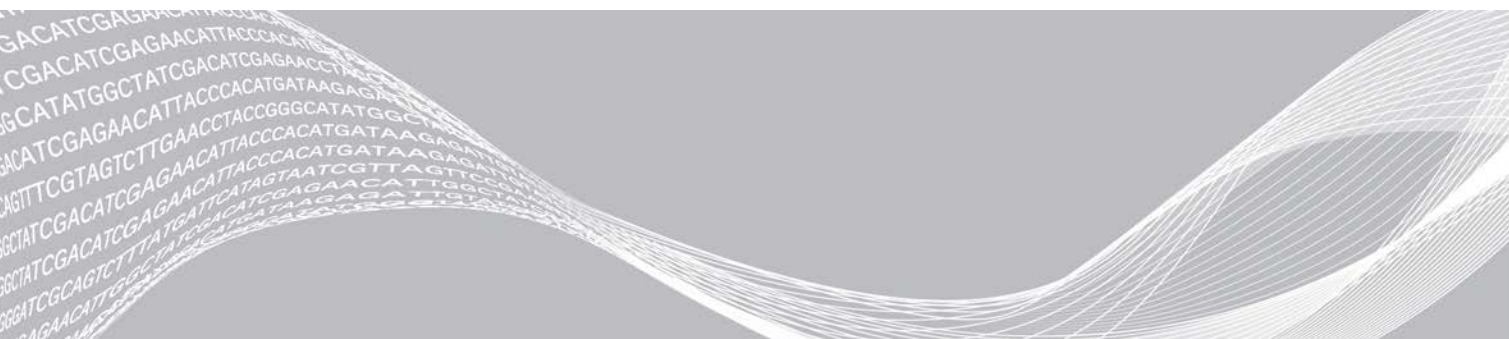


Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Analysis Module

Vejledning til arbejdsgang for NextSeq 550Dx

KUN TIL IN VITRO-DIAGNOSTIK

Oversigt	3
Indtastning af kørselsoplysninger	3
Analysemetoder	5
Visning af kørsel og resultater	5
Resultatrapporter	6
Analyseoutputfiler	6
Revisionshistorik	10
Teknisk hjælp	11



Dette dokument og dets indhold er ophavsretligt beskyttet af Illumina, Inc. og dets datterselskaber ("Illumina") og er udelukkende beregnet til kundens kontraktmæssige brug i forbindelse med anvendelsen af det produkt eller de produkter, som er beskrevet heri, og til intet andet formål. Dette dokument og dets indhold må ikke bruges eller distribueres til noget andet formål og/eller på anden måde kommunikeres, offentliggøres eller reproduceres på nogen som helst måde uden forudgående skriftligt samtykke fra Illumina. Med dette dokument udsteder Illumina ingen licens under sit patent, varemærke, sin copyright eller sædvaneret eller lignende rettigheder for nogen tredjeparter.

Instruktionerne i dette dokument skal følges nøje og fuldstændigt af kvalificerede og behørigt uddannede medarbejdere for at sikre, at det produkt eller de produkter, der er beskrevet heri, anvendes korrekt og sikkert. Alt indhold i dette dokument skal læses grundigt og forstås inden brug af produktet/produkterne.

HVIS ALLE INSTRUKTIONERNE HERI IKKE GENNEMLÆSES FULDT UD OG FØLGES NØJE, KAN DET MEDFØRE SKADE PÅ PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE, SKADE PÅ PERSONER, HERUNDER BRUGERE ELLER ANDRE, OG SKADE PÅ ANDEN EJENDOM OG VIL GØRE ENHVER GARANTI GÆLDENDE FOR PRODUKTET ELLER PRODUKTERNE UGYLDIG.

ILLUMINA PÅTAGER SIG INTET ANSVAR SOM FØLGE AF FORKERT BRUG AF DET PRODUKT ELLER DE PRODUKTER, DER ER BESKREVET HERI (HERUNDER DELE HERAF ELLER SOFTWARE).

© 2022 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

Alle varemærker tilhører Illumina, Inc. eller de respektive ejere. Specifikke varemærkeoplysninger er tilgængelige på www.illumina.com/company/legal.html.

Oversigt

Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx-modulet demultiplekserer indekserede læsninger først. Hvis tilstedeværende, genererer DNA GenerateFASTQ Dx midlertidige outputfiler i FASTQ-format og afslutter derefter arbejdsgangen. Der udføres ingen alignment eller yderligere analyse. FASTQ-filer er nødvendige som input til analyser med tredjepartsanalyseværktøjer.

Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx-modulet kan køres på Local Run Manager v3.1.0 (eller senere) og er kompatibelt med NextSeq 550Dx Operating Software (NOS) v1.4 (eller senere). Analysemoduliet understøtter sekventering til analysering for Illumina DNA Prep With Enrichment Dx-analysen.

Om denne vejledning

Denne vejledning indeholder instruktioner om konfiguration af kørselsparametre for sekventering og analyse i DNA GenerateFASTQ Dx-analysemodul. Brug af softwaren kræver basisviden om det aktuelle Windows-operativsystem og den webbrowsere-baserede brugergrænseflade. Du kan finde yderligere oplysninger om Local Run Manager-dashboardet og systemindstillingerne i NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (*Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrumentet*) (dokumentnr. 1000000009513).

Indtastning af kørselsoplysninger

Konfiguration af parametre

- 1 Log ind på Local Run Manager.
- 2 Vælg **Create Run** (Opret kørsel), og vælg derefter **DNA GenerateFASTQ Dx**.
- 3 Indtast et unikt kørselsnavn med henblik på identificering af kørslen fra sekventeringen til og med analysen (40 tegn eller mindre).
Kørselsnavnet kan indeholde alfanumeriske tegn, mellemrum og specialtegnene `~!@#\$\$%-_{}`.
Du må ikke bruge navnet på en tidligere kørsel.
- 4 **[Valgfrit]** Indtast en kørselsbeskrivelse, der gør det lettere at identificere kørslen (150 tegn eller mindre).
Kørselsbeskrivelsen kan indeholde alfanumeriske tegn, mellemrum og følgende specialtegn: `~!@#\$\$%-_{}`.
- 5 Konfigurer følgende kørselsindstillinger:
 - ▶ Index Plate (Indeksplade) – Vælg det indekspladelayout, der blev anvendt i forbindelse med biblioteksklargøringen. Du kan vælge mellem Index Set A (Indekssæt A), Index Set B (Indekssæt B) og Index Set AB (Indekssæt AB). Du kan finde oplysninger om indekspladelayout i *indlægssedlen til Illumina DNA Prep With Enrichment Dx*.
Indekssæt A og B indeholder 96 prøver og tilhørende unikke dobbeltprimere (UDP'er). Indekssæt AB indeholder 192 prøver og tilhørende UDP'er.
 - ▶ Read Type (Læsningstype) – Vælg enkeltlæsning eller paired-end. Standardlæsningstypen er paired-end.
 - ▶ Read Lengths (Læsningslængder) – Indtast læsningslængden. Standardlæsningslængden er 151.
- 6 Konfigurer indstillingen Adapter Trimming (Adaptertrimning) under Module-Specific Settings (Modulspecifikke indstillinger).
Adaptertrimning er aktiveret som standard.

- 7 Vælg antallet af prøver, der skal sekventeres. Det valgte antal prøver inkluderer automatisk udfyldte UDP-anbefalinger. Hvis du ikke vil anvende UDP-anbefalingerne, skal du vælge **Custom** (Brugerdefineret).
- Hvis det antal prøver, du skal sekventere, ikke fremgår af rullelisten, skal du vælge det antal prøver, der er tættest på. Sørg for, at det valgte antal er mindre end det antal, der skal sekventeres, og for at tilføje yderligere UDP'er efter behov. Eksempel: For at teste 18 prøver skal du vælge 16 prøver.

Angivelse af prøver til kørslen

Du angiver prøver til kørslen ved at anvende en af følgende muligheder.

- ▶ **Indtast prøverne manuelt** – Brug den tomme tabel på skærmen Create Run (Opret kørsel).
- ▶ **Importér prøver** – Gå til en ekstern fil i et kommasepareret værdiformat (*.csv). Du kan downloade en skabelon på skærmen Create Run (Opret kørsel).

Manuel indtastning af prøver

- 1 Indtast et unikt prøve-ID under fanen Sample ID (Prøve-ID). Anvend alfanumeriske tegn og/eller tankestreger (40 tegn eller mindre).
Prøve-ID'et og den tilhørende prøvebeskrivelse og UPD-placering fremhæves med blått for at vise, at prøven er indtastet.
- 2 **[Valgfrit]** Du kan vælge positive og negative kontrolprøver ved at højreklikke på prøvebrøndene.
- 3 **[Valgfrit]** Indtast en prøvebeskrivelse under fanen Sample Description (Prøvebeskrivelse).
Prøvebeskrivelsen kan indeholde alfanumeriske tegn, punktummer og specialtegnene `~!@#\$\$%-_{}`. Der må ikke anvendes mellemrum.
Hvis det prøve-ID, der er knyttet til prøvebeskrivelsen, bliver anvendt igen til en efterfølgende kørsel, bliver den oprindelige prøvebeskrivelse overskrevet.
- 4 Skift de anbefalede UDP-placeringer efter behov. De foreslåede prøvebrøndsplaceringer er fremhævet med gult, lille, orange og lyserødt.
Hvis du anvender de foreslåede prøvebrønde, udfylder softwaren automatisk UDP-indeksadptere, der overholder kravene til indeksdiversitet. Hvis det antal prøver, du har valgt, ikke er det samme som det antal prøver, du skal teste, skal du sørge for at vælge UDP-indeksadptere til de ekstra brønde.
- 5 **[Valgfrit]** Vælg **Export Samples** (Eksportér prøver) for at eksportere prøveoplysningsfilen.
- 6 Vælg **Save Run** (Gem kørsel).

Import af prøveark

Du kan importere prøveoplysninger fra en prøveoplysningsfil, som du forinden har eksporteret fra DNA GenerateFASTQ Dx-modulet ved hjælp af funktionen Export Samples (Eksportér prøver), eller en skabelonfil, som du genererer ved at vælge **Template** (Skabelon) på skærmen Create Run (Opret kørsel). Se, hvordan du opretter og eksporterer prøveoplysninger, under *Manuel indtastning af prøver på side 4*.

Skabelonfilen indeholder ikke de automatisk udfyldte UDP-anbefalinger.

Sådan redigerer du skabelonfilen:

- 1 Vælg **Template** (Skabelon) på skærmen Create Run (Opret kørsel) for at oprette et nyt pladelayout. Skabelonfilen indeholder de korrekte kolonneoverskrifter til import. Rediger filen, som følger.
 - a Åbn prøvearket i et tekstredigeringsprogram.
 - b Indtast de nødvendige prøveoplysninger.

- c Gem filen i en kommasepareret fil (*.csv). Sørg for, at prøve-ID'erne er unikke.

Sådan importerer du prøveoplysninger:

- 2 Vælg **Import Samples** (Importér prøver), og vælg derefter CSV-filen.
- 3 **[Valgfrit]** Vælg **Export** (Eksportér) for at eksportere prøveoplysningerne til en ekstern fil.
- 4 Vælg **Save Run** (Gem kørsel).

Redigering af en kørsel

Vedrørende instruktioner om redigering af informationen i din kørsel før sekventering henvises til *NextSeq 550Dx Instrument Reference Guide (Oversigtsvejledning til NextSeq 550Dx-instrument)* (dokumentnr. 1000000009513).

Analysemetoder

DNA GenerateFASTQ Dx-analysemodulet udfører følgende analysetrin og skriver derefter analyseoutputfiler til Alignment-mappen.

- ▶ Demultiplekserer indeksslæsninger
- ▶ Genererer FASTQ-filer

Demultipleksering

Demultiplekseringen sammenligner hver indeksslæsningssekvens med de indeksskvenser, der er angivet for kørslen. Ingen kvalitetsværdier tages i betragtning på dette trin.

Indeksslæsninger identificeres ved hjælp af følgende trin:

- ▶ Prøver nummereres fra og med 1 baseret på den rækkefølge, de er anført i for kørslen.
- ▶ Prøve nummer 0 er forbeholdt clustre, som ikke er tildelt en prøve.
- ▶ Clustre tildeles en prøve, når indeksskvensen matcher præcist, eller når der er højst én uoverensstemmelse pr. indeksslæsning.

Generering af FASTQ-fil

Efter demultipleksering genererer softwaren intermedieære analysefiler i FASTQ-formatet, der er et tekstformat, som bruges til at repræsentere sekvenser. FASTQ-filerne indeholder læsninger for hver prøve med tilhørende kvalitetsscorer. Eventuelle kontroller, der bliver anvendt i forbindelse med kørslen, samt clustre, der ikke passerer filteret, medtages ikke.

Hver FASTQ-fil indeholder kun læsninger for én prøve, og prøvens navn indgår i navnet på FASTQ-filen. FASTQ-filer er det primære alignmentinput.

Visning af kørsel og resultater

- 1 Vælg kørselsnavnet på Local Run Manager-dashboardet.
- 2 Gennemgå sekventeringskørselsmålingerne under fanen Run Overview (Kørselsoversigt).
- 3 Hvis du vil ændre placeringen af analysedatafilen med henblik på senere genindsættelser i køen af den valgte kørsel, skal du vælge ikonet **Edit** (Rediger) og redigere stien til outputkørselsmappen. Du kan ikke redigere navnet på outputkørselsmappen.
- 4 **[Valgfrit]** Vælg **Copy to Clipboard** (Kopier til udklipsholder) for at kopiere stien til outputkørselsmappen.

- 5 Vælg fanen Sequencing Information (Sekventeringsoplysninger) for at gennemse kørselsparametrene og materialeoplysningerne.
- 6 Vælg fanen Samples and Results (Prøver og resultater) for at se analyserapporten.
 - ▶ Hvis analysen er blevet genindsat i køen, skal du vælge den relevante analyse på rullelisten Select Analysis (Vælg analyse).
 - ▶ Vælg et prøve-ID fra navigationslinjen til venstre for at se rapporten for en anden prøve.
- 7 **[Valgfrit]** Vælg **Copy to Clipboard** (Kopier til udklipsholder) for at kopiere stien til mappen Analysis (Analyse).

Resultatrapporter

Resultater opsummeres under fanerne Samples (Prøver) og Results (Resultater).

Prøver

Tabel 1 Prøvetabel

Kolonneoverskrift	Beskrivelse
Sample ID (Prøve-ID)	Det prøve-ID, der blev givet, da kørslen blev oprettet.
Plate (Plade)	Den plade, der blev angivet med indekspladen, da kørslen blev oprettet. Kolonnen vises kun, hvis der vælges indeksplade AB.
Index Well (Indeksbrønd)	Den indeksbrønd, der blev angivet med prøvebrøndsplaceringen, da kørslen blev oprettet.
Description (Beskrivelse)	Den prøvebeskrivelse, der blev angivet, da kørslen blev oprettet.
UDP	Den anvendte UDP med prøven.
Control (Kontrol)	Den positive eller negative kontrol, der er anvendt med prøven.

Indeksering

Tabel 2 Indekseringstabel

Kolonneoverskrift	Beskrivelse
Index Number (Indeksnummer)	Et ID, der bliver tildelt på baggrund af prøvernes rækkefølge i prøvetabellen.
Sample ID (Prøve-ID)	Det prøve-ID, der blev givet, da kørslen blev oprettet.
UDP	Den anvendte UDP med prøven.
% Reads Identified (PF) (% identificerede læsninger (PF))	Procentdelen af læsninger, der har passeret filtrene.

Analyseoutputfiler

Der bliver genereret følgende analyseoutputfiler til DNA GenerateFASTQ Dx-analysemodulet.

Filnavn	Beskrivelse
Demultiplexing (*.demux)	Midlertidige filer, der indeholder demultiplexeringsresultater.
FASTQ (*.fastq.gz)	Midlertidige filer med kvalitetsscorede basebestemmelser. FASTQ-filer er det primære input til alignmenttrinnet.

Demultiplexering af filformat

Demultiplexeringsprocessen læser den indekssekvens, der er forbundet til hver cluster, for at bestemme, hvilken prøve clusteren oprindeligt stammer fra. Mapping mellem cluster og prøvenummer skrives til en demultiplexeringsfil (*.demux) for hver flise i flowcellen.

Navngivningsformatet for demultiplexeringsfilen er **s_1_X.demux**, hvor X er flisenummeret.

Demultiplexeringsfiler starter med en toptekst:

- ▶ Version (4 byte-heltal), p.t. 1
- ▶ clusterantal (4 byte-heltal)

Resten af filen består af prøvenumre for hver cluster fra flisen.

Når demultiplexeringstrinnet er færdigt, genererer softwaren en demultiplexeringsfil med navnet **DemultiplexSummaryF1L1.txt**.

- ▶ I filnavnet repræsenterer **F1** flowcellenummeret.
- ▶ I filnavnet repræsenterer **L1** banenummeret.
- ▶ Demultiplexering giver en tabel med én række pr. flise og én kolonne pr. prøve, inkl. prøve 0.
- ▶ De mest almindeligt forekommende sekvenser i indeksslæsninger.

FASTQ-filformat

FASTQ er et tekstbaseret filformat, der indeholder basebestemmelser og kvalitetsværdier for hver læsning. Hver post indeholder 4 linjer:

- ▶ Identifikatoren
- ▶ Sekvensen
- ▶ Et plustegn (+)
- ▶ Phred-kvalitetsscorerne i et ASCII + 33-kodet format

Identifikatoren formateres som:

@Instrument:KørselsID:FlowCelleID:Bane:Flise:X:Y LæsningsNum:FilterFlag:0:PrøveNummer

Eksempel:

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

Supplerende outputfiler

Følgende outputfiler giver supplerende oplysninger eller opsummerer kørselsresultater og analysefejl. Selvom disse filer ikke er nødvendige for vurdering af analyseresultater, kan de bruges til fejlfinding. Alle filer er placeret i Alignment-mappen, medmindre andet er angivet.

Filnavn	Beskrivelse
AdapterTrimming.txt	Angiver antallet af trimmede baser og procentdelen af baser for hver flise. Filen forefindes kun, hvis der er valgt adaptertrimning for kørslen.
AnalysisLog.txt	Behandlingslog, der beskriver hvert trin, der forekom under analysen af den aktuelle kørselsmappe. Denne fil indeholder ikke fejlmeddelelser. Placeret på kørselsmappens rodniveau.
AnalysisError.txt	Behandlingslog, der anfører eventuelle fejl, der forekom under analysen. Denne fil vil være tom, hvis der ikke er sket fejl. Placeret på kørselsmappens rodniveau.
CompletedJobInfo.xml	Skrives efter fuldførelse af analysen og indeholder oplysninger om kørslen, såsom dato, flowcelle-ID, softwareversion og andre parametre. Placeret på kørselsmappens rodniveau.
Checksum.csv	Indeholder filnavnene og de unikke kontrolsumværdier for afklarede og uafklarede FASTQ-filer, BCL-filer og filen SampleSheetUsed.csv .
DemultiplexSummaryF1L1.txt	Rapporterer demultiplexeringsresultater i en tabel med 1 række pr. flise og 1 kolonne pr. prøve.
GenerateFASTQRunStatistics.xml	Indeholder oversigtsstatistik, der er specifik for kørslen. Placeret på kørselsmappens rodniveau.

Analysemappe

Analysemappen indeholder de filer, der er genereret af Local Run Manager-softwaren.

Forholdet mellem outputmappen og analysemappen opsummeres, som følger:

- ▶ Under sekventering udfylder Real-Time Analysis (RTA) outputmappen med filer, der er genereret under billedanalyse, basebestemmelse og kvalitetsscoreing.
- ▶ RTA kopierer filer til analysemappen i realtid. Når RTA har tildelt hver base en kvalitetsscore for hver cyklus, skriver softwaren filen RTAComplete.xml til begge mapper.
- ▶ Når filen RTAComplete.xml er til stede, begynder analysen.
- ▶ I det analysen fortsætter, skriver Local Run Manager outputfiler til analysemappen og kopierer derefter filerne tilbage til outputmappen.

Alignmentmapper

Hver gang denne analyse sættes i kø igen, opretter Local Run Manager en alignmentmappe med navnet **Alignment_N**, hvor N er et fortløbende tal.

Mappestruktur

- 📁 Data
- 📁 Alignment_## eller Alignment_Imported_##
 - 📁 [Tidsstempel for kørsel]
 - 📁 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

Basebestemmelse og indeksdiversitet

Når prøver sekventeres på NextSeq 550Dx-instrumentet, bestemmer basebestemmelse en base (A, C, G eller T) for hver cluster af en given flise – billeddannelsesområde på flowcellen – i en given cyklus. NextSeq 550Dx-instrumentet bruger tokenalssekventering, der kræver to billeder til at indkode dataene til fire DNA-baser, ét fra den røde kanal og ét fra den grønne kanal.

Fremgangsmåden ved basebestemmende indekslæsninger adskiller sig fra basebestemmelsen i forbindelse med andre læsninger.

Indekslæsninger skal begynde med mindst én anden base end G i en af de første to cyklusser. Hvis en indekslæsning begynder med to basebestemmelser af G, genereres der ingen signalstyrke. Der skal være signal i en af de første to cyklusser for at sikre demultiplekseringens ydeevne.

Når der vælges indekser under oprettelse af kørslen, vises en advarsel om lav diversitet, hvis indekserne ikke opfylder kravene om diversitet. For at forhindre advarslen om lav diversitet skal der vælges indekssekvenser, der giver signal i begge kanaler for hver cyklus.

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

Denne fremgangsmåde i forbindelse med basebestemmelse sikrer nøjagtighed i forbindelse med analysering af low-plex-prøver. Du kan finde yderligere oplysninger om indekssekvenser i *indlægsedlen til Illumina DNA Prep With Enrichment Dx*.

Under oprettelse af kørsel i Local Run Manager skal du vælge det antal prøver, der skal testes. Foreslåede indeksskcombinationer, der opfylder kravene til indeksdiversitet, bliver automatisk udfyldt af softwaren. Det anbefales, at du bruger de foreslåede UDP-indeksskcombinationer, selvom det ikke er påkrævet.

Revisionshistorik

Dokument	Dato	Beskrivelse af ændring
Dokumentnr. 200015671 v01	Maj 2022	Tilføjelse af australsk sponsors adresse. Præcisering af begrænsning for prøvebeskrivelse.
Dokumentnr. 200015671 v00	Feb. 2022	Oprindelig udgivelse

Teknisk hjælp

Kontakt Illuminas tekniske support for at få teknisk hjælp.

Websted: www.illumina.com
E-mail: techsupport@illumina.com

Telefonnumre til Illuminas kundesupport

Område	Gratis	Regional
Nordamerika	+1.800.809.4566	
Australien	+1.800.775.688	
Belgien	+32 80077160	+32 34002973
Danmark	+45 80820183	+45 89871156
Finland	+358 800918363	+358 974790110
Frankrig	+33 805102193	+33 170770446
Holland	+31 8000222493	+31 207132960
Hongkong, Kina	800960230	
Irland	+353 1800936608	+353 016950506
Italien	+39 800985513	+39 236003759
Japan	0800.111.5011	
Kina	400.066.5835	
New Zealand	0800.451.650	
Norge	+47 800 16836	+47 21939693
Schweiz	+41 565800000	+41 800200442
Singapore	+1.800.579.2745	
Spanien	+34 911899417	+34 800300143
Storbritannien	+44 8000126019	+44 2073057197
Sverige	+46 850619671	+46 200883979
Sydkorea	+82 80 234 5300	
Taiwan, Kina	00806651752	
Tyskland	+49 8001014940	+49 8938035677
Østrig	+43 800006249	+43 19286540
Andre lande	+44.1799.534000	

Sikkerhedsdatablade (SDS'er) – kan findes på Illuminas websted på support.illumina.com/sds.html.

Produktdokumentation – Kan downloades på support.illumina.com.



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U.S.A.
+1.800.809.ILMN (4566)
+1.858.202.4566 (uden for Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE



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

Australsk sponsor

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

KUN TIL IN VITRO-DIAGNOSTIK

© 2022 Illumina, Inc. Alle rettigheder forbeholdes.

illumina[®]