverfahren.

© 2018 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

illumina®