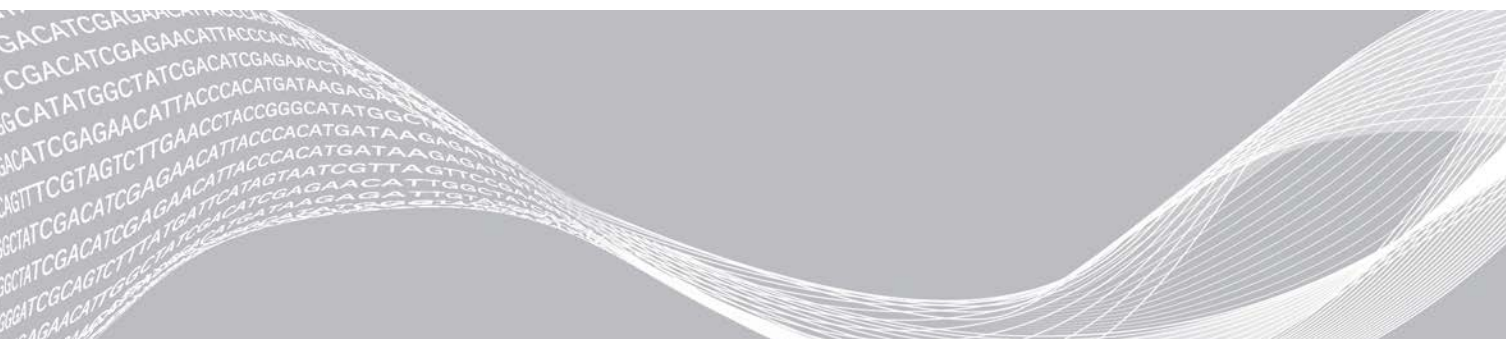


# Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Analysis Module

Arbeidsflytveiledning for NextSeq 550Dx

TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK

Oversikt	3
Oppgi kjøringsinformasjon	3
Analysemetoder	5
Vise kjøring og resultater	5
Resultatrapport	6
Analyseutdatafiler	6
Revisjonshistorikk	10
Teknisk hjelp	11



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

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

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

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

© 2022 Illumina, Inc. Med enerett.

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

## Oversikt

Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx-modulen demultiplekser først indekserte avlesninger. Hvis det finnes, genererer DNA GenerateFASTQ Dx intermedieære utdatafiler i FASTQ-filformatet og avslutter deretter arbeidsflyten. Det utføres ingen innretting eller videre analyse. FASTQ-filer er nødvendige inndata for analyse med tredjeparts analyseverktøy.

Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx-modulen kan kjøres på Local Run Manager v3.1.0 (eller nyere), og er kompatibel med NextSeq 550Dx Operating Software (NOS) v1.4 (eller nyere). Analysemodulen støtter sekvensering til analyse for Illumina DNA Prep with Enrichment Dx-analysen.

## Om denne veiledningen

Denne veiledningen gir instruksjoner om å konfigurere kjøringsparametere for sekvensering og analyse for DNA GenerateFASTQ Dx-analysemodulen. Bruk av programvaren krever grunnleggende kunnskap om det gjeldende Windows-operativsystemet og nettleserbasert brukergrensesnitt. Informasjon om Local Run Manager-instrumentbordet og -systeminnstillingene finnes i Referanseveiledning for *NextSeq 550Dx-instrumentet* (dokumentnr. 1000000009513).

## Oppgi kjøringsinformasjon

### Angi parametere

- 1 Logg på Local Run Manager.
- 2 Velg **Create Run** (Opprett kjøring), og velg deretter **DNA GenerateFASTQ Dx**.
- 3 Skriv inn et unikt kjøringsnavn som identifiserer kjøringen fra sekvensering til analyse (maksimalt 40 tegn). Kjøringsnavnet kan inneholde alfanumeriske tegn, mellomrom og spesialtegnene `~!@#\$\$%-\_{}`. Du kan ikke bruke et navn fra en tidligere kjøring.
- 4 **[Valgfritt]** Skriv inn en kjøringsbeskrivelse som gjør det lettere å identifisere kjøringen (maksimalt 150 tegn). Kjøringsbeskrivelsen kan inneholde alfanumeriske tegn, mellomrom og følgende spesialtegn: `~!@#\$\$%-\_{}`.
- 5 Konfigurer følgende kjøringsinnstillinger:
  - ▶ Index Plate (Indeksplate) – Velg indeksplateoppsettet som brukes under bibliotekklargjøring. Du kan velge mellom Index Set A (Indekssett A), Index Set B (Indekssett B) og Index Set AB (Indekssett AB). Informasjon om indeksplateoppsettene finnes i *Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx*. Indekssett A og B inneholder 96 prøver og de tilsvarende unike doble primerne (UDP-er). Indekssett AB inneholder 192 prøver og de tilsvarende UDP-ene.
  - ▶ Read Type (Avlesningstype) – Velg enkeltavlesning eller paired-end. Standard avlesningstype er paired-end.
  - ▶ Read Lengths (Avlesningslengder) – Skriv inn avlesningslengden. Standard avlesningslengde er 151.
- 6 Under Module-Specific Settings (Modulspesifikke innstillinger) angir du alternativet Adapter Trimming (Adaptertilpasning). Adaptertilpasning er aktivert som standard.
- 7 Velg antall prøver som skal sekvenseres. Valgt antall prøver omfatter automatisk utfylte UDP-anbefalinger. Hvis du ikke vil bruke UDP-anbefalinger, velger du **Custom** (Tilpasset).

Hvis antall prøver som du skal sekvensere ikke er inkludert i rullegardinlisten, velger du nærmeste antall prøver. Sørg for at det valgte antallet er mindre enn antallet som skal sekvenseres, og legg til ekstra UDP-er etter behov. Hvis du for eksempel skal teste 18 prøver, velger du alternativet 16 prøver.

## Spesifisere prøvene for kjøringen

Spesifiser prøvene for kjøringen ved å velge ett av følgende alternativer.

- ▶ **Enter samples manually** (Angi prøver manuelt) – Bruk den tomme tabellen på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).
- ▶ **Import samples** (Importer prøver) – Naviger til en ekstern fil i kommadelt CSV-format. En mal kan lastes ned på skjermbildet Create Run (Opprett kjøring).

## Legge inn prøver manuelt

- 1 Skriv inn en unik prøve-ID i fanen Sample ID (Prøve-ID). Bruk alfanumeriske tegn og/eller bindestreker (maksimalt 40 tegn).  
Prøve-ID-en, samt tilhørende prøvebeskrivelse og UDP-posisjon, er uthevet i blått for å indikere at prøven er skrevet inn.
- 2 **[Valgfritt]** Hvis du vil velge positive eller negative kontrollprøver, høyreklikker du på prøvebrønner.
- 3 **[Valgfritt]** Angi en prøvebeskrivelse i fanen Sample Description (Prøvebeskrivelse). Prøvebeskrivelsen kan inneholde alfanumeriske tegn, punktum og spesialtegnene `~!@#\$\$%\_-\_{}  
Hvis prøve-ID-en som er knyttet til prøvebeskrivelsen brukes igjen i en senere kjøring, overskrives den første prøvebeskrivelsen.
- 4 Endre de anbefalte UDP-posisjonene etter behov. De foreslåtte prøvebrønnposisjonene er uthevet i gult, lilla, oransje og rosa.  
Hvis du bruker foreslåtte prøvebrønner, fyller programvaren automatisk ut UDP-indeksadapterne som oppfyller krav til indeksemangfold. Hvis antall prøver som du valgte ikke er det nøyaktige antallet prøver som du skal teste, må du velge UDP-indeksadaptere for de ekstra brønnene.
- 5 **[Valgfritt]** Velg **Export Samples** (Eksporter prøver) for å eksportere prøveinformasjonsfilen.
- 6 Velg **Save Run** (Lagre kjøring).

## Importere prøveark

Du kan importere prøveinformasjon fra en prøveinformasjonsfil som tidligere er eksportert fra DNA GenerateFASTQ Dx-modulen ved hjelp av funksjonen Export Samples (Eksporter filer) eller en malfil, som kan genereres ved å velge **Template** (Mal) i skjermbildet Create Run (Opprett mal). Instruksjoner om hvordan prøveinformasjon opprettes og importeres finnes under *Legge inn prøver manuelt på side 4*.

Malfilen omfatter ikke de automatisk utfylte UDP-anbefalingene.

Slik redigerer du malfilen:

- 1 Velg **Template** (Mal) i skjermbildet Create Run (Opprett kjøring) for å lage et nytt plateoppsett. Malfilen inneholder de riktige kolonneoverskriftene for import. Rediger filene på følgende måte:
  - a Åpne prøvearket i et tekstredigeringsprogram.
  - b Skriv inn nødvendig prøveinformasjon.
  - c Lagre filen i format med kommadelte verdier (\*.csv). Sørg for at prøve-ID-ene er unike.

Slik importerer du prøveinformasjon:

- 2 Velg **Import Samples** (Importer prøver), og velg deretter CSV-filen.

- 3 [Valgfritt] Velg **Export** (Eksporter) for å eksportere prøveinformasjon til en ekstern fil.
- 4 Velg **Save Run** (Lagre kjøring).

## Redigere en kjøring

Instruksjoner om hvordan du redigerer informasjonen i kjøringen før sekvensering, finnes i *Referanseveiledning for NextSeq 550Dx-instrumentet (dokumentnr. 1000000009513)*.

## Analysemetoder

DNA GenerateFASTQ Dx-analysemodulen utfører følgende analysetrinn og skriver deretter analyseutdatafiler til innrettingsmappen.

- ▶ Demultiplekserer indeksavlesninger
- ▶ Genererer FASTQ-filer

## Demultipleksing

Demultipleksing sammenligner hver indeksavlesningssekvens med indekssekvensene som er spesifisert for kjøringen. Ingen kvalitetsverdier blir vurdert i dette trinnet.

Indeksavlesninger blir identifisert ved hjelp av følgende trinn:

- ▶ Prøver blir nummerert med start fra 1 basert på rekkefølgen de er listet opp for kjøringen.
- ▶ Prøvenummer 0 er reservert for klynger som ikke ble tilordnet en prøve.
- ▶ Klynger blir tilordnet en prøve når indekssekvensen samsvarer nøyaktig eller når det er opptil et enkelt misforhold per indeksavlesning.

## FASTQ-filgenerering

Etter demultipleksing genererer programvaren intermedieære analysefiler i FASTQ-format, som er et tekstformat som brukes til å representere sekvenser. FASTQ-filer inneholder avlesninger for hver prøve og tilknyttede kvalitetsscorer. Kontroller som ble brukt til kjøringen og klyngene som ikke passerte filtre, blir utelatt.

Hver FASTQ-fil inneholder avlesninger for bare én prøve, og navnet på denne prøven er inkludert i FASTQ-filnavnet. FASTQ-filer er primære inndata for innretting.

## Vise kjøring og resultater

- 1 På Local Run Manager-instrumentbordet velger du kjørningsnavnet.
- 2 I fanen Run Overview (Kjøringsoversikt) går du gjennom metrikken for sekvenseringskjøringer.
- 3 Hvis du vil endre analysedatafilens plassering slik at den valgte filen kan settes i kø på nytt senere, velger du ikonet **Edit** (Rediger) og redigerer filbanen til kjøringens utdatamappe. Du kan ikke redigere navnet til kjøringens utdatamappe.
- 4 [Valgfritt] Velg **Copy to Clipboard** (Kopier til utklippstavle) for å kopiere filbanen til kjøringens utdatamappe.
- 5 Velg fanen Sequencing Information (Sekvenseringsinformasjon) for å gå gjennom kjørningsparametere og informasjon om forbruksmateriell.

- 6 Velg fanen Samples and Results (Prøver og resultater) for å vise analyserapporten.
  - ▶ Hvis analysen ble satt i kø på nytt, velger du riktig analyse i rullegardinmenyen Select Analysis (Velg analyse).
  - ▶ På venstre navigasjonsfelt velger du en prøve-ID for å vise rapporten for en annen prøve.
- 7 **[Valgfritt]** Velg **Copy to Clipboard** (Kopier til utklippstavle) for å kopiere filbanen til analysemappen.

## Resultatrapport

Results (Resultater) er oppsummert i fanen Samples and Results (Prøver og resultater).

## Prøver

Tabell 1 Prøvetabell

Kolonneoverskrift	Description (Beskrivelse)
Sample ID (Prøve-ID)	Prøve-ID-en som ble gitt da kjøringen ble opprettet.
Plate	Platen som ble oppgitt som indeksplaten da kjøringen ble opprettet. Denne kolonnen vises bare hvis indeksplate AB er valgt.
Index Well (Indeksbrønn)	Indeksbrønnen som ble oppgitt på prøvebrønnens sted da kjøringen ble opprettet.
Description (Beskrivelse)	Prøvebeskrivelsen som ble oppgitt da kjøringen ble opprettet.
UDP	UDP-en som brukes med prøven.
Control (Kontroll)	Den positive eller negative kontrollen som brukes med prøven.

## Indeksering

Tabell 2 Indekseringstabell

Kolonneoverskrift	Description (Beskrivelse)
Index Number (Indeksnummer)	En tilordnet ID basert på rekkefølgen til prøver i prøvetabellen.
Sample ID (Prøve-ID)	Prøve-ID-en som ble gitt da kjøringen ble opprettet.
UDP	UDP-en som brukes med prøven.
% Reads Identified (PF) (% identifiserte avlesninger (PF))	Prosentandelen avlesninger som passerte filtre.

## Analyseutdatafiler

Følgende analyseutdatafiler genereres for DNA GenerateFASTQ Dx-analysemodulen.

Filnavn	Description (Beskrivelse)
Demultipleksing (*.demux)	Intermediære filer som inneholder demultipleksingsresultater.
FASTQ (*.fastq.gz)	Intermediære filer som inneholder kvalitetsscorede basebetegnelser. FASTQ-filer er primære inndata for innrettingstrinnet.

## Filformat for demultipleksing

Prosessen med demultipleksing leser av indekssekvensen knyttet til hver klynge for å bestemme hvilken prøve klyngen stammer fra. Tilordningen mellom klynger og prøvenummer skrives til en demultipleksingsfil (\*.demux) for hver flis i strømningscellen.

Filnavnformatet for demultipleksing er **s\_1\_X.demux**, der X er flisnummeret.

Demultipleksingsfiler begynner med en overskrift:

- ▶ Versjon (heltall på 4 byte), for øyeblikket 1
- ▶ Klyngeantall (heltall på 4 byte)

Resten av filen består av prøvenumre for hver klynge fra flisen.

Når demultipleksingstrinnet er fullført, genererer programvaren en demultipleksingsfil som heter **DemultiplexSummaryF1L1.txt**.

- ▶ I filnavnet representerer **F1** strømningscellenummeret.
- ▶ I filnavnet representerer **L1** banenummeret.
- ▶ Demultipleksing resulterer i en tabell med én rad per flis og én kolonne per prøve, inkludert prøve 0.
- ▶ De vanligste sekvensene i indeksavlesninger.

## FASTQ-filformat

FASTQ er et tekstbasert filformat som inneholder basebetegnelser og kvalitetsverdier per avlesning. Hver post inneholder 4 linjer:

- ▶ Identifikatoren
- ▶ Sekvensen
- ▶ Et plusstegn (+)
- ▶ Phred-kvalitetsscorene i et ASCII + 33-kodet format

Identifikatoren er formatert som:

**@Instrument:RunID:FlowCellID:Lane:Tile:X:Y ReadNum:FilterFlag:0:SampleNumber**

Eksempel:

```
@SIM:1:FCX:1:15:6329:1045 1:N:0:2
TCGCACTCAACGCCCTGCATATGACAAGACAGAATC
+
<>;##=><9=AAAAAAAAAAA9#:<#<;<<<????#=#
```

## Supplerende utdatafiler

Følgende utdatafiler gir supplerende informasjon eller oppsummerer kjøringsresultater og analysefeil. Selv om disse filene ikke er nødvendige for å vurdere analyseresultater, kan de brukes til feilsøkningsformål. Alle filer er plassert i innrettingsmappen, med mindre annet er oppgitt.

Filnavn	Descroption (Beskrivelse)
<b>AdapterTrimming.txt</b>	Oppgir antall tilpassede baser og prosentandel baser for hver flis. Denne filen finnes bare hvis adaptertilpasning ble angitt for kjøringen.
<b>AnalysisLog.txt</b>	Behandlingslogg som beskriver hvert trinn som skjedde under analyse av den aktuelle kjøringssmappen. Denne filen inneholder ikke feilmeldinger. Plassert på kjøringssmappens rotnivå.
<b>AnalysisError.txt</b>	Behandlingslogg som oppgir eventuelle feil som oppsto under analyse. Hvis det ikke oppsto feil, vil filen være tom. Plassert på kjøringssmappens rotnivå.

Filnavn	Description (Beskrivelse)
<b>CompletedJobInfo.xml</b>	Skrives etter at analysen er fullført, og inneholder informasjon om kjøringen, f.eks. dato, strømningsscelle-ID, programvareversjon og andre parametere. Plassert på kjøringssjappens rotnivå.
<b>Checksum.csv</b>	Inneholder filnavn og unike kontrollsumverdier for bestemte og uvisse FASTQ-filer, BCL-filer og filen <b>SampleSheetUsed.csv</b> .
<b>DemultiplexSummaryF1L1.txt</b>	Rapporterer demultiplexingsresultater i en tabell med 1 rad per flis og 1 kolonne per prøve.
<b>GenerateFASTQRunStatistics.xml</b>	Inneholder sammenfattende statistikk som er spesifikk for kjøringen. Plassert på kjøringssjappens rotnivå.

## Analysis Folder (Analysemappe)

Analysemappen inneholder filene som er generert av Local Run Manager-programvaren.

Forholdet mellom utdatamappen og analysemappen oppsummeres på følgende måte:

- ▶ Under sekvensering fyller Real-Time Analysis (RTA) utdatamappen med filer som er generert under bildeanalyse, basebetegnelse og kvalitetsscoring.
- ▶ RTA kopierer filer til analysemappen i sanntid. Etter at RTA har tilordnet en kvalitetsscore til hver base for hver syklus, skriver programvaren filen RTAComplete.xml til begge mappene.
- ▶ Når filen RTAComplete.xml er til stede, begynner analysen.
- ▶ Mens analysen fortsetter, skriver Local Run Manager utdatafiler til analysemappen og kopierer deretter filene tilbake til utdatamappen.

## Innrettingsmapper

Hver gang analysen settes i kø på nytt, oppretter Local Run Manager en innrettingsmappe som heter **Alignment\_N**, der N er et sekvensielt nummer.

## Mappestruktur

- 📁 Data
- 📁 Alignment\_## eller Alignment\_Imported\_##
  - 📁 [Tidsstempel for kjøring]
    - 📁 DataAccessFiles
    - 📁 Fastq
      - 📁 FastqSummaryF1L1.txt
      - 📁 Sample1\_S1\_L001\_R1\_001.fastq.gz
      - 📁 Sample2\_S2\_L001\_R2\_001.fastq.gz
      - 📁 Undetermined\_S0\_L001\_R1\_001.fastq.gz
      - 📁 Undetermined\_S0\_L001\_R2\_001.fastq.gz
    - 📁 Logging
      - 📁 BuildFastq0.stdout.txt
      - 📁 BuildFastq1.stdout.txt
      - 📁 commands.txt



- 📁 Plots
- 📁 AdapterCounts.txt
- 📁 AdapterTrimming.txt
- 📁 AnalysisError.txt
- 📁 AnalysisLog.txt
- 📁 Checkpoint.txt
- 📁 Checksum.csv
- 📁 CompletedJobInfo.xml
- 📁 DemultiplexSummaryF1L1.txt
- 📁 GenerateFASTQRunStatistics.xml
- 📁 SampleSheetUsed.csv

## Basebetegnelse og indeksmangfold

Når prøver sekvenseres med NextSeq 550Dx-instrumentet, vil basebetegnelsen bestemme en base (A, C, G eller T) for hver klynge til en bestemt plate, eller avbildningsområdet på strømningscellen, ved en spesifikk syklus. NextSeq 550Dx-instrumentet bruker tokanalssekvensering, som krever to bilder for å kode dataene for fire DNA-baser, ett fra den røde kanalen og ett fra den grønne kanalen.

Prosessen for basebetegnelsesindeksavlesninger avviker fra basebetegnelse ved andre avlesninger.

Indeksavlesninger må starte med minst én base som ikke er G, i én av de to første syklusene. Hvis en indeksavlesning starter med to G-basebetegnelser, genereres det ingen signalintensitet. Signalet må være til stede i én av de to første syklusene for å kunne sikre demultipleksing.

Når du velger indekser ved oppretting av en kjøring, vil det vises en advarsel om lavt mangfold dersom indeksene ikke oppfyller mangfoldkravene. For å unngå en advarsel om lavt mangfold må du velge indeksssekvenser som gir signal i begge kanalene for hver syklus.

- ▶ Rød kanal – A eller C
- ▶ Grønn kanal – A eller T

Denne basebetegnelsesprosessen sikrer nøyaktighet ved analysering av få prøver samtidig. Mer informasjon om sekvensene for indeksene dine finnes i *Pakningsvedlegg for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx*.

Når du oppretter en kjøring i Local Run Manager, må du velge antallet prøver som skal testes. Foreslåtte indeksskombinasjoner som oppfyller indeksmangfoldkravene, fylles automatisk ut av programvaren. Selv om det ikke er påkrevd å bruke foreslåtte UDP-indeksskombinasjoner, anbefales det.

## Revisjonshistorikk

Dokument	Dato	Beskrivelse av endring
Dokumentnr. 200015671 v01	Mai 2022	La til adresse for australsk sponsor. Forklarte begrensning for prøvebeskrivelse.
Dokumentnr. 200015671 v00	Feb 2022	Første versjon

## Teknisk hjelp

Kontakt teknisk støtte hos Illumina for teknisk hjelp.

**Nettsted:** [www.illumina.com](http://www.illumina.com)  
**E-post:** [techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

Telefonnumre til Illuminas kundestøtte

Region	Gratis	Regionalt
Nord-Amerika	+1.800.809.4566	
Australia	+1.800.775.688	
Belgia	+32 80077160	+32 34002973
Danmark	+45 80820183	+45 89871156
Finland	+358 800918363	+358 974790110
Frankrike	+33 805102193	+33 170770446
Hongkong, Kina	800960230	
Irland	+353 1800936608	+353 016950506
Italia	+39 800985513	+39 236003759
Japan	0800.111.5011	
Kina	400.066.5835	
Nederland	+31 8000222493	+31 207132960
New Zealand	0800.451.650	
Norge	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Singapore	+1.800.579.2745	
Spania	+34 911899417	+34 800300143
Storbritannia	+44 8000126019	+44 2073057197
Sveits	+41 565800000	+41 800200442
Sverige	+46 850619671	+46 200883979
Sør-Korea	+82 80 234 5300	
Taiwan, Kina	00806651752	
Tyskland	+49 8001014940	+49 8938035677
Østerrike	+43 800006249	+43 19286540
Andre land	+44.1799.534000	

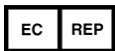
Sikkerhetsdatablad – Tilgjengelige på Illuminas nettsted på [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

Produktdokumentasjon – Tilgjengelig for nedlasting fra [support.illumina.com](http://support.illumina.com).



Illumina  
5200 Illumina Way  
San Diego, California, 92122 USA  
+1 800 809 ILMN (4566)  
+1 858 202 4566 (utenfor Nord-Amerika)  
techsupport@illumina.com  
www.illumina.com

CE



Illumina Netherlands B.V.  
Steenoven 19  
5626 DK Eindhoven  
Nederland

**Australsk sponsor**

Illumina Australia Pty Ltd  
Nursing Association Building  
Level 3, 535 Elizabeth Street  
Melbourne, VIC 3000  
Australia

**TIL IN VITRO-DIAGNOSTISK BRUK**

© 2022 Illumina, Inc. Med enerett.

**illumina®**