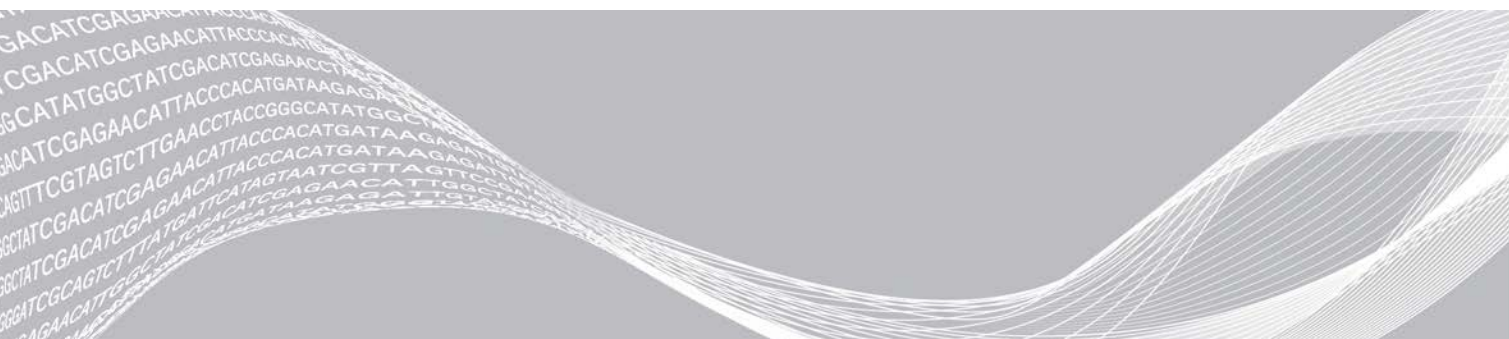


Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx Analysis Module

Arbetsflödeshandbok för NextSeq 550Dx

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK

Översikt	3
Ange körningsinformation	3
Analysmetoder	5
Visa körning och resultat	5
Resultatrapport	6
Analysutdatafiler	6
Revisionshistorik	10
Teknisk hjälp	11



Dokumentet och dess innehåll tillhör Illumina, Inc. och dess dotterbolag ("Illumina") och är endast avsett för användning enligt avtal i samband med kundens bruk av produkterna som beskrivs häri. Allt annat bruk är förbjudet. Dokumentet och dess innehåll får ej användas eller distribueras i något annat syfte och/eller återges, delges eller reproduceras på något vis utan föregående skriftligt tillstånd från Illumina. I och med detta dokument överlåter Illumina inte någon licens som hör till dess patent, varumärke eller upphovsrätt, eller i enlighet med rättspraxis eller liknande tredjepartsrättigheter.

Instruktionerna i detta dokument ska följas till punkt och pricka av kvalificerad och lämpligt utbildad personal för att säkerställa rätt och säker produktanvändning i enlighet med beskrivning häri. Hela innehållet i dokumentet ska läsas och förstås i sin helhet innan produkten (produkterna) används.

UNDERLÅTENHET ATT LÄSA OCH FÖLJA ALLA INSTRUKTIONER HÄRI I SIN HELHET KAN MEDFÖRA SKADA PÅ PRODUKTEN/PRODUKTERNA, PERSONSKADA, INKLUSIVE SKADA PÅ ANVÄNDAREN/ANVÄNDARNA ELLER ANDRA PERSONER SAMT SKADA PÅ ANNAN EGENDOM, OCH LEDER TILL ATT EVENTUELL GARANTI FÖR PRODUKTEN/PRODUKTERNA BLIR OGILTIG.

ILLUMINA KAN INTE ÅLÄGGAS NÅGOT ANSVAR SOM UPPKOMMER GENOM FELAKTIG ANVÄNDNING AV PRODUKTERNA SOM BESKRIVS HÄRI (INKLUSIVE DELAR DÄRI ELLER PROGRAM).

© 2022 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

Alla varumärken tillhör Illumina, Inc. eller respektive ägare. Specifik varumärkesinformation finns på www.illumina.com/company/legal.html.

Översikt

Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx-modulen demultiplexar indexläsningar först. Om tillämpligt, genererar DNA GenerateFASTQ Dx intermediära utdatafiler i FASTQ-filformat och avslutar sedan arbetsflödet. Ingen linjering eller ytterligare analys utförs. FASTQ-filer måste användas som indata för analys med analysverktyg från tredje part.

Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx-modulen kan köras på Local Run Manager v3.1.0 (eller senare) och är kompatibel med NextSeq 550Dx Operating Software (NOS) v1.4 (eller senare). Analysmodulen stöder Illumina DNA Prep With Enrichment Dx-analysen från sekvensering till analys.

Om den här handboken

Den här handboken innehåller anvisningar för hur du ställer in körningsparametrar för sekvensering och analys för analysmodulen DNA GenerateFASTQ Dx. Du behöver grundläggande kunskap om det aktuella Windows-operativsystemet och det webbbläsarbaserade användargränssnittet för att använda programvaran. Information om instrumentpanelen och systeminställningarna i Local Run Manager finns i *Referenshandbok för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.

Ange körningsinformation

Ställa in parametrar

- 1 Logga in i Local Run Manager.
- 2 Välj **Create Run** (Skapa körning) och välj sedan **DNA GenerateFASTQ Dx**.
- 3 Ange ett unikt namn på körningen som identifierar körningen från sekvensering till analys (40 tecken eller mindre).
Körningsnamnet får innehålla alfanumeriska tecken, blanksteg och specialtecknen `~!@#\$\$%-_{}`.
Du kan inte använda ett namn från en tidigare körning.
- 4 **[Valfritt]** Ange en beskrivning av körningen som gör det lättare att identifiera den (150 tecken eller mindre).
Körningsbeskrivningen får innehålla alfanumeriska tecken, blanksteg och följande specialtecken: `~!@#\$\$%-_{}`.
- 5 Konfigurera följande körningsinställningar:
 - ▶ Index Plate (Indexplatta) – Välj layouten för indexplattan som används under biblioteksberedningen. Du kan välja Index Set A (Indexuppsättning A), Index Set B (Indexuppsättning B) eller Index Set AB (Indexuppsättning AB). Mer information om indexplattornas layout finns i *Bipacksedel för Illumina DNA Prep With Enrichment Dx*.
Indexuppsättningarna A och B innehåller 96 prover och motsvarande unika dubbla primrar (UDP:er). Indexuppsättning AB innehåller 192 prover och motsvarande UDP:er.
 - ▶ Read Type (Avläsningstyp) – Välj enkel avläsning eller paired-end. Standardavläsningstypen är paired-end.
 - ▶ Read Lengths (Avläsningslängder) – Ange avläsningslängden. Standardavläsningslängden är 151.
- 6 Ställ in alternativet Adapter Trimming (Trimning av adapter) under Module-Specific Settings (Modulspecifika inställningar).
Adapter Trimming (Trimning av adapter) aktiverat som standard.
- 7 Välj antalet prover som ska sekvenseras. Det valda antalet prover inkluderar automatiskt ifyllda UDP-rekommendationer. Välj **Custom** (Anpassade) om du inte vill använda UDP-rekommendationerna.

Om antalet prover som du sekvenserar inte finns med i listrutan ska du välja det närmaste antalet prover. Kontrollera att det valda numret är mindre än numret som sekvenseras och lägg till ytterligare UDP:er vid behov. Om du exempelvis vill testa 18 prover väljer du alternativet för 16 prover.

Ange prover för körningen

Ange prover för körningen med ett av följande alternativ:

- ▶ **Enter samples manually** (Ange prover manuellt) – använd den tomma tabellen på skärmen Create Run (Skapa körning).
- ▶ **Import samples** (Importerera prover) – navigera till en extern fil i ett format med kommateckenavgränsade värden (*.csv). En mall kan hämtas på skärmen Create Run (Skapa körning).

Ange prover manuellt

- 1 Ange ett unikt prov-ID på fliken Sample ID (Prov-ID). Använd alfanumeriska tecken och/eller bindestreck (40 tecken eller mindre).
Prov-ID:t och motsvarande provbeskrivning och UDP-position är markerade i blått för att indikera att provet har angetts.
- 2 **[Valfritt]** Högerklicka på provbrunnar för att välja positiva eller negativa kontrollprover.
- 3 **[Valfritt]** Ange en beskrivning av provet på fliken Sample Description (Beskrivning av provet).
Provbeskrivningen får innehålla alfanumeriska tecken, punkter och specialtecknen `~!@#\$\$%-_{}`.
Blanksteg är inte tillåtna.
Om prov-ID:t som är associerat med provbeskrivningen används igen i en senare körning skrivs den initiala provbeskrivningen över.
- 4 Ändra de rekommenderade UDP-positionerna efter behov. De föreslagna provbrunnspositionerna är markerade i gult, lila, orange och rosa.
Om du använder de föreslagna provbrunnarna fyller programvaran automatiskt i UDP-indexadapttrar som uppfyller mångfaldskraven för index. Om antalet prover som du har valt inte är det exakta antalet prover som du ska testa måste du komma ihåg att välja UDP-indexadapttrar för de extra brunnarna.
- 5 **[Valfritt]** Välj **Export Samples** (Exportera prover) för att exportera filen med provinformation.
- 6 Välj **Save Run** (Spara körning).

Importerera provark

Du kan importera provinformation från en provinformationsfil som tidigare exporterats från DNA GenerateFASTQ Dx-modulen med hjälp av funktionen Export Samples (Exportera prover) eller en mallfil, som kan genereras genom att välja **Template** (Mall) på skärmen Create Run (Skapa körning). Anvisningar för hur du skapar och exporterar provinformation finns i avsnittet *Ange prover manuellt på sidan 4*.

Mallfilen innehåller inte de automatiskt ifyllda UDP-rekommendationerna.

Så här redigerar du mallfilen:

- 1 Klicka på **Template** (Mall) på skärmen Create Run (Skapa körning) för att skapa en ny plattlayout. Mallfilen innehåller rätt kolumnrubriker för import. Redigera filen enligt följande.
 - a Öppna exempelarket i en textredigerare.
 - b Ange den provinformation som krävs.
 - c Spara filen i ett format med kommaavgränsade värden (*.csv). Se till att alla prov-ID:n är unika.

Så här importerar du provinformation:

- 2 Välj **Import Samples** (Importera prover) och välj sedan CSV-filen.
- 3 [Valfritt] Välj **Export** (Exportera) för att exportera provinformation till en extern fil.
- 4 Välj **Save Run** (Spara körning).

Redigera en körning

Anvisningar om hur informationen i körningen kan redigeras före sekvensering finns i *Referenshandbok för NextSeq 550Dx-instrument (dokumentnr 1000000009513)*.

Analysmetoder

Analysmodulen DNA GenerateFASTQ Dx utför följande analyssteg och skriver sedan analysutdatafiler till mappen Alignment (Linjering).

- ▶ Demultiplexerar indexavläsningar
- ▶ Genererar FASTQ-filer

Demultiplexering

Vid demultiplexering jämförs varje indexavläsningssekvens med de indexsekvenser som har angetts för körningen. Inga kvalitetsvärden beaktas i det här steget.

Indexavläsningar identifieras med följande steg:

- ▶ Proverna numreras i den ordning som de anges för körningen, med början på 1.
- ▶ Provnummer 0 är reserverat för kluster som inte tilldelats till något prov.
- ▶ Klustren tilldelas till ett prov när indexsekvensen matchar exakt eller när det finns högst en enskild felparning per indexavläsning.

Generering av FASTQ-filer

Efter demultiplexeringen genererar programvaran intermediära analysfiler i FASTQ-format, vilket är ett textformat som används för att representera sekvenser. FASTQ-filer innehåller avläsningar för varje prov och tillhörande kvalitetspoäng. Alla kontroller som används för körningen och kluster som inte har passerat filtren utesluts.

Varje FASTQ-fil innehåller endast avläsningar för ett prov och namnet på det provet ingår i FASTQ-filens namn. FASTQ-filer är linjeringens primära indata.

Visa körning och resultat

- 1 Välj körningens namn på instrumentpanelen i Local Run Manager.
- 2 Gå till fliken Run Overview (Körningsöversikt) och granska måtten för sekvenseringskörningen.
- 3 Om du vill ändra analysdatafilens plats för framtida repetitioner av den valda körningen väljer du **Edit** (Redigera) och redigerar sökvägen till körningens utdatamapp. Du kan inte redigera namnet på utdatamappen för körningar.
- 4 [Valfritt] Välj **Copy to Clipboard** (Kopiera till urklipp) för att kopiera sökvägen för utdatamappen för körningar.

- 5 Välj fliken Sequencing Information (Sekvenseringsinformation) för att granska körningsparametrar och information om förbrukningsmaterial.
- 6 Välj fliken Samples & Results (Prover och resultat) för att visa analysrapporten.
 - ▶ Om analysen har upprepats ska du välja lämplig analys i listrutan Select Analysis (Välj analys).
 - ▶ Välj ett prov-ID i det vänstra navigeringsfältet för att visa rapporten för ett annat prov.
- 7 **[Valfritt]** Välj **Copy to Clipboard** (Kopiera till urklipp) för att kopiera analysmappens sökväg.

Resultatrapport

Resultaten sammanfattas på fliken Samples and Results (Prover och resultat).

Prover

Tabell 1 Provtabell

Kolumnrubrik	Beskrivning
Sample ID (Prov-ID)	Det prov-ID som angavs när körningen skapades.
Plate (Platta)	Plattan som angavs med indexplattan när körningen skapades. Kolumnen visas endast om indexplattan AB väljs.
Index Well (Indexbrunn)	Indexbrunnen som angavs med provbrunnens plats när körningen skapades.
Description (Beskrivning)	Den provbeskrivning som angavs när körningen skapades.
UDP	Det UDP som användes med provet.
Control (Kontroll)	Den positiva eller negativa kontrollen som användes med provet.

Indexering

Tabell 2 Indexeringstabell

Kolumnrubrik	Beskrivning
Index Number (Indexnummer)	Ett tilldelat ID baserat på den ordning som proverna listas i provtabellen.
Sample ID (Prov-ID)	Det prov-ID som angavs när körningen skapades.
UDP	Det UDP som användes med provet.
% Reads Identified (PF) (Identifierade avläsningar i % (passerar filtret))	Procentandelen avläsningar som passerade filtren.

Analysutdatafiler

Följande analysutdatafiler genereras för analysmodulen DNA GenerateFASTQ Dx.

Filnamn	Beskrivning
Demultiplexering (*.demux)	Intermediära filer som innehåller demultiplexeringsresultat.
FASTQ (*.fastq.gz)	Intermediära filer som innehåller basbestämningar med kvalitetspoäng. FASTQ-filer är linjeringsstegets primära indata.

Filformat för demultiplexering

Under demultiplexeringsprocessen läses den indexsekvens som är kopplad till varje kluster för att avgöra från vilket prov klustret kommer ifrån. Mappningen mellan kluster och provnummer skrivs till en demultiplexeringsfil (*.demux) för varje ruta på flödescellen.

Demultiplexeringsfilens namngivningsformat är s_1_X.demux, där X är rutans nummer.

Demultiplexeringsfiler börjar med en rubrik:

- ▶ Version (4 byte heltal), för närvarande 1
- ▶ Klusterantal (4 byte heltal)

Resten av filen består av provnumren för varje kluster från rutan.

När demultiplexeringssteget har avslutats genererar programvaran en demultiplexeringsfil med namnet DemultiplexSummaryF1L1.txt.

- ▶ I filnamnet står F1 för flödescellens nummer.
- ▶ I filnamnet står L1 för spårets nummer.
- ▶ Demultiplexeringen resulterar i en tabell med en rad per ruta och en kolumn per prov, med prov 0 medräknat.
- ▶ De vanligast förekommande sekvenserna i indexavläsningar.

FASTQ-filformat

FASTQ är ett textbaserat filformat som innehåller basbestämning och kvalitetsvärden per avläsning. Varje post innehåller fyra rader:

- ▶ Identifieraren
- ▶ Sekvensen
- ▶ Ett plustecken (+)
- ▶ Phred-kvalitetspoäng i ett ASCII + 33-kodat format

Identifieraren är formaterad som:

@Instrument:Körnings-ID:Flödescell-ID:Spår:Ruta:X:Y Avläsningsnummer:Filterflagga:0:Provnummer.

Exempel:

```
@SIM:1:FCX:1:15:6329:1045 1:N:0:2
TCGCACTCAACGCCCTGCATATGACAAGACAGAATC
+
<>;##=><9=AAAAAAAAAA9#:<#<;<<<????#=#
```

Kompletterande utdatafiler

Följande utdatafiler ger kompletterande information eller sammanfattar körningsresultat och analysfel. Även om filerna inte krävs för bedömning av analysresultaten kan de användas i felsökningssyfte. Alla filer finns i mappen Alignment (Linjering) om inget annat anges.

Filnamn	Beskrivning
AdapterTrimming.txt	Listar antalet trimmade baser och procentandelen av baser för varje platta. Den här filen finns endast om adaptertrimning angavs för körningen.
AnalysisLog.txt	En bearbetningslogg som beskriver varje steg som vidtagits under analysen av den aktuella körningsmappen. Den här filen innehåller inga felmeddelanden. Finns på rotnivån i körningsmappen.
AnalysisError.txt	En bearbetningslogg som visar en lista över alla fel som inträffat under analysen. Filen är tom om inga fel har inträffat. Finns på rotnivån i körningsmappen.
CompletedJobInfo.xml	Skrivs efter att analysen har slutförts och innehåller information om körningen, som datum, flödescells-ID, programvaruversion och andra parametrar. Finns på rotnivån i körningsmappen.
Checksum.csv	Innehåller filnamnen och unika kontrollsummor för fastställda och obestämda FASTQ-filer, BCL-filer och filen SampleSheetUsed.csv .
DemultiplexSummaryF1L1.txt	Rapporterar demultiplexeringens resultat i en tabell med en rad per ruta och en kolumn per prov.
GenerateFASTQRunStatistics.xml	Innehåller kortfattad statistik som är specifik för körningen. Finns på rotnivån i körningsmappen.

Analysis Folder (Analysmapp)

Analysmappen innehåller filer som genererats av programvaran Local Run Manager.

Förhållandet mellan utdatamappen och analysmappen kan sammanfattas som följer:

- ▶ Under sekvenseringen fyller Real-Time Analysis (RTA) utdatamappen med filer som genererats vid bildanalys, basbestämning och kvalitetsbedömning.
- ▶ RTA kopierar filer till analysmappen i realtid. När RTA gett en kvalitetspoäng till varje bas i varje cykel skriver programvaran filen RTAComplete.xml till båda mapparna.
- ▶ Analysen börjar så fort filen RTAComplete.xml finns i mapparna.
- ▶ Under analysens gång skriver Local Run Manager utdatafiler till analysmappen och kopierar sedan filerna tillbaka till utdatamappen.

Linjeringsmappar

Varje gång som analysen ställs tillbaka i kö skapar Local Run Manager en linjeringsmapp med namnet **Alignment_N** (Linjering_N), där N är ett löpnummer.

Mappstruktur

- 📁 Data
- 📁 Alignment_### (Linjering_###) eller Alignment_Imported_### (Importerad_linjering_###)
 - 📁 [Körningens tidsstämpel]
 - 📁 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 (Loggning)**
 - 📁 BuildFastq0.stdout.txt
 - 📁 BuildFastq1.stdout.txt
 - 📁 commands.txt
- 📁 **Plots (Diagram)**
 - 📁 AdapterCounts.txt
 - 📁 AdapterTrimming.txt
 - 📁 AnalysisError.txt
 - 📁 AnalysisLog.txt
 - 📁 Checkpoint.txt
 - 📁 Checksum.csv
 - 📁 CompletedJobInfo.xml
 - 📁 DemultiplexSummaryF1L1.txt
 - 📁 GenerateFASTQRunStatistics.xml
 - 📁 SampleSheetUsed.csv

Basbestämning och indexmångfald

När prover sekvenseras i NextSeq 550Dx-instrumentet bestäms via basbestämning en bas (A, C, G eller T) för varje kluster i en given ruta, eller ett bildområde på flödescellen, i en viss cykel. NextSeq 550Dx-instrumentet använder tvåkanalssekvensering, som endast kräver två bilder för att koda data för fyra DNA-baser, en från den röda kanalen och en från den gröna kanalen.

Processen för basbestämning av indexavläsningar skiljer sig från basbestämning av andra avläsningar.

Indexavläsningar måste börja med minst en annan bas än G i någon av de första två cyklerna. Om en indexavläsning börjar med två basbestämningar av G genereras inte någon signalintensitet. Signalen måste finnas i någon av de första två cyklerna för att demultiplexeringen ska fungera.

Vid val av index när körningen skapas visas en varning om låg mångfald ifall index inte uppfyller kraven för mångfald. Undvik varningen om låg mångfald genom att välja indexsekvenser som ger signal i båda kanalerna för varje cykel.

- ▶ Röd kanal – A eller C
- ▶ Grön kanal – A eller T

Den här processen för basbestämning säkerställer att resultatet blir rättvisande vid analys av lågplex-prover. Mer information om indexsekvenserna finns i *Bipacksedel för Illumina DNA Prep With Enrichment Dx*.

När du skapar körningen i Local Run Manager väljer du antalet prover som ska testas. Föreslagna indexkombinationer som uppfyller kraven för indexmångfald fylls automatiskt i av programmet.

Det är inte nödvändigt att använda de föreslagna indexkombinationerna, men vi rekommenderar det.

Revisionshistorik

Dokument	Datum	Ändringsbeskrivning
Dokumentnr 200015671 v01	Maj 2022	En adress till den australiska sponsorn har lagts till. Provbeskrivningens begränsningar har förtydligats.
Dokumentnr 200015671 v00	Februari 2022	Första versionen.

Teknisk hjälp

Kontakta Illuminas tekniska support för all form av teknisk hjälp.

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

Telefonnummer till Illuminas kundtjänst

Region	Avgiftsfritt	Lokalt
Nordamerika	+1 800-8094566	
Australien	+1 800-775688	
Belgien	+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
Italien	+39 800985513	+39 236003759
Japan	0800-1115011	
Kina	400-0665835	
Nederländerna	+31 8000222493	+31 207132960
Norge	+47 800 16836	+47 21939693
Nya Zeeland	0800-451650	
Schweiz	+41 565800000	+41 800200442
Singapore	+1 800-5792745	
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
Österrike	+43 800006249	+43 19286540
Övriga länder	+44 1799-534000	

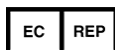
Säkerhetsdatablad (SDS) – Finns på Illuminas webbplats på support.illumina.com/sds.html.

Produktdokumentation – Kan hämtas på support.illumina.com.



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 USA
+1 800-8094566
+1 858-2024566 (utanför Nordamerika)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE



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

Australisk sponsor

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

FÖR IN VITRO-DIAGNOSTISKT BRUK

© 2022 Illumina, Inc. Med ensamrätt.

illumina®