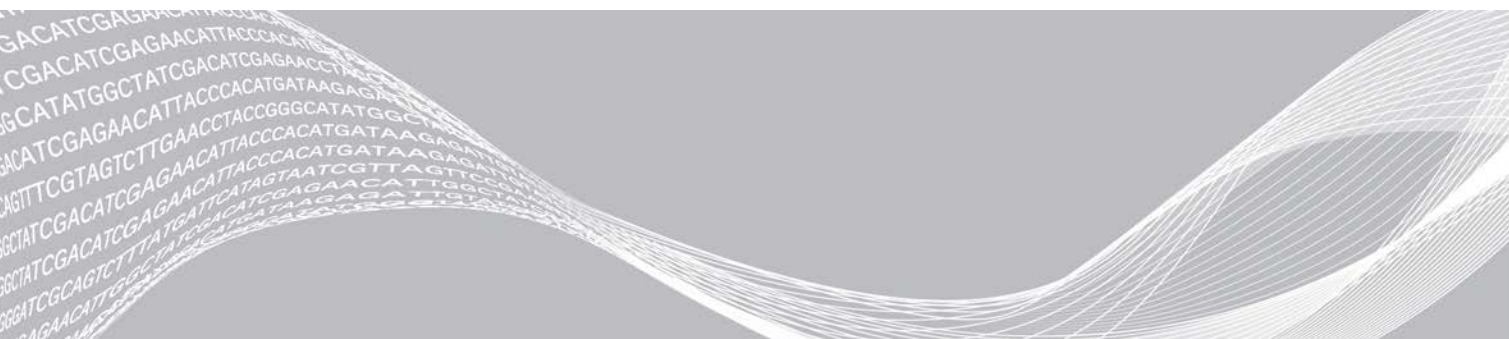


Tarkvara Local Run Manager analüüsimooduli DNA GenerateFASTQ Dx

Töövoe juhend seadmele NextSeq 550Dx

IN VITRO DIAGNOSTILISEKS KASUTAMISEKS

Ülevaade	3
Käituse teabe sisestamine	3
Analüüsimeetodid	5
Käituse ja tulemuste vaatamine	5
Tulemuste aruanne	6
Analüüsi väljundfailid	6
Versioonide ajalugu	10
Tehniline tugi	11



See dokument ja selle sisu kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. ja selle tütarettevõtetele („Illumina“) ning on mõeldud kasutamiseks ainult ettevõtte lepingulistele klientidele seoses selles dokumendis kirjeldatud toote (toodete) kasutamisega ega ole mõeldud mitte mingiks muuks otstarbeks. Seda dokumenti ega selle sisu ei tohi mis tahes viisil kasutada ega muul eesmärgil levitada ja/või edastada, avaldada või reprodutseerida ilma Illumina eelneva kirjaliku nõusolekuta. Illumina ei anna selle dokumendiga kolmandale isikule oma patendi-, kaubamärgi-, autori-, tava- või muu sarnase õiguse alusel mitte ühtegi litsentsi.

Kvalifitseeritud ja asjakohase koolituse saanud töötajad peavad selles dokumendis kirjeldatud juhiseid järgima rangelt ja üksikasjalikult, et tagada siin kirjeldatud toote (toodete) õige ja ohutu kasutusviis. Siinse dokumendi sisu tuleb enne nimetatud toote (toodete) kasutamist täies ulatuses läbi lugeda ja endale selgeks teha.

SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD JUHISTE MITTE LUGEMINE JA MITTE ÜKSIKASJALIKULT JÄRGIMINE VÕIB KAHJUSTADA TOODET (TOODEID), VIGASTADA INIMESI (SH KASUTAJAID VÕI TEISI) JA KAHJUSTADA MUUD VARA. NIMETATUD JUHUL EI KEHTI ÜKSKI TOOTELE (TOODETELE) ANTUD GARANTII.

ILLUMINA EI VASTUTA SELLES DOKUMENDIS KIRJELDATUD TOOTE (TOODETE) (SEALHULGAS TOOTE OSAD VÕI TARKVARA) VÄÄRKASUTUSE EEST.

© 2022 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

Kõik kaubamärgid kuuluvad ettevõttele Illumina, Inc. või nende vastavatele omanikele. Kaubamärgi kohta lisateabe saamiseks vt www.illumina.com/company/legal.html.

Ülevaade

Tarkvara Local Run Manager moodul DNA GenerateFASTQ Dx demultipleksib kõigepealt indekseeritud lugemid. Kui DNA GenerateFASTQ Dx on olemas, loob see FASTQ-failivormingus vaheväljundfailid ja väljub seejärel töövoost. Joondamist ega täiendavat analüüsi ei tehta. FASTQ-failid on nõutavad kolmanda osapoole analüüsitööriistadega analüüsimiseks.

Tarkvara Local Run Manager moodulit DNA GenerateFASTQ Dx saab käivitada tarkvara Local Run Manager versioonis 3.1.0 (või uuemas versioonis) ja see ühildub operatsioonisüsteemiga NextSeq 550Dx (NOS) v1.4 (või uuema versiooniga). Analüüsimoodul toetab analüüsi Illumina DNA Prep with Enrichment Dx jaoks sekveneerimist.

Teave selle juhendi kohta

Selles juhendis on toodud juhised sekveneerimise ja analüüsimise käitusparameetrite seadistamiseks analüüsimooduli DNA GenerateFASTQ Dx jaoks. Tarkvara kasutamiseks on vaja põhiteadmisi kehtivast Windowsi operatsioonisüsteemist ja veebibrauseripõhisest kasutajaliidesest. Lisateavet tarkvara Local Run Manager juhtpaneeli ja süsteemisätete kohta leiate seadme *NextSeq 550Dx viitejuhendist (dokument nr 1000000009513)*.

Käituse teabe sisestamine

Parameetrite määramine

- 1 Logige sisse rakendusse Local Run Manager.
- 2 Valige käsk **Create Run** (Loo käitus) ja seejärel **DNA GenerateFASTQ Dx**.
- 3 Sisestage kordumatu käituse nimi, mis identifitseerib käituse sekveneerimisest analüüsini (kuni 40 tähemärki).
Käituse nimi võib sisaldada tähtnumbrilisi märke, tühikuid ja erimärke `~!@#$$%-_{}`. Te ei saa kasutada mõne varasema käituse nime.
- 4 **[Valikuline]** Sisestage käituse kirjeldus, et aidata käitust identifitseerida (kuni 150 tähemärki).
Käituse kirjeldus võib sisaldada tähtnumbrilisi märke, tühikuid ja järgmisi erimärke:
`~!@#$$%-_{}`.
- 5 Konfigureerige järgmisi käitussätteid.
 - ▶ Index Plate (Indeksiplaat) — valige teegi ettevalmistamise käigus kasutatud indeksiplaadi paigutus. Saate valida paigutuse Index Set A (Indeksikomplekt A), Index Set B (Indeksikomplekt B) või Index Set AB (Indeksikomplekt AB). Lisateavet indeksiplaatide paigutuste kohta leiate komplekti *Illumina DNA Prep With Enrichment Dx pakendi infolehest*.
Indeksikomplektid A ja B sisaldavad 96 proovi ning vastavaid unikaalseid topeltprimereid (UDP-sid). Indeksikomplekt AB sisaldab 192 proovi ja vastavaid UDP-sid.
 - ▶ Read Type (Lugemi tüüp) – valige üksiklugem või paarisotsaline lugem. Vaikelugem on paarisotsaline.
 - ▶ Read Lengths (Lugemite pikkused) — sisestage lugemi pikkus. Lugemi vaikepikkus on 151.
- 6 Seadistage jaotises Module-Specific Settings (Moodulispetsiifilised sätted) suvandit Adapter Trimming (Adapteri kärpimine).
Adapteri kärpimine on vaikimisi lubatud.
- 7 Valige sekveneeritavate proovide arv. Valitud proovide arv sisaldab automaatselt sisestatud UDP soovitusi. Kui te ei soovi UDP soovitusi kasutada, valige suvand **Custom** (Kohandatud).

Kui ripploendis ei ole sekveneeritavate proovide arvu, valige lähim proovide arv. Veenduge, et valitud arv oleks sekveneeritavast proovide arvust väiksem, ja lisage vajaduse korral täiendavaid UDP-sid. Näiteks kui soovite testida 18 proovi, valige 16 proovi.

Proovide määramine käituse jaoks

Määrake käituse proovid, kasutades üht järgmistest valikutest.

- ▶ **Proovide sisestamine käsitsi** – kasutage tühja tabelit kuval Create Run (Käituse loomine).
- ▶ **Proovide importimine** – liikuge komaeraldusega väärtuste (*.csv) vormingus välise faili juurde. Malli saab alla laadida kuvalt Käituse loomine.

Proovide sisestamine käsitsi

- 1 Sisestage vahekaardile Sample ID (Proovi ID) unikaalne proovi ID. Kasutage tähtnumbrilisi märke ja/või sidekriipse (kuni 40 tähemärki).
Proovi ID ja vastav proovi kirjeldus ning UDP asukoht on sinisega esile tõstetud, mis näitab, et proov on sisestatud.
- 2 **[Valikuline]** Positiivsete või negatiivsete kontrollproovide valimiseks paremklõpsake proovisüvenditel.
- 3 **[Valikuline]** Sisestage vahekaardile Sample Description (Proovi kirjeldus) proovi kirjeldus. Proovi kirjeldus võib sisaldada tähtnumbrilisi märke, punkte ja erimärke `~!@#\$%-_{}
Tühikud ei ole lubatud.
Kui proovi kirjeldusega seotud proovi ID-d kasutatakse hilisemas käituses uuesti, kirjutatakse esialgne proovi kirjeldus üle.
- 4 Vajaduse korral muutke soovitatud UDP-positsioone. Soovitatavad proovisüvendi asukohad on esile tõstetud kollase, lilla, oranži ja roosaga.
Soovitatud proovisüvendite kasutamise korral täidab tarkvara automaatselt UDP indeksadapterid, mis vastavad indeksi mitmekesisuse nõuetele. Kui valitud proovide arv pole analüüsitava proovide täpne arv, valige lisasüvendite jaoks kindlasti UDP indeksadapterid.
- 5 **[Valikuline]** Valige käsk **Export Samples** (Ekspordi proovid), et eksportida prooviteabe fail.
- 6 Valige käsk **Save Run** (Salvesta käitus).

Proovilehe importimine

Saate importida prooviteavet prooviteabe failist, mis on varem moodulist DNA GenerateFASTQ Dx eksporditud, kasutades funktsiooni Export Samples (Ekspordi proovid) või mallifaili, mille saab luua, valides kuval Create Run (Loo käitus) suvandi **Template** (Mall). Vt jaotises *Proovide sisestamine käsitsi* leheküljel 4 olevaid juhiseid prooviteabe loomise ja ekspordimise kohta.

Mallifail ei sisalda automaatselt sisestatud UDP soovitusi.

Tehke mallifaili muutmiseks järgmist.

- 1 Uue plaadikujunduse tegemiseks valige **Mall** kuval Käituse loomine. Mallifail sisaldab impordiks õigeid veerupäiseid. Redigeerige faili järgmiselt.
 - a Avage proovileht tekstiredaktoris.
 - b Sisestage nõutud prooviteave.
 - c Salvestage fail komadega eraldatud väärtuste (*.csv) vormingus. Veenduge, et proovi ID-d oleksid kordumatud.

Tehke prooviteabe importimiseks järgmist.

- 2 Valige suvand **Import Samples** (Impordi proovid) ja valige seejärel CSV-fail.

- 3 [Valikuline] Valige **Export** (Ekspordi), et eksportida prooviteave välisesse faili.
- 4 Valige käsk **Save Run** (Salvesta käitus).

Käituse redigeerimine

Juhiseid teabe muutmise kohta käituse ajal enne sekveneerimist vt seadme *NextSeq 550Dx viitejuhendist* (dokument nr 1000000009513).

Analüüsimeetodid

Analüüsimoodul DNA GenerateFASTQ Dx läbib järgmised analüüsietapid ja kirjutab seejärel analüüsi väljundfailid joonduste kausta.

- ▶ Demultipleksib indeksi lugemid
- ▶ Loob FASTQ-failid

Demultipleksimine

Demultipleksimine võrdleb iga indeksi lugemi järjestust käituse jaoks määratud indeksite järjestustega. Selles etapis ei arvestata kvaliteediväärtustega.

Indeksite lugemid identifitseeritakse järgmiste sammudega:

- ▶ Proovid nummerdatakse alates 1-st, lähtudes nende järjestusest käituse jaoks.
- ▶ Valimi number 0 on reserveeritud klastritele, mida proovile ei määratud.
- ▶ Klastrid määratakse proovile siis, kui indeksi järjestus vastab täpselt või kui indeksi lugemi kohta on kuni üks mittevastavus.

FASTQ-failide genereerimine

Pärast demultipleksimist genereerib tarkvara vaheanalüüsi failid FASTQ-vormingus, mis on tekstivorming, mida kasutatakse järjestuste esitamiseks. FASTQ-failid sisaldavad kõikide proovide lugemeid ja seonduvaid kvaliteediskoore. Kõik käituse puhul kasutatud kontrollmaterjalid ja klastrid, mis filtreid ei läbinud, on välistatud.

FASTQ-fail sisaldab ainult ühe proovi lugemeid ja selle proovi nimi sisaldub FASTQ-faili nimes. FASTQ-failid on joondamise peamine sisend.

Käituse ja tulemuste vaatamine

- 1 Valige tarkvara Local Run Manager juhtpaneelil käituse nimi.
- 2 Vaadake vahekaardil Run Overview (Käituse ülevaade) üle sekveneerimiskäituse mõõdikud.
- 3 Analüüsi andmefaili asukoha muutmiseks, et edaspidi valitud käitus uuesti järjestada, valige ikoon **Edit** (Redigeeri) ja redigeerige käituse väljundkausta failiteed. Käituse väljundkausta nime ei saa redigeerida.
- 4 [Valikuline] Käituse väljundkausta failitee kopeerimiseks valige suvand **Copy to Clipboard** (Kopeeri lõikelauale).
- 5 Käitusparameetrite ja kulutarvikute teabe vaatamiseks valige vahekaart Sequencing Information (Sekveneerimise teave).

- 6 Analüüsiaruande vaatamiseks valige vahekaart Samples & Results (Proovid ja tulemused).
 - ▶ Kui analüüs järjestati uuesti, valige rippmenüüst Select Analysis (Vali analüüs) sobiv analüüs.
 - ▶ Valige vasakpoolsetl navigeerimisribalt proovi ID, et vaadata teise proovi aruannet.
- 7 **[Valikuline]** Analüüsikausta failitee kopeerimiseks valige suvand **Copy to Clipboard** (Kopeeri lõikelauale).

Tulemuste aruanne

Tulemused on kokku võetud vahekaardil Samples and Results (Proovid ja tulemused).

Proovid

Tabel 1 Proovide tabel

Veeru pealkiri	Kirjeldus
Sample ID (Proovi ID)	Proovi ID, mis anti käituse loomisel.
Plate (Plaat)	Käituse loomise käigus indeksiplaadiga kaasas olnud plaat. Veerg kuvatakse ainult siis, kui on valitud indeksiplaat AB.
Index Well (Indeksisüvend)	Käituse loomise käigus indeksisüvendi asukohaga kaasas olnud indeksisüvend.
Description (Kirjeldus)	Käituse loomise käigus esitatud proovi kirjeldus.
UDP	Prooviga kasutatav UDP.
Control (Kontrollmaterjal)	Prooviga kasutatav positiivne või negatiivne kontrollmaterjal.

Indekseerimine

Tabel 2 Indekseerimise tabel

Veeru pealkiri	Kirjeldus
Index Number (Indeksi number)	Määratud ID, mis põhineb proovide proovitabelis loetlemise järjekorral.
Sample ID (Proovi ID)	Proovi ID, mis anti käituse loomisel.
UDP	Prooviga kasutatav UDP.
% Reads Identified (PF) (Tuvastatud lugemite % (PF))	Filtri läbinud lugemite osakaal.

Analüüsi väljundfailid

Analüüsimooduli DNA GenerateFASTQ Dx jaoks luuakse järgmised analüüsi väljundfailid.

Faali nimi	Kirjeldus
Demultipleksimine (*.demux)	Vahefailid, mis sisaldavad demultipleksimise tulemusi.
FASTQ (*.fastq.gz)	Vahefailid, mis sisaldavad kvaliteediskooriga aluste määramisi. FASTQ-failid on joondamisetapi peamine sisend.

Failivormingu demultipleksimine

Demultipleksimisprotsess loeb igale klastrile lisatud indeksijärjestuse, et teha kindlaks, millisest proovist klaster pärineb. Klastre ja proovinumbri vastendus kirjutatakse läbivooluküveti iga paani demultipleksimise (*.demux) faili.

Demultipleksimise faili nimevorming on **s_1_X.demux**, kus X on paani number.

Demultipleksimise failid algavad päisega:

- ▶ Versioon (4-baidine täisarv), praegu 1
- ▶ Klasterite arv (4-baidine täisarv)

Ülejäänud fail koosneb paani klasterite proovide numbritest.

Kui demultipleksimise etapp on lõpule jõudnud, loob tarkvara demultipleksimise faili **DemultiplexSummaryF1L1.txt**.

- ▶ **F1** failinimes tähistab läbivooluküveti numbrit.
- ▶ **L1** failinimes tähistab raja numbrit.
- ▶ Demultipleksimise tulemuseks on tabel, kus on üks rida paani kohta ja üks veerg proovi kohta, sealhulgas proov 0.
- ▶ Kõige sagedamini esinevad järjestused indeksi lugemites.

FASTQ-failivorming

FASTQ on tekstipõhine failivorming, mis sisaldab aluste määramisi ja kvaliteedi väärtusi ühe lugemi kohta. Iga kirje sisaldab 4 rida:

- ▶ Identifikaator
- ▶ Järjestus
- ▶ Plussmärk (+)
- ▶ Phredi kvaliteediskoorid ASCII + 33 kodeeritud vormingus

Identifikaator on vormindatud järgmiselt:

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

Näide:

```
@SIM:1:FCX:1:15:6329:1045 1:N:0:2
TCGCACTCAACGCCCTGCATATGACAAGACAGAATC
+
<>;##=><9=AAAAAAAAA9#:<#<;<<<?????#=#
```

Täiendavad väljundfailid

Järgmised väljundfailid pakuvad lisateavet või võtavad kokku käituse tulemused ja analüüsivead. Kuigi neid faile pole analüüsitulemuste hindamiseks vaja, saab neid tõrkeotsingu eesmärkidel kasutada. Kõik failid asuvad joonduste kaustas, kui pole märgitud teisiti.

Faili nimi	Kirjeldus
AdapterTrimming.txt	Loetleb iga paani puhul kärbitud aluste arvu ja aluste protsendi. See fail on olemas ainult siis, kui käitamiseks on määratud adapteri kärpimine.
AnalysisLog.txt	Töötuslogi, mis kirjeldab kõiki toiminguid, mis toimusid praeguse käituse kausta analüüsimisel. See fail ei sisalda veateateid. Asub käituse kausta juurtasemel.
AnalysisError.txt	Töötuslogi, mis loetleb analüüsimisel ilmnunud vead. Kui vigu ei esinenud, on see fail tühi. Asub käituse kausta juurtasemel.

Faili nimi	Kirjeldus
CompletedJobInfo.xml	Kirjutatakse pärast analüüsi lõpetamist, sisaldab teavet käituse kohta, nagu kuupäev, läbivooluküveti ID, tarkvara versioon ja muud parameetrid. Asub käituse kausta juurtasemel.
Checksum.csv	Sisaldab määratud ja määramata FASTQ-failide, BCL-failide ja faili SampleSheetUsed.csv failinimesid ja kordumatuid kontrollsumma väärtusi.
DemultiplexSummaryF1L1.txt	Annab demultipleksimise tulemused tabelis, milles on 1 rida paani ja 1 veerg proovi kohta.
GenerateFASTQRunStatistics.xml	Sisaldab käitusele omast kokkuvõtlikku statistikat. Asub käituse kausta juurtasemel.

Analüüsikaust

Analüüsikaust sisaldab tarkvara Local Run Manager loodud faile.

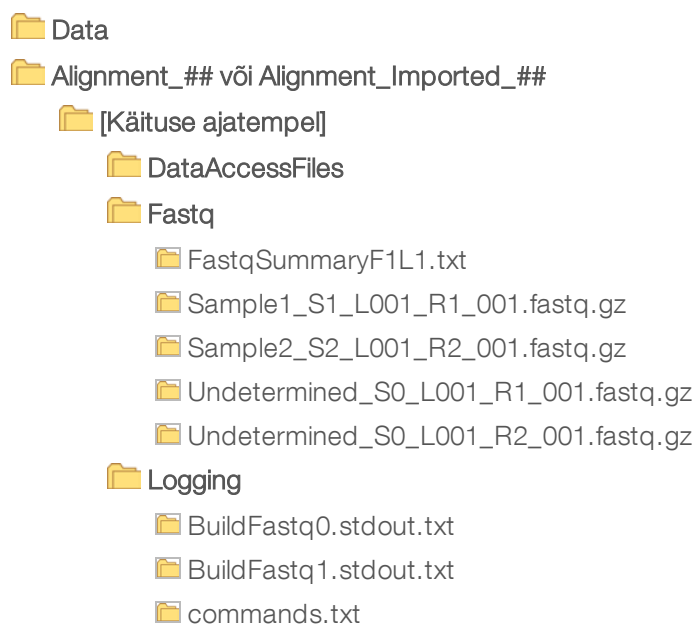
Väljundkausta ja analüüsikausta seos on kokku võetud järgmiselt:

- ▶ Järjestamise ajal täidab reaajas analüüs (RTA) väljundkausta piltide analüüsi, aluste määramise ja kvaliteedi hindamise käigus loodud failidega.
- ▶ RTA kopeerib failid analüüsikausta reaajas. Pärast seda, kui RTA määrab kõigile tsüklite alustele kvaliteediskoori, kirjutab tarkvara faili RTAComplete.xml mõlemasse kausta.
- ▶ Kui fail RTAComplete.xml on olemas, algab analüüs.
- ▶ Analüüsi jätkudes kirjutab Local Run Manager väljundfailid analüüsikausta ja kopeerib seejärel failid tagasi väljundkausta.

Joonduste kaustad

Iga kord, kui seda analüüsi nõutakse, loob Local Run Manager joonduste kausta nimega **Alignment_N**, kus N on järjekorranumber.

Kaustastruktuur



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

Aluste määramine ja indeksite mitmekesisus

Kui proovid sekveneeritakse seadmel NextSeq 550Dx, määrab aluste määramine kindlas tsükli aluse (A, C, G või T) antud paani iga klastri jaoks või kujutise ala läbivooluküvetil. Seade NextSeq 550Dx kasutab kahekanalist sekveneerimist, mis vajab nelja DNA-aluse andmete kodeerimiseks kahte kujutist, ühte punasest ja teist rohelisest kanalist.

Indeksi lugemite aluste määramise protsess erineb aluste määramisest teiste lugemite ajal.

Indeksi lugemid peavad algama kahes esimeses tsükli vähemalt ühe G-st erineva alusega. Kui indeksi lugem algab kahe G aluse määramisega, siis signaali intensiivsust ei genereerita. Demultipleksimise toimivuse tagamiseks peab signaal olema ühes kahest esimesest tsüklist.

Indeksite valimisel käituse loomise ajal ilmub vähese mitmekesisuse hoiatus, kui indeksid ei vasta mitmekesisuse nõuetele. Vähese mitmekesisuse hoiatuse vältimiseks valige indeksitsükli, mis annavad signaali mõlemas kanaliga tsükli jaoks.

- ▶ Punane kanal – A või C
- ▶ Roheline kanal – A või T

See aluste määramise protsess tagab madala pleksiga proovide analüüsimisel täpsuse. Lisateavet oma indeksite järjestuste kohta leiate komplekti *Illumina DNA Prep With Enrichment Dx pakendi infolehest*.

Tarkvaras Local Run Manager käituse loomise ajal valite testitavate proovide arvu. Soovitatud indeksikombinatsioonid, mis vastavad indeksite mitmekesisuse nõuetele, täidab tarkvara automaatselt. Kuigi te ei pea soovitatud UDP indeksikombinatsioone kasutama, on see siiski soovitatav.

Versioonide ajalugu

Dokument	Kuupäev	Muudatuse kirjeldus
Dokument nr 200015671 v01	Mai 2022	Lisati Austraalia sponsori aadress. Täpsustati proovi kirjelduse piirangut.
Dokument nr 200015671 v00	Veebruar 2022	Esialgne väljalase

Tehniline tugi

Tehnilise abi saamiseks pöörduge Illumina tehnilise toe poole.

Veebisait: www.illumina.com
E-post: techsupport@illumina.com

Illumina klienditoe telefoninumbrid

Piirkond	Tasuta	Piirkondlik
Põhja-Ameerika	+1 800 809 4566	
Austraalia	+1 800 775 688	
Austria	+43 800 006 249	+43 1928 6540
Belgia	+32 8007 7160	+32 3400 2973
Hiina	40 0066 5835	
Hispaania	+34 911 899 417	+34 800 300 143
Holland	+31 800 022 2493	+31 207 132 960
Hongkong, Hiina	800960230	
Iirimaa	+353 1800 936 608	+353 016950506
Itaalia	+39 800 985 513	+39 236 003 759
Jaapan	080 0111 5011	
Lõuna-Korea	+82 80 234 5300	
Norra	+47 8001 6836	+47 2193 9693
Prantsusmaa	+33 805 102 193	+33 170 770 446
Rootsi	+46 850 619 671	+46 200 883 979
Saksamaa	+49 800 101 4940	+49 893 803 5677
Singapur	+1 800 579 2745	
Soome	+358 800 918 363	+358 974 790 110
Šveits	+41 565 800 000	+41 800 200 442
Taani	+45 8082 0183	+45 8987 1156
Taiwan, Hiina	008 0665 1752	
Uus-Meremaa	08 0045 1650	
Ühendkuningriik	+44 800 012 6019	+44 207 305 7197
Muud riigid	+44 179 953 4000	

Ohutuse andmelehed (safety data sheets, SDS-id): saadaval Illumina veebisaidil support.illumina.com/sds.html.

Toote dokumendid: allalaaditavad veebisaidilt support.illumina.com.



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+ 1 800 809 ILMN (4566)
+1 85 8202 4566 (väljaspool Põhja-Ameerikat)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE



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

Sponsor Austraalias

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

IN VITRO DIAGNOSTILISEKS KASUTAMISEKS

© 2022 Illumina, Inc. Kõik õigused on kaitstud.

illumina®