

# NextSeq 550Dx-Forschungsmodus

Referenzhandbuch für das Gerät



Dieses Dokument und dessen Inhalt sind Eigentum von Illumina, Inc. sowie deren Partner-/Tochterunternehmen („Illumina“) und ausschließlich für den bestimmungsgemäßen Gebrauch durch den Kunden in Verbindung mit der Verwendung 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 zu keinem anderen Zweck verwendet, verteilt bzw. anderweitig übermittelt, offengelegt oder auf irgendeine Weise reproduziert werden. Illumina überträgt mit diesem Dokument keine Lizenzen unter seinem Patent, Markenzeichen, Urheberrecht oder bürgerlichem 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 AUFGEFÜHRTE ANWEISUNGEN VOLLSTÄNDIG GELESEN UND BEFOLGT WERDEN, KÖNNEN PRODUKTSCHÄDEN, VERLETZUNGEN DER BENUTZER UND ANDERER PERSONEN SOWIE ANDERWEITIGER SACHSCHADEN EINTRETEN UND JEGLICHE FÜR DAS PRODUKT/DIE PRODUKTE GELTENDE GEWÄHRLEISTUNG ERLISCHT.

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

© 2021 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

## Versionshistorie

Dokument	Datum	Beschreibung der Änderung
Dokument-Nr. 1000000041922 v03	Oktober 2021	Unter „Tests für Sequenzierungsläufe“ einen Hinweis zum Timer für sieben Tage hinzugefügt. Unter „Sequenzierungsworkflow“ einen Abschnitt zum Erstellen eines Laufs mit der Software Local Run Manager hinzugefügt. Stabilitätsgrenze geändert. Infinium Methylation EPIC zu den BeachChip-Typen hinzugefügt. Symbole an die Änderungen der Benutzeroberfläche angepasst.
Dokument-Nr. 1000000041922 v02	November 2020	Abbildung unter „Durchführen eines manuellen Waschlafs“ entsprechend den neuen Kartuschen für Reagenzienwaschlauf und Pufferwaschlauf geändert. Informationen zu weiteren Farben der Statusleiste hinzugefügt.
Dokument-Nr. 1000000041922 v01	März 2018	Informationen zum Überwachungsdienst Illumina Proactive im Abschnitt „Konfigurieren der Systemeinstellungen“ hinzugefügt.
Dokument-Nr. 1000000041922 v00	November 2017	Erste Version.

# Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1 Überblick .....	1
Über dieses Handbuch .....	1
Einleitung .....	1
Weitere Ressourcen .....	1
Gerätekomponenten .....	2
Überblick über das Reagenzien-Kit .....	5
Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien – Überblick .....	5
Kapitel 2 Erste Schritte .....	9
Starten des Geräts .....	9
Anpassen der Systemeinstellungen .....	10
Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien und Ausstattung .....	11
Kapitel 3 Sequenzierung .....	13
Einleitung .....	13
Sequenzierungsworkflow .....	14
Vorbereiten der Reagenzienkartusche .....	14
Vorbereiten der Fließzelle .....	15
Vorbereiten von Bibliotheken für die Sequenzierung .....	15
Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs .....	16
Überwachen des Lauffortschritts .....	23
Automatische Nachwaschung .....	25
Kapitel 4 Scannen .....	27
Einleitung .....	27
Scan-Workflow .....	28
Herunterladen des DMAP-Ordners .....	28
Einsetzen des BeadChips in den Adapter .....	29
Konfigurieren eines Scan-Vorgangs .....	30
Überwachen des Scan-Fortschritts .....	32
Kapitel 5 Wartung .....	35
Einleitung .....	35
Durchführen eines manuellen Waschlafs .....	35
Austausch des Luftfilters .....	38
Software-Updates .....	39
Optionen für das Ausschalten und Neustarten des Geräts .....	41
Anhang A Fehlerbehebung .....	43
Einleitung .....	43
Dateien für die Fehlerbehebung .....	43
Beheben von Fehlern der automatischen Prüfung .....	44
Behälter für verbrauchte Reagenzien ist voll .....	46

Workflow für die Rehybridisierung .....	47
BeadChip- und Scan-Fehler .....	49
Anwendungsspezifische Rezepte und Rezeptordner .....	50
RAID-Fehlermeldung .....	51
Konfigurieren der Systemeinstellungen .....	51
Anhang B Real-Time Analysis .....	55
Überblick über Real-Time Analysis .....	55
Real-Time Analysis-Workflow .....	56
Anhang C Ausgabedateien und -ordner .....	61
Sequenzierungsausgabedateien .....	61
Ordnerstruktur der Ausgabedaten .....	64
Scan-Ausgabedateien .....	65
Ordnerstruktur der ausgegebenen Scan-Daten .....	65
Index .....	67
Technische Unterstützung .....	71

# Kapitel 1 Überblick

Über dieses Handbuch .....	1
Einleitung .....	1
Weitere Ressourcen .....	1
Gerätekomponenten .....	2
Überblick über das Reagenzien-Kit .....	5
Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien – Überblick .....	5

## Über dieses Handbuch

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

## Einleitung

### Sequenzierungsfunktionen

- ▶ **Hochdurchsatzsequenzierung:** Das NextSeq™ 550Dx-Gerät ermöglicht die Sequenzierung von DNA-Bibliotheken.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA):** Führt die Bildverarbeitung und das Base-Calling durch. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Real-Time Analysis auf Seite 55*.
- ▶ **Datenanalyse im Gerät möglich:** Mit den für den Lauf angegebenen Analysemodulen der Analysis Software können die Laufdaten analysiert werden.
- ▶ **Dual-Boot-Funktionalität:** Das NextSeq 550Dx-Gerät verfügt über separate Festplatten für den Diagnosemodus (Dx) und den RUO-Modus (Research Use Only, nur für Forschungszwecke).

### 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, Infinium MethylationEPIC 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 Handbuch zur Standortvorbereitung für das Gerät (Dokument-Nr. 100000009869_deu)</i>	Enthält Spezifikationen für den Arbeitsplatz, die elektrischen Anforderungen und die Umgebungsbedingungen.
<i>NextSeq 550Dx Sicherheits- und Compliance-Handbuch für das Gerät (Dokument-Nr. 100000009868_deu)</i>	Bietet Informationen zur Betriebssicherheit, zu Compliance-Erklärungen sowie zu Gerätekennzeichnungen.
<i>RFID Reader Compliance-Handbuch (Dokument-Nr. 1000000030332_deu)</i>	Bietet Informationen zum integrierten RFID Reader des Geräts, Compliance-Zertifizierungen sowie sicherheitsbezogene Informationen.
<i>NextSeq 550Dx-Gerät (Forschungsmodus) Referenzhandbuch (Dokument-Nr. 1000000041922_deu)</i>	Stellt Anweisungen zum Gerätebetrieb sowie zur Fehlerbehebung bereit. Zur Verwendung bei Betrieb des NextSeq 550Dx-Geräts im Forschungsmodus mit NextSeq Control Software (NCS) v3.0.
<i>NextSeq 550-System Handbuch (Dokument-Nr. 15069765)</i>	Stellt Anweisungen zum Gerätebetrieb sowie zur Fehlerbehebung bereit. Zur Verwendung bei Betrieb des NextSeq 550Dx-Geräts im Forschungsmodus mit NextSeq Control Software (NCS) v4.0 oder höher.
<i>NextSeq 550 Systemhandbuch</i>	Bietet einen Überblick über Gerätekomponenten, Anweisungen für den Betrieb des Geräts sowie Wartungs- und Fehlerbehebungsverfahren.
<i>Hilfe zu BaseSpace</i>	Bietet Informationen zur Verwendung von BaseSpace™ Sequence Hub und den verfügbaren Analyseoptionen.

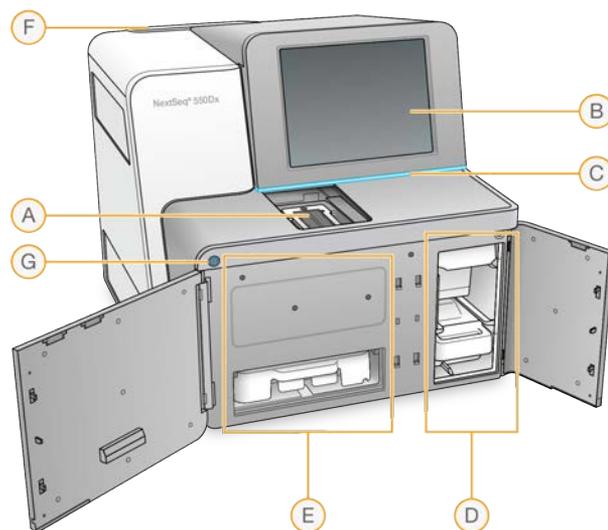
Auf der [NextSeq 550Dx-Gerätesupportseite](#) der Illumina-Website können Sie auf Dokumentationen, Software-Downloads, Online-Schulungen und häufig gestellte Fragen zugreifen.

Auf den [NextSeq 550Dx-Supportseiten](#) der Illumina-Website können Sie auf Dokumentation, 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 während eines Sequenzierungslaufs die Fließzelle.
- B **Touchscreen-Monitor:** Ermöglicht die Systemkonfiguration und -einrichtung am Gerät über die Benutzeroberfläche der Betriebssoftware.
- C **Statusleiste:** Gibt den Gerätestatus an, z. B. „In Arbeit“ (blau), „Überprüfung erforderlich“ (orange), „Bereit zur Sequenzierung“ (grün), „Initialisierung“ (abwechselnd blau/weiß), „Noch nicht initialisiert“ (weiß) oder dass in den nächsten 24 Stunden ein Waschlauf durchgeführt werden muss (gelb).
- D **Pufferkammer:** Enthält die Pufferkartusche 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.

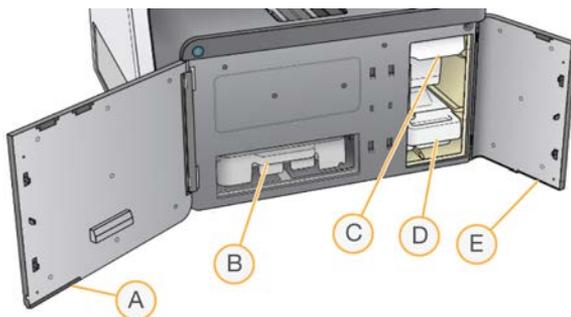
## Bildgebungskammer

Die Bildgebungskammer enthält den Tisch, zu dem drei Ausrichtungsstifte für die Positionierung der Fließzelle gehören. Nach dem Laden der Fließzelle wird die Klappe 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 **Klappe der Reagenzienkammer:** Schließt die Reagenzienkammer mit einem Riegel unterhalb des rechten unteren Klappenbereichs. Die Reagenzienkammer enthält die Reagenzienkartusche.
- B **Reagenzienkartusche:** Bei der Reagenzienkartusche handelt es sich um ein vorgefülltes Verbrauchsmaterial für den Einmalgebrauch.
- C **Pufferkartusche:** Die Pufferkartusche ist ein vorgefülltes Verbrauchsmaterial für den Einmalgebrauch.
- D **Behälter für verbrauchte Reagenzien:** Hierin werden verbrauchte Reagenzien nach jedem Lauf zur Entsorgung gesammelt.
- E **Klappe der Pufferkammer:** Schließt die Pufferkammer mit einem Riegel unterhalb der unteren linken Ecke der Klappe.

## 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 38](#).

## NextSeq 550Dx-Software

Die Gerätesoftware umfasst integrierte Anwendungen, die Sequenzierungsläufe durchführen.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS):** Die Steuerungssoftware führt Sie durch die Schritte zum Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs.
- ▶ **Real-Time Analysis-Software (RTA):** RTA führt die Bildanalyse und das Base-Calling während des Laufs durch. Das NextSeq 550Dx-Gerät verwendet RTA v2, eine Software die gegenüber vorherigen Versionen wichtige Unterschiede bei der Architektur und den Funktionen aufweist. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Real-Time Analysis auf Seite 55*.

## Statussymbole

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

Statussymbol	Statusname	Beschreibung
	Status OK	Das System funktioniert normal.
	Processing (Verarbeitung)	Das Gerät führt die Verarbeitung durch.
	Warning (Warnung)	Eine Warnung ist aufgetreten. Warnungen stoppen einen Lauf nicht und es ist keine Aktion erforderlich, damit der Lauf fortgesetzt werden kann.
	Error (Fehler)	Ein Fehler ist aufgetreten. Bei Fehlern sind Maßnahmen erforderlich, bevor der Lauf fortgesetzt werden kann.
	Service Needed (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 zur ersten Inbetriebnahme des Geräts finden Sie unter *Starten des Geräts auf Seite 9*.

Informationen zum Ausschalten des Geräts finden Sie unter *Ausschalten des Geräts* auf Seite 41.

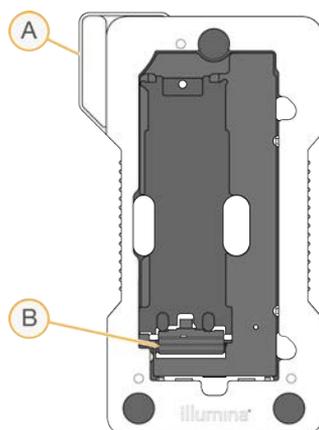
Ein/Aus-Status	Maßnahme
Gerät ist ausgeschaltet	Drücken Sie die Ein/Aus-Taste, um das Gerät einzuschalten.
Gerät ist eingeschaltet	Drücken Sie die Ein/Aus-Taste, um das Gerät auszuschalten. Ein Dialogfeld wird angezeigt, um das Herunterfahren des Geräts zu bestätigen.
Gerät ist eingeschaltet	Halten Sie 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

## Überblick über das Reagenzien-Kit

### Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien – Überblick

Die für die Ausführung des NextSeq 550Dx-Geräts erforderlichen Sequenzierungs-Verbrauchsmaterialien sind separat erhältlich. Sie werden in einem Kit für den Einmalgebrauch bereitgestellt. Jedes Kit enthält eine Fließzelle, eine Reagenzienkartusche, eine Pufferkartusche und einen Bibliotheksverdünnungspuffer. Weitere Informationen finden Sie in der Packungsbeilage zum *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 Zyklen)*, *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 Zyklen)* oder *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 Zyklen)*.

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

### VORSICHT

NextSeq 550Dx High Output Reagent v2.5-Kits erfordern NOS 1.3 oder höher, damit das Gerät die v2.5-Fließzellenkartusche akzeptiert. Führen Sie die Software-Updates durch, bevor Sie die Proben und Verbrauchsmaterialien vorbereiten, um zu verhindern, dass Reagenzien und/oder Proben verschwendet werden.

### HINWEIS

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

## Kennzeichnung zur Kit-Kompatibilität

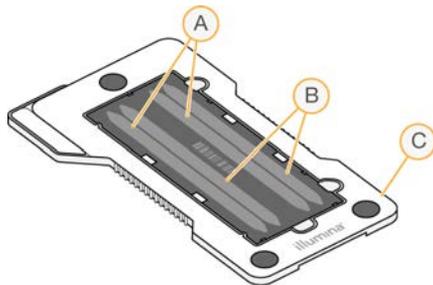
Die Kit-Komponenten sind farbcodiert, um die Kompatibilität zwischen Fließzellen und Reagenzienkartuschen aufzuzeigen. Verwenden Sie stets eine kompatible Reagenzienkartusche und Fließzelle. Der Pufferkartusche ist universell einsetzbar.

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
Komponenten des Kits für hohe Leistung	
Komponenten des Kits 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.

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

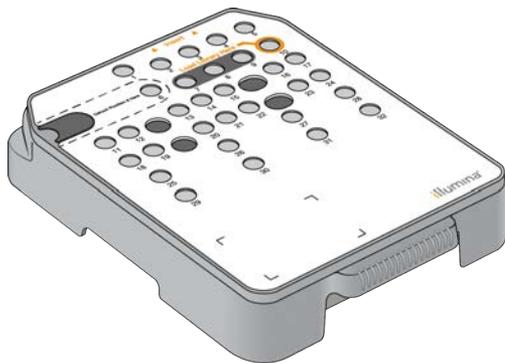
Obwohl die Fließzelle vier Lanes enthält, wird nur eine Bibliothek oder ein Pool aus mehreren Bibliotheken auf der Fließzelle sequenziert. Bibliotheken werden in einen einzelnen Behälter auf der Reagenzienkartusche geladen und automatisch auf die Fließzelle in allen vier Lanes übertragen.

Jede Lane wird in kleinen Bildgebungsbereichen, sogenannten Platten, aufgenommen. Weitere Informationen hierzu finden Sie unter *Fließzellenplatten* auf Seite 61.

## 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 die automatische Nachwaschung reserviert. Dabei wird Waschlösung aus der Pufferkartusche in die reservierten Behälter, durch das System und dann in den Behälter für verbrauchte Reagenzien gepumpt.

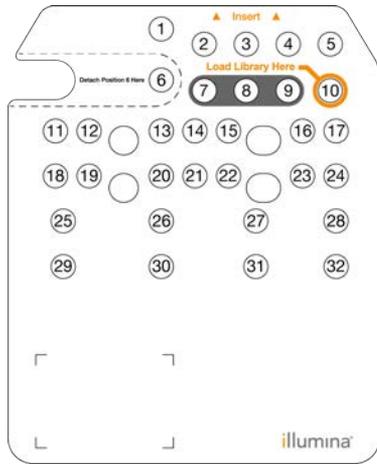


### WARNUNG

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 in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](https://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

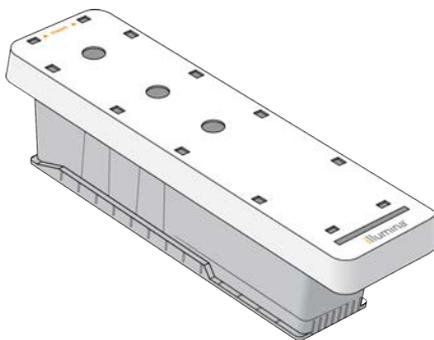
## Herausnehmbarer Behälter in Position 6

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 Behälters für gebrauchte Reagenzien in Position 6 auf Seite 20](#).

## Pufferkartusche – Überblick

Die Pufferkartusche ist ein Verbrauchsmaterial für den Einmalgebrauch mit drei mit Puffern und mit Waschlösung vorgefüllten Behältern. Der Inhalt der Pufferkartusche ist für die Sequenzierung einer Fließzelle ausreichend.

Abbildung 7 Pufferkartusche



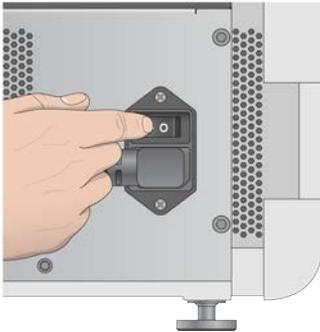
# Kapitel 2 Erste Schritte

Starten des Geräts .....	9
Anpassen der Systemeinstellungen .....	10
Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien und Ausstattung .....	11

## Starten des Geräts

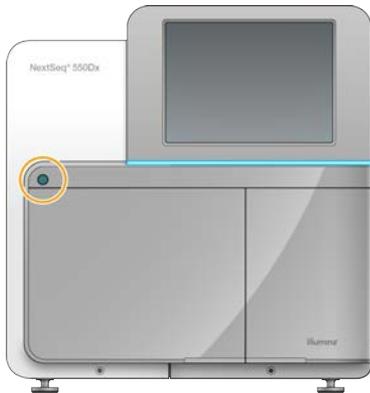
Bringen Sie den Hauptnetzschalter in die Position I (EIN).

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.

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



- 2 Warten Sie, bis das Betriebssystem vollständig geladen wurde.  
Die NextSeq Control Software (NCS) wird automatisch gestartet und initialisiert das System. 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 Kennwörtern finden Sie unter [Benutzerkennwörter auf Seite 1](#). Informationen über das Einrichten eines Kontos für Local Run Manager finden Sie unter [Von Administratoren durchzuführende Einstellungen und Aufgaben auf Seite 1](#).
- 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.

## Gerätemodusanzeigen

Das NextSeq 550Dx-Gerät läuft standardmäßig im Diagnosemodus. Folgende Anzeigen auf dem NCS-Bildschirm geben den Modus des Geräts an.

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

Die Betriebssoftware enthält anpassbare Systemeinstellungen für die Geräte-Identifikation, Eingabevoreinstellungen und Audioeinstellungen sowie den Speicherort des Ausgabeordners. Informationen zum Ändern der Netzwerkkonfigurationseinstellungen finden Sie unter *Konfigurieren der Systemeinstellungen* auf Seite 51.

Anpassungsoptionen:

- ▶ Ändern der Geräte-Identifikation (Avatar und Kurzname)
- ▶ Festlegen der Eingabeoption und der Audio-Signale
- ▶ Festlegen von Laufkonfigurationsoptionen
- ▶ Optionen für das Ausschalten des Geräts
- ▶ Festlegen, dass das Gerät nach erfolgreichem Selbsttest gestartet wird
- ▶ Übermittlung von Geräteleistungsdaten an Illumina auswählen
- ▶ Laufausgabeordner auswählen

## Ändern des Avatarbilds und des Kurznamens des Geräts

- 1 Wählen Sie auf dem Startbildschirm **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
- 2 Wählen Sie **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 3 Um ein bevorzugtes Bild für Ihr Gerät festzulegen, wählen Sie **Browse** (Durchsuchen) und navigieren Sie zu dem gewünschten Bild.
- 4 Geben Sie im Feld „Nick Name“ (Kurzname) einen bevorzugten Namen für das Gerät ein.
- 5 Wählen Sie **Save** (Speichern), um die Einstellungen zu speichern und mit dem nächsten Bildschirm fortzufahren.  
Das Bild und der Name erscheinen links oben in jedem Bildschirm.

## Festlegen der Tastaturoption und der Audio-Signale

- 1 Wählen Sie auf dem Startbildschirm **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
- 2 Wählen Sie **System Customization** (Anpassung des Systems).
- 3 Aktivieren Sie das Kontrollkästchen **Use on-screen keyboard** (Bildschirmtastatur verwenden), um die Bildschirmtastatur des Geräts für Eingaben zu aktivieren.
- 4 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
- 5 Wählen Sie **Save** (Speichern), um die Einstellungen zu speichern und mit dem nächsten Bildschirm fortzufahren.

## Festlegen von Laufkonfigurationsoptionen

- 1 Wählen Sie auf dem 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 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 auf dem 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 Ausstattung

Die folgenden Verbrauchsmaterialien und Geräte werden auf dem NextSeq 550Dx-Gerät verwendet. Die folgenden Verbrauchsmaterialien und Geräte werden für die Vorbereitung der Verbrauchsmaterialien, die Sequenzierung und die Gerätewartung verwendet. Weitere Informationen finden Sie im *Handbuch für das NextSeq 550-System*.

## Verbrauchsmaterialien für die Sequenzierung

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
Alkoholtupfer, 70 % Isopropyl oder Ethanol, 70 %	VWR, Katalog-Nr. 95041-714 (oder vergleichbar) Allgemeiner Laborlieferant	Reinigen der Fließzelle und allgemeine Verwendung
Labortücher, fusselfrei	VWR, Katalog-Nr. 21905-026 (oder vergleichbar)	Reinigen der Fließzelle und allgemeine Verwendung

## Verbrauchsmaterialien für Wartung und Fehlerbehebung

Verbrauchsmaterial	Anbieter	Zweck
NaOCl, 5 % (Natriumhypochlorit)	Sigma-Aldrich, Katalog-Nr. 239305 (oder vergleichbares Produkt in Laborqualität)	Waschen des Geräts mithilfe der manuellen Nachwaschung; 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 $\Omega$ )-Wasser
- ▶ Milli-Q-Wasser
- ▶ Super-Q-Wasser
- ▶ Wasser in Molekularbiologie-Qualität

## Ausstattung

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

# Kapitel 3 Sequenzierung

Einleitung .....	13
Sequenzierungsworkflow .....	14
Vorbereiten der Reagenzienkartusche .....	14
Vorbereiten der Fließzelle .....	15
Vorbereiten von Bibliotheken für die Sequenzierung .....	15
Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs .....	16
Überwachen des Lauffortschritts .....	23
Automatische Nachwaschung .....	25

## 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.

## Analyse

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

## 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

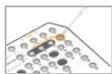
### Create Run



Erstellen Sie einen Lauf im Softwaremodul „Local Run Manager“. Weitere Informationen finden Sie in der Analyse-Workflow-Anleitung für Ihr Modul.



Bereiten Sie eine neue Reagenzienkartusche vor: auftauen und überprüfen.  
Bereiten Sie eine neue Fließzelle vor: auf Raumtemperatur bringen, auspacken und überprüfen.



Geben Sie die Bibliothekslösung in Behälter Nr. 10 der Reagenzienkartusche.



Wählen Sie auf dem NCS-Startbildschirm des Geräts die Option **Sequence** (Sequenzieren), wählen Sie Ihre Lauf-ID und beginnen Sie mit den Schritten für die Laufkonfiguration. Wählen Sie **Run** (Lauf).



Laden Sie die Fließzelle.



Leeren Sie den Behälter für verbrauchte Reagenzien und setzen Sie ihn wieder ein.  
Setzen Sie die Pufferkartusche und die Reagenzienkartusche ein.



Überprüfen Sie die Ergebnisse des Selbsttests. Wählen Sie **Start** (Starten). (Nicht erforderlich, falls für den automatischen Start konfiguriert.)



Überwachen Sie den Lauf von der Benutzeroberfläche der Betriebssoftware oder von einem vernetzten Computer aus, auf dem Local Run Manager läuft.



Nach Abschluss der Sequenzierung beginnt automatisch ein Gerätewaschlauf.

## Vorbereiten der Reagenzienkartusche

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

- 1 Nehmen Sie die Reagenzienkartusche aus dem Lagerort mit einer Temperatur von -25 °C bis -15 °C 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 7 Tage

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

- Invertieren Sie die Kartusche fünfmal, um die Reagenzien zu mischen.
- 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.
- Klopfen Sie die Kartusche 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 in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Vorbereiten der Fließzelle

- Nehmen Sie einen neuen Fließzellenkarton aus dem Lagerort mit einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C.
- Entfernen Sie die Folienverpackung des Kartons und legen Sie ihn für 30 Minuten bei Raumtemperatur 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 Sie Ihre Bibliotheken auf ein Ladevolumen von 1,3 ml. In der Praxis kann die Ladekonzentration je nach Bibliotheksvorbereitungs- und Quantifizierungsmethode variieren. Die Verdünnung von Probenbibliotheken hängt von der Komplexität der Oligonukleotid-Pools ab. Eine Anleitung zur Vorbereitung von Probenbibliotheken für die Sequenzierung, einschließlich der Verdünnung und des Poolings von Bibliotheken, finden Sie in der Gebrauchsanweisung im Abschnitt für das entsprechende Bibliotheksvorbereitungskit. Es ist erforderlich, die Clusterdichte auf dem NextSeq 550Dx zu optimieren.

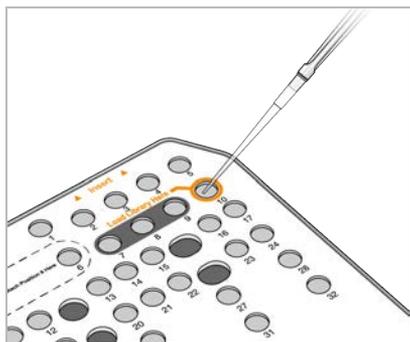
## Denaturieren und Verdünnen von Bibliotheken

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 hierzu finden Sie in der Packungsbeilage für die Bibliotheksvorbereitung.

## 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 Bibliotheken in Behälter Nr. 10 mit dem Namen **Load Library Here** (Bibliothek hier laden). Achten Sie beim Zuführen der Bibliotheken darauf, die Verschlussfolie nicht zu berühren.

Abbildung 10 Laden der Bibliotheken



## Konfigurieren eines Sequenzierungslaufs

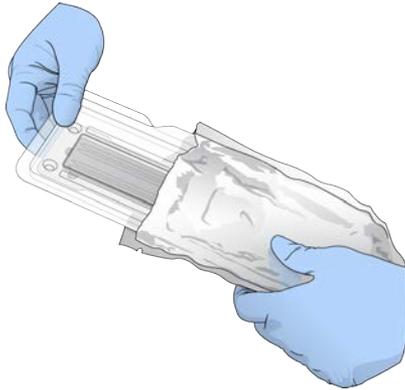
### Anmelden bei BaseSpace

- 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 transparente, aufklappbare Plastikverpackung und nehmen Sie die Fließzelle heraus.

**Abbildung 12** Herausnehmen aus der aufklappbaren Verpackung

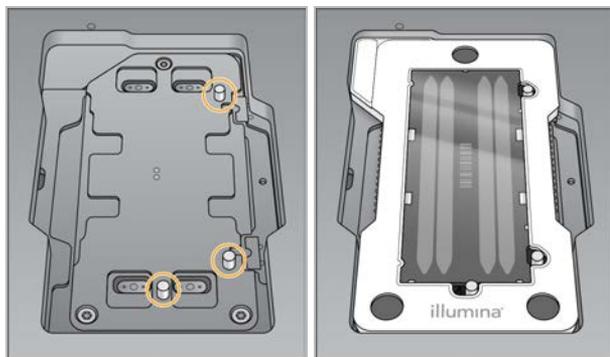


- 4 Reinigen Sie die Glasoberfläche der Fließzelle mit einem fusselfreien Alkoholtupfer. Trocknen Sie das Glas mit einem fusselfreien Labortuch.

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

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

**Abbildung 13** Laden der Fließzelle



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

**HINWEIS** Greifen Sie nicht an die Fließzellenklappe, 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 Ecke der Klappe.
- 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.

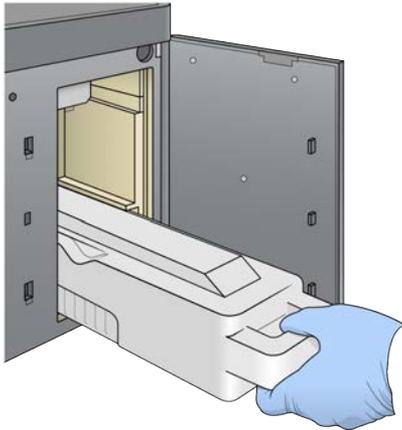


### WARNUNG

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 in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](https://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.

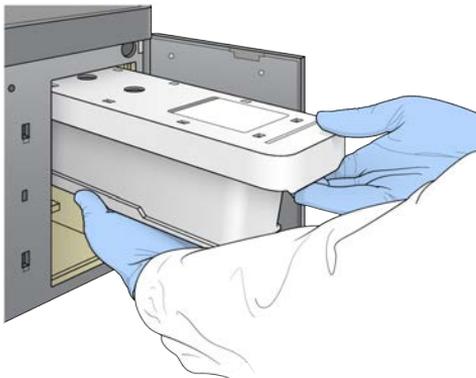
Abbildung 15 Einsetzen des leeren Behälters für verbrauchte Reagenzien



## Einsetzen der Pufferkartusche

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

Abbildung 16 Einsetzen der Pufferkartusche



- 3 Schließen Sie die Klappe der Pufferkammer und wählen Sie **Next** (Weiter).

## Laden der Reagenzienkartusche

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



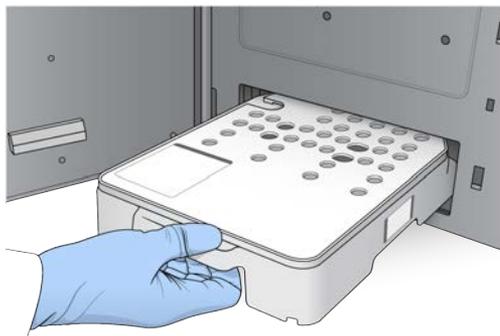
#### WARNUNG

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 in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](http://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 Behälters für gebrauchte Reagenzien in Position 6* auf Seite 20.

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

**Abbildung 17** Laden der Reagenzienkartusche

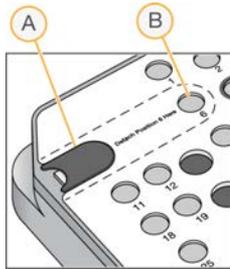


- 4 Wählen Sie **Load** (Laden).  
Die Software bringt die Kartusche automatisch in Position (ca. 30 Sekunden), die ID der Reagenzienkartusche wird angezeigt und die Sensoren sind markiert.
- 5 Wählen Sie **Next** (Weiter).

### Herausnehmen des Behälters für gebrauchte Reagenzien in Position 6

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

Abbildung 18 Entfernbare Behälter in 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 or BaseSpace Onsite** (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.
- ▶ **Standalone** (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** (Laufname): Name des Laufs, wie er in BaseSpace zugewiesen wurde.
  - ▶ **Library ID** (Bibliothek-ID): Name der Pool-Bibliotheken, wie sie in BaseSpace zugewiesen wurden.
  - ▶ **Recipe** (Rezept): Name des Rezepts, 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.
  - ▶ **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 Custom Primers Guide (Dokument-Nr. 15057456)* (NextSeq-Benutzerhandbuch für anwendungsspezifische Primer).

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

4 Wählen Sie **Next** (Weiter).

## Eingeben der Laufparameter (eigenständige Konfiguration)

1 Geben Sie einen beliebigen Namen ein.

2 **[Optional]** Geben Sie eine beliebige Bibliotheks-ID ein.

3 Wählen Sie einen Read-Typ aus: **Single Read** oder **Paired End**.

4 Geben Sie die Anzahl der Zyklen für jeden Read des Sequenzierungslaufs ein.

- ▶ **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 Custom Primers Guide (Dokument-Nr. 15057456)* (NextSeq-Benutzerhandbuch für anwendungsspezifische Primer).

- ▶ **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“ (Rezept) ein Rezept aus. Es werden nur kompatible Rezepte 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** ☐ : Der Selbsttest wurde noch nicht durchgeführt.
- ▶ **Fortschrittsymbol** ◌ : Der Selbsttest läuft.
- ▶ **Grünes Häkchen** ✓ : Der Selbsttest wurde bestanden.
- ▶ **Rotes ✗**: Der Selbsttest wurde nicht bestanden. Bei allen Elementen, die den Test nicht bestehen, ist eine Maßnahme erforderlich, bevor Sie fortfahren können. Siehe *Beheben von Fehlern der automatischen Prüfung auf Seite 44*.

Laufende automatisierte Selbsttests können Sie mithilfe der Schaltfläche **Cancel** (Abbrechen) 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.

Wenn das Gerät nicht für den automatischen Start von Läufen konfiguriert ist, starten Sie den Lauf nach Abschluss des automatisierten Selbsttests.

## Starten des Laufs

Wählen Sie nach Abschluss des automatisierten Selbsttests **Start** (Starten). 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 11*.



### VORSICHT

Stellen Sie sicher, dass Sie weiterhin bei Windows angemeldet sind. Wenn Sie sich während der Durchführung eines Sequenzierungslaufs vom Windows-System abmelden, wird der Lauf gestoppt.

**HINWEIS** Reagenzien dürfen nicht länger als 24 Stunden ohne Verarbeitung im Gerät verbleiben.

## Überwachen des Lauffortschritts

- 1 Anhand der auf dem Bildschirm aufgeführten Kennzahlen können Sie den Lauffortschritt sowie Intensitäten und Qualitäts-Scores überwachen.

**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 Sequencing Analysis Viewer (SAV) angezeigt werden.

## Zyklen für Laufkennzahlen

Laufkennzahlen werden zu verschiedenen Zeitpunkten während eines Laufs angezeigt.

- ▶ 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, Ergebnis und Qualitäts-Scores.

## Datenübertragung

Status	Local Run Manager	Ausgabeordner
Verbunden		
Verbunden und überträgt Daten		
Nicht verbunden		
Deaktiviert		

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, übertragen Sie manuell die auf dem Gerätecomputer temporär gespeicherten Daten, bevor Sie einen neuen Lauf starten.

## Universal Copy Service

Das NextSeq 550Dx enthält einen Universal Copy Service (allgemeinen Kopierdienst). RTA2 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 eingehen. Falls eine Ausnahme eintritt, wird je nach Anzahl der Dateien in der Warteschlange die Datei wieder in die Warteschlange eingereiht.

## Sequencing Analysis Viewer

Die Software Sequencing Analysis Viewer 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 RTA 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 (Artikelnr. 15020619)* (Benutzerhandbuch für Sequencing Analysis Viewer).

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

## Automatische Nachwaschung

Nach Abschluss des Sequenzierungsverfahrens wird eine automatische Nachwaschung mit der Waschlösung in der Pufferkartusche und dem NaOCl in der Reagenzienkartusche initiiert.

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

## Nach dem Waschlaufr

Nach dem Waschlaufr 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.



# Kapitel 4 Scannen

Einleitung .....	27
Scan-Workflow .....	28
Herunterladen des DMAP-Ordners .....	28
Einsetzen des BeadChips in den Adapter .....	29
Konfigurieren eines Scan-Vorgangs .....	30
Überwachen des Scan-Fortschritts .....	32

## Einleitung

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

- ▶ Einen hybridisierten und gefärbten 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 (für Genotypaufrufe) 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 (mit Intensitätsdaten) generiert werden. Weitere Informationen finden Sie unter *BeadChip-Scan-Konfiguration auf Seite 53*.

## 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 28*.

## 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- 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.

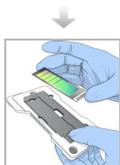
Der Speicherort der Dateien wird auf dem Bildschirm „BeadChip Scan Configuration“ (BeadChip-Scan-Konfiguration) angegeben. Wählen Sie im NCS-Startbildschirm **Manage Instrument** (Gerät verwalten), **System Configuration** (Systemkonfiguration) und anschließend **BeadChip Scan Configuration** (BeadChip-Scan-Konfiguration).

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 50.

## Scan-Workflow

### DMAP

Laden Sie die DMAP-Informationen herunter und speichern Sie sie im angegebenen DMAP-Ordner.



Setzen Sie den BeadChip in den BeadChip-Adapter ein.



Laden Sie den BeadChip-Adapter auf das Gerät.



Geben Sie die Scan-Parameter an: Speicherort des DMAP-Ordners und der Ausgabe.



Überprüfen Sie die Ergebnisse der automatischen Prüfung. Wählen Sie **Start** (Starten).



Überwachen Sie den Scan-Fortschritt über die Benutzeroberfläche der Steuerungssoftware.

## 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, die noch nicht heruntergeladen wurden)
  - ▶ 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 verfolgen.
  - 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
  - ▶ BeadChip-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 verfolgen.
- 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 19** Einsetzen des BeadChips in den Adapter



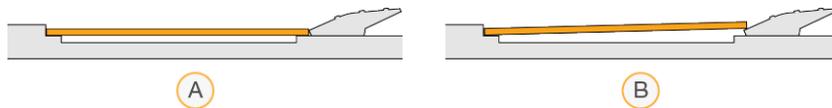
- 3 Verwenden Sie die seitlichen Öffnungen des BeadChips, um ihn sicher im Adapterfach zu platzieren.

**Abbildung 20** 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 21** 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 Klappe 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 Pufferkartusche 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 Pufferkartusche aus der Pufferkammer.

**WARNUNG**

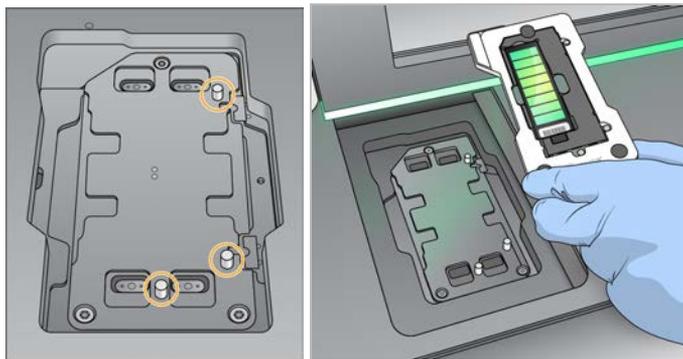
Diese Reagenzien enthalten potenziell gefährliche Chemikalien. Es kann daher durch Inhalation oder orale Aufnahme, Kontakt mit der Haut oder den Augen zu einer Verletzung von Personen kommen. Tragen Sie eine entsprechende für das Expositionsrisiko geeignete Schutzausrüstung, einschließlich Schutzbrille, 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 in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

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

## Laden des BeadChip-Adapters

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

Abbildung 22 Laden des BeadChip-Adapters



- 2 Wählen Sie **Load** (Laden).  
Die Klappe 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 49*.
- 3 Wählen Sie **Next** (Weiter).

## Scan-Konfiguration

- 1 Überprüfen Sie auf dem 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**  : Der Selbsttest wurde noch nicht durchgeführt.
- ▶ **Fortschrittsymbol**  : Der Selbsttest läuft.
- ▶ **Grünes Häkchen**  : Der Selbsttest wurde bestanden.
- ▶ **Rotes X**  : Der Selbsttest wurde nicht bestanden. Bei allen Elementen, die den Test nicht bestehen, ist eine Maßnahme erforderlich, bevor Sie fortfahren können. Siehe *Beheben von Fehlern der automatischen Prüfung auf Seite 44*.

Laufende automatisierte Selbsttests können Sie mithilfe der Schaltfläche **Cancel** (Abbrechen) 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.

Wenn das Gerät nicht für den automatischen Start von Läufen konfiguriert ist, starten Sie den Lauf nach Abschluss des automatisierten Selbsttests.

## Starten des Scan-Vorgangs

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

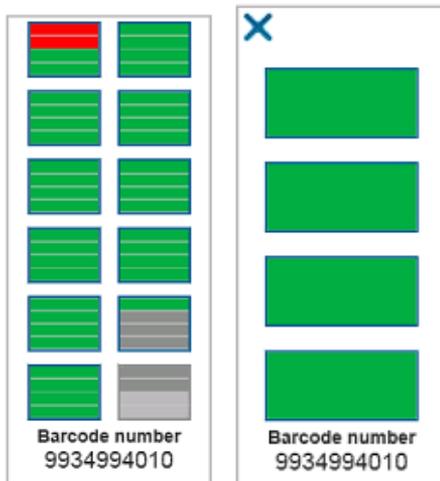
Informationen darüber, wie Sie das System so konfigurieren, dass nach einer bestandenen Prüfung der Scan-Vorgang automatisch gestartet wird, finden Sie unter *Festlegen von Laufkonfigurationsoptionen auf Seite 11*.

## Überwachen des Scan-Fortschritts

- 1 Sie überwachen den Scan-Fortschritt mithilfe des BeadChip-Bilds. Die jeweilige Farbe des Bilds gibt den Status des Scans an.
  - ▶ **Hellgrau**: Nicht gescannt
  - ▶ **Dunkelgrau**: Gescannt, aber nicht registriert
  - ▶ **Grün**: Gescannt und registriert
  - ▶ **Rot**: Scannen und Registrierung 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 49*.
- 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 23 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 auf dem 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 65](#).

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 .....	35
Durchführen eines manuellen Waschlaufts .....	35
Austausch des Luftfilters .....	38
Software-Updates .....	39
Optionen für das Ausschalten und Neustarten des Geräts .....	41

## Einleitung

Die Wartungsverfahren umfassen manuelle Gerätewaschläufe und den Austausch des Luftfilters. Die Optionen zum Ausschalten und Neustarten des Geräts werden ebenfalls erläutert.

- ▶ **Gerätewaschläufe:** Die Geräte bleiben einsatzbereit, wenn Sie nach jedem Sequenzierungslauf eine automatische Nachwaschung durchführen. Ein manueller Waschlauft ist jedoch regelmäßig unter bestimmten Bedingungen erforderlich. Siehe *Durchführen eines manuellen Waschlaufts* auf Seite 35.
- ▶ **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.

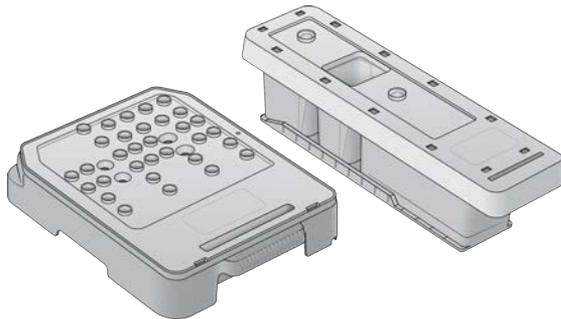
## Durchführen eines manuellen Waschlaufts

Manuelle Waschläufe werden vom Startbildschirm aus initiiert. Zu den Waschlaufoptionen gehören der Schnellwaschlauft und die manuelle Nachwaschung.

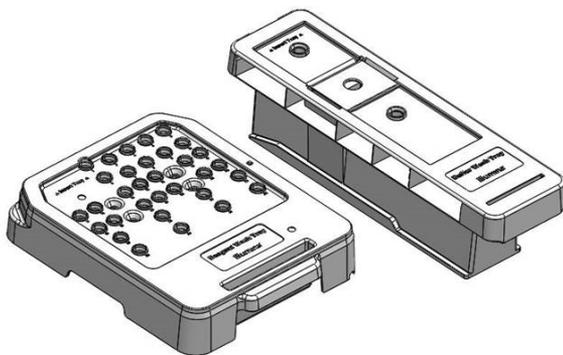
Waschlauftypen	Beschreibung
Schnellwaschlauft Dauer: 20 Minuten	Spült das System mit einer vom Benutzer bereitgestellten Waschlösung aus Wasser in Laborqualität und Tween 20 (Pufferkartusche für den Waschlauft). <ul style="list-style-type: none"><li>• Alle 14 Tage erforderlich, wenn sich das Gerät mit eingesetzter Reagenzienkartusche und Pufferkartusche im Leerlauf befindet.</li><li>• Alle sieben Tage erforderlich, wenn sich das Gerät in trockenem Zustand befindet (Reagenzienkartusche und Pufferkartusche sind nicht eingesetzt).</li></ul>
Manuelle Nachwaschung Dauer: 90 Minuten	Spült das System mit einer vom Benutzer bereitgestellten Waschlösung aus Wasser in Laborqualität und Tween 20 (Pufferkartusche für den Waschlauft) sowie 0,12 % Natriumhypochlorit (Reagenzienkartusche für den Waschlauft). Erforderlich, wenn die automatische Nachwaschung nicht durchgeführt wurde.

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

**Abbildung 24** Reagenzienkartusche für den Waschlauf und Pufferkartusche für den Waschlauf (ursprüngliche Ausführung)



**Abbildung 25** Reagenzienkartusche für den Waschlauf und Pufferkartusche für den Waschlauf (neue Ausführung)



## Vorbereiten einer manuellen Nachwaschung

Entscheiden Sie sich entweder, wie unten beschrieben, für eine manuelle Nachwaschung oder bereiten Sie einen Schnellwaschlauf vor (nächster Abschnitt). Wenn Sie eine manuelle Nachwaschung durchführen möchten, überspringen Sie den Abschnitt für den Schnellwaschlauf und fahren Sie mit *Laden einer gebrauchten Fließzelle und der Waschlaufkartuschen* auf Seite 37 fort.

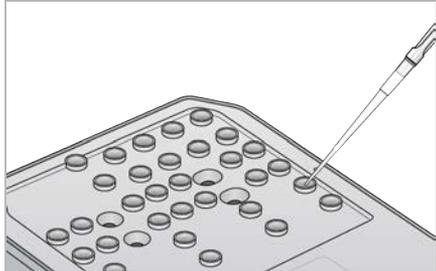
Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien	Volumen und Beschreibung
NaOCl	1 ml, verdünnt auf 0,12 % Wird in die Reagenzienkartusche für den Waschlauf gegeben (Position 28)
100 % Tween 20 Wasser in Laborqualität	Wird verwendet, um 125 ml 0,05%-Tween-20-Waschlösung zu erzeugen Wird in die Pufferkartusche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

**HINWEIS** Verwenden Sie stets eine frische NaOCl-Lösung, die innerhalb der vorherigen **24 Stunden** vorbereitet wurde. Wenn Sie eine Menge von mehr als 1 ml vorbereiten, lagern Sie die verbleibende Lösung bei 2 °C bis 8 °C für die Verwendung 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)

- 2 Invertieren Sie das Röhrchen zum Mischen.
- 3 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:
  - Pufferkartusche für den Waschlauf (ursprüngliche Ausführung)
    - ▶ 100 % Tween 20 (62 µl)
    - ▶ Wasser in Laborqualität (125 ml)
    - ▶ Geben Sie 125 ml Waschlösung in den mittleren Behälter der Pufferkartusche für den Waschlauf.
  - Pufferkartusche für den Waschlauf (neue Ausführung)
    - ▶ 100 % Tween 20 (75 µl)
    - ▶ Wasser in Laborqualität (150 ml)
    - ▶ Geben Sie 150 ml Waschlösung in den mittleren Behälter der Pufferkartusche für den Waschlauf.
- 5 Wählen Sie **Perform Wash** (Waschlauf durchführen) und anschließend **Manual Post-Run Wash** (Manuelle Nachwaschung).

## Vorbereiten eines Schnellwaschlaufs

Alternativ zu dem unter *Vorbereiten einer manuellen Nachwaschung auf Seite 36* beschriebenen Vorgehen können Sie wie unten beschrieben einen Schnellwaschlauf vorbereiten.

Vom Benutzer bereitzustellende Verbrauchsmaterialien	Volumen und Beschreibung
100 % Tween 20 Wasser in Laborqualität	Wird verwendet, um 40 ml 0,05%-Tween-20-Waschlösung zu erzeugen Wird in die Pufferkartusche 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 Pufferkartusche 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).

- 2 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 in den Sicherheitsdatenblättern (SDS, Safety Data Sheet) unter [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

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

## Starten des Waschlaufs

- 1 Wählen Sie **Start** (Starten).
- 2 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

Im Lieferumfang neuer Systeme sind drei Ersatzluftfilter enthalten. Diese sollten Sie lagern und verwenden, wenn Sie vom Gerät zum Wechseln des Filters aufgefordert werden.

Der Luftfilter stellt den Luftstrom durch das Gerät sicher. Die Software zeigt alle 90 Tage eine Meldung mit der Aufforderung an, den Luftfilter zu wechseln. 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.

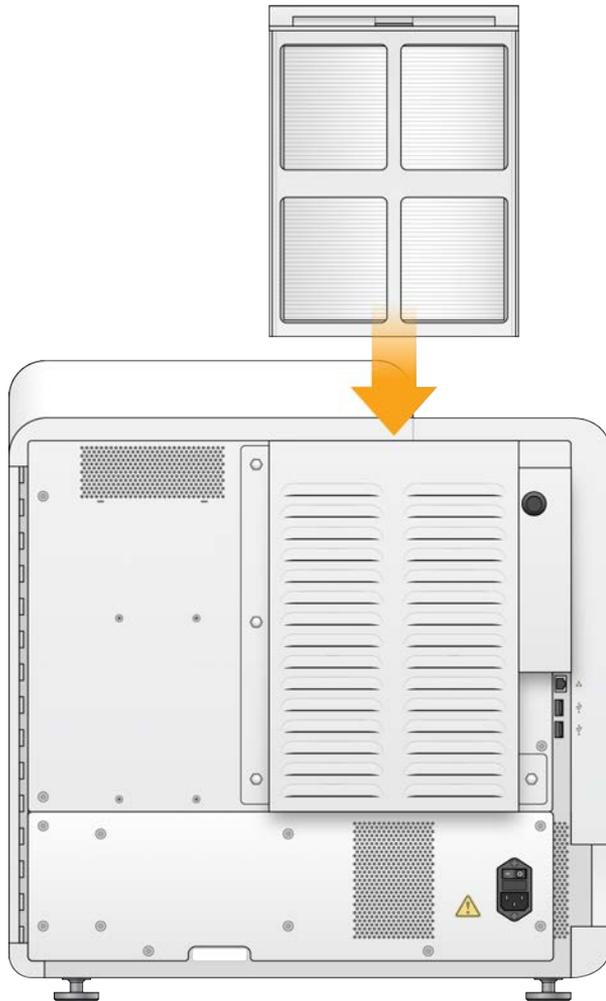
- 1 Nehmen Sie den neuen Luftfilter aus der Verpackung und notieren Sie auf dem Rahmen des Filters das Datum, an dem Sie den Filter einsetzen.
- 2 Drücken Sie an der Rückseite des Geräts auf die Oberseite des Filtereinsatzes, um den Einsatz zu entriegeln.
- 3 Fassen Sie die Oberseite des Filtereinsatzes,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

- 5 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 Sie beim Einlegen des Luftfilters in den Einsatz den grünen „Up“-Pfeil sehen 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-Rezepte
- ▶ RTA2

- ▶ NextSeq Service Software (NSS)
- ▶ Sequencing Analysis 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** (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** (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 „Reboot / Shutdown“ (Neu starten/Ausschalten) wählen, haben Sie Zugang zu den folgenden Funktionen:

- ▶ „Reboot to RUO“ (Im Forschungsmodus neu starten): Das Gerät wird im Forschungsmodus gestartet.
- ▶ „Restart“ (Neu starten): Das Gerät wird im Diagnosemodus gestartet.
- ▶ „Restart to Dx from RUO“ (Neustart im Diagnosemodus vom Forschungsmodus): Das Gerät wird im Diagnosemodus gestartet.
- ▶ „Shutdown“ (Herunterfahren): Bei erneutem Einschalten wird das Gerät im Diagnosemodus gestartet.
- ▶ „Exit to Windows“ (Beenden und 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 **Reboot / Shutdown** (Neu starten/Ausschalten).
- 3 Wählen Sie **Restart** (Neu starten).

## Ausschalten des Geräts

- 1 Wählen Sie **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
- 2 Wählen Sie **Reboot / Shutdown** (Neu starten/Ausschalten).
- 3 Wählen Sie **Shutdown** (Ausschalten).  
Der Befehl „Shutdown“ (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 Justierung der optischen Elemente und der Datenintegrität führen. Falls Sie den Standort des Geräts ändern müssen, wenden Sie sich an Ihren Illumina-Vertreter.

## Beenden und Windows aufrufen

Der Befehl „Exit to Windows“ (Beenden und 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. Nur ein Administrator kann nach dem Beenden Windows aufrufen.

- 1 Wählen Sie **Manage Instrument** (Gerät verwalten).
- 2 Wählen Sie **Reboot / Shutdown** (Neu starten/Ausschalten).
- 3 Wählen Sie **Exit to Windows** (Beenden und Windows aufrufen).

# Anhang A Fehlerbehebung

Einleitung .....	43
Dateien für die Fehlerbehebung .....	43
Beheben von Fehlern der automatischen Prüfung .....	44
Behälter für verbrauchte Reagenzien ist voll .....	46
Workflow für die Rehybridisierung .....	47
BeadChip- und Scan-Fehler .....	49
Anwendungsspezifische Rezepte und Rezeptordner .....	50
RAID-Fehlermeldung .....	51
Konfigurieren der Systemeinstellungen .....	51

## Einleitung

Wenden Sie sich hinsichtlich Problemen mit der Laufqualität oder der Leistung an den technischen Support von Illumina. Siehe *Technische Unterstützung auf Seite 71*.

## 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"><li>• Laufname</li><li>• Anzahl der Zyklen im Lauf</li><li>• Anzahl der Zyklen in jedem Read</li><li>• Angabe, ob der Read indiziert ist</li><li>• Anzahl der Bildstreifen und Platten auf der Fließzelle</li></ul>
Laufparameterdatei (RunParameters.xml)	Stammordner	Enthält Informationen zu den Laufparametern und Laufkomponenten. Hierzu gehören RFID, Seriennummer, Artikelnummer 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. 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.
Globale Protokolldateien (*GlobalLog*.tsv)	RTA-Protokolle	In diesen Dateien werden alle RTA-Ereignisse protokolliert. Die globalen Protokolldateien werden während des Laufs aktualisiert.
Lane-Protokolldateien (*LaneLog*.txt)	RTA-Protokolle	In diesen Dateien werden alle RTA-Verarbeitungsereignisse protokolliert. Die Lane-Protokolldateien werden während des Laufs aktualisiert.

## RTA-Fehler

Zum Beheben von Fehlern, die bei RTA 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 Proben- und Abschnittskennzahlen. <b>[Barcode]_sample_metrics.csv</b> : 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. <b>[Barcode]_section_metrics.csv</b> : 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]	<b>[Barcode]_rescan.flowcell</b> : 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 den jeweiligen Fehler mithilfe der folgenden empfohlenen Maßnahmen beheben.

## Tests für Sequenzierumläufe

Wenn ein Selbsttest fehlschlägt, wird die RFID der Reagenzienkartusche nicht gesperrt und kann für einen nachfolgenden Lauf verwendet werden. Während einer Initialisierung der Steuerungssoftware, die ggf. zur Fehlerbehebung erforderlich ist, werden jedoch die RFIDs von Fließzelle, Reagenzienkartusche und Pufferkartusche gesperrt. Vor einem Systemneustart muss der Benutzer die Fließzelle, die Reagenzienkartusche und die Pufferkartusche aus dem Gerät nehmen. Zudem werden die RFIDs der Verbrauchsmaterialien gesperrt, nachdem die Verschlussfolien durchstoßen wurden. Sobald eine Fließzellen-RFID von der Software eingelesen wurde, startet ein Timer. Nach Ablauf von sieben Stunden gilt die Fließzelle als gesperrt und nicht mehr verwendbar.

Systemprüfungen	Empfohlene Maßnahme
Doors closed (Klappen geschlossen)	Stellen Sie sicher, dass die Kammerklappen geschlossen sind.
Consumables loaded (Verbrauchsmaterialien geladen)	Die Verbrauchsmaterialiensensoren funktionieren nicht. Stellen Sie sicher, dass alle Verbrauchsmaterialien ordnungsgemäß geladen sind. Wählen Sie in den Laufkonfigurationsbildschirmen die Option <b>Back</b> (Zurück), um zum Ladeschritt zurückzukehren, und wiederholen Sie die Laufkonfiguration.

Systemprüfungen	Empfohlene Maßnahme
Required software (Software erforderlich)	Wichtige Software-Komponenten fehlen. Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
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)	Der Speicherplatz auf dem Netzwerkserver ist voll.
Temperatur	Empfohlene Maßnahme
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 Maßnahme
Imaging limits (Bildgebungsbeschränkungen)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Z Steps-and-Settle (z-Tisch – Schritt und Positionierung)	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"> <li>Wählen Sie in den Laufkonfigurationsbildschirmen die Option <b>Back</b> (Zurück), um zum Fließzellenschritt zurückzukehren. Die Klappe der Bildgebungskammer wird geöffnet.</li> <li>Nehmen Sie die Fließzelle heraus und setzen Sie sie erneut ein, um sicherzustellen, dass sie korrekt positioniert ist.</li> </ul>
Reagenzienzugabe	Empfohlene Maßnahme
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 leer)	Leeren Sie den Behälter für verbrauchte Reagenzien und laden Sie den leeren Behälter neu.

## Tests für Array-Scans

Systemprüfungen	Empfohlene Maßnahme
Doors closed (Klappen geschlossen)	Stellen Sie sicher, dass die Kammerklappen 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 <b>Back</b> (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 Netzwerkserver ist voll.

Bildgebungssystem	Empfohlene Maßnahme
Imaging limits (Bildgebungsbeschränkungen)	Wenden Sie sich an den technischen Support von Illumina.
Z Steps-and-Settle (z-Tisch – Schritt und Positionierung)	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 der automatischen Nachwaschung 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

Wenn die während der ersten Zyklen generierten Kennzahlen eine Intensität von unter 2.500 aufweisen, ist möglicherweise ein Rehybridisierungslauf erforderlich. Bestimmte Bibliotheken mit geringer Varianz können Intensitäten von unter 1.000 aufweisen. Dies ist normal und lässt sich nicht durch eine Rehybridisierung beheben.

**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 die automatische Nachwaschung.

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 -Pufferkartusche 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 Waschlaufs

- 1 Wählen Sie im Startbildschirm **Perform Wash** (Waschlauf durchführen).
- 2 Wählen Sie auf dem Bildschirm „Wash Selection“ (Waschlaufauswahl) die Option **Manual Post-Run Wash** (Manuelle Nachwaschung). Siehe *Durchführen eines manuellen Waschlaufs auf Seite 35*.

**HINWEIS** Wenn die für den angehaltenen Lauf verwendeten Reagenzien- und Pufferkartuschen noch nicht entfernt wurden, können diese für den manuellen Waschlauf verwendet werden. Führen Sie den manuellen Waschlauf anderenfalls mit der Reagenzien- und der Pufferkartusche 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.

**SPITZE** 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 Pufferkartusche und eine neue Reagenzienkartusche ein.

- 6 Wählen Sie im Laufkonfigurationsbildschirm eine der folgenden Konfigurationsoptionen:
  - ▶ **BaseSpace or BaseSpace Onsite** (BaseSpace oder BaseSpace Onsite): Wählen Sie den Lauf und bestätigen Sie die Laufparameter.
  - ▶ **Standalone** (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:

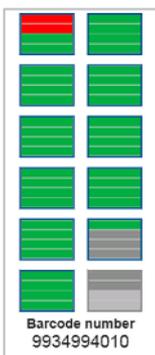
- ▶ Wählen Sie **Rescan** (Erneut scannen). Die Software versucht erneut, den Barcode einzulesen.
- ▶ Wählen Sie das Textfeld und geben Sie die Barcodenummer (wie im Bild angezeigt) ein. Je nach BeadChip kann die Barcodenummer bis zu 12 Ziffern enthalten. Wählen Sie **Save** (Speichern). Das Barcodebild wird im Ausgabeordner gespeichert.
- ▶ Wählen Sie **Cancel** (Abbrechen). Die Klappe 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 fehlgeschlagen 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-Überlappung die Proben mit fehlerhaften Abschnitten erneut.
- ▶ Generiert Ausgabedateien im ursprünglichen Ausgabeordner.
- ▶ Überschreibt für fehlerhafte Abschnitte vorhandene 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:
  - ▶ Scannt den gesamten BeadChip.
  - ▶ Generiert Ausgabe Dateien 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](http://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 auf dem 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 Rezepte und Rezeptordner

Ändern Sie nicht die Originalrezepte. Erstellen Sie immer eine Kopie der Originalrezepte unter einem neuen Namen. Wenn ein Originalrezept geändert wurde, kann der Software-Updater das Rezept für künftige Updates nicht erkennen und neuere Versionen werden nicht installiert.

Speichern Sie anwendungsspezifische Rezepte im entsprechenden Rezeptordner. Rezeptordner haben die folgende Ordnerstruktur:

### Custom

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

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

 **High**: Originalrezepte, die mit einem Hochleistungskit verwendet werden.

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

 **Wash**: Enthält das Rezept für den manuellen Waschlauf.

## 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. Normalerweise muss die Festplatte ausgetauscht werden.

Die Laufkonfiguration und der normale Betrieb sind weiterhin möglich. Die Fehlermeldung soll eine frühzeitige Planung von Servicemaßnahmen ermöglichen, um Unterbrechungen im normalen Betrieb des Geräts zu vermeiden. Die RAID-Warnung kann nur von einem Administrator bestätigt werden. Wenn Sie Ihr Gerät mit nur einer Festplatte betreiben, kann dies zu Datenverlust führen.

## 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.

## Einrichten der Netzwerkkonfiguration

- 1 Wählen Sie auf dem Bildschirm „Manage Instrument“ (Gerät verwalten) die Option **System Configuration** (Systemkonfiguration).
- 2 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.
- 3 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.
- 4 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.

- 5 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.
- 6 Wählen Sie **Save** (Speichern).

## Einrichten der Analysekonfiguration

- 1 Wählen Sie auf dem 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 Illumina 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 or BaseSpace Onsite“ (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 **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Geräteleistungsdaten an Illumina senden) (Gerätestatusdaten an Illumina senden), um den Überwachungsdienst 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 Leistungsdaten des Geräts an Illumina gesendet. Diese Daten helfen Illumina bei der Ermittlung und Behebung von Fehlern, was die Durchführung proaktiver Wartungsarbeiten ermöglicht und die Geräteverfügbarkeit maximiert. Weitere Informationen zu den Vorteilen dieses Dienstes finden Sie im *technischen Hinweis zu Illumina Proactive (Dokument-Nr. 1000000052503)*.
- Dieser Dienst:
- ▶ Sendet keine Sequenzierungsdaten.
  - ▶ Erfordert, dass das Gerät mit einem Netzwerk mit Internetzugang verbunden ist.
  - ▶ Ist standardmäßig deaktiviert. Wenn Sie den Dienst einschalten möchten, aktivieren Sie die Einstellung **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Geräteleistungsdaten an Illumina senden).
- 6 Wählen Sie **Save** (Speichern).

## BeadChip-Scan-Konfiguration

- 1 Wählen Sie auf dem 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. Der 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 auf dem Bildschirm „Scan Map“ (Scan-Übersicht) für jeden BeadChip-Typ den vollständigen Dateipfad zur entsprechenden Manifest- und Clusterdatei an. Wählen Sie für jeden Dateityp **Browse** (Durchsuchen) 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 Real-Time Analysis

Überblick über Real-Time Analysis .....	55
Real-Time Analysis-Workflow .....	56

## Überblick über Real-Time Analysis

Das NextSeq 550Dx-Gerät nutzt RTA2, eine Implementierung der 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 Betriebssoftware kommunizieren über ein HTTP-Webinterface und gemeinsame Speicherbereiche. Wenn RTA2 beendet wird, wird die Verarbeitung nicht wieder aufgenommen und die Laufdaten werden nicht gespeichert.

## RTA2-Eingabedaten

RTA 2 benötigt für die Verarbeitung Folgendes:

- ▶ Die im lokalen Speicher des Systems gespeicherten Plattenbilder.
- ▶ Die Datei `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 Betriebssoftware, die über den Speicherort von `RunInfo.xml` und darüber informieren, ob ein optionaler Ausgabeordner angegeben wurde.

## RTA2-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.

RTA2 liefert Echtzeitkennzahlen zur Laufqualität, die in InterOp-Dateien gespeichert werden. InterOp-Dateien sind binäre Ausgabedateien mit Kennzahlen zu Platten, Zyklen und zur Read-Ebene.

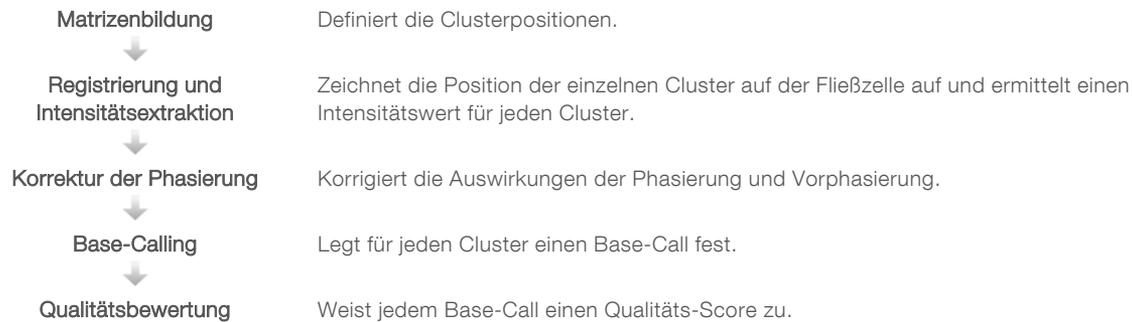
## Fehlerbehebung

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.
- ▶ \*LaneNLog\*.tsv listet die Verarbeitungsereignisse pro Lane auf.
- ▶ \*Error\*.tsv protokolliert während des Laufs aufgetretene Fehler.
- ▶ \*WarningLog\*.tsv führt während des Laufs aufgetretene Warnungen auf.

## Real-Time Analysis-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 RTA2 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 die 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.

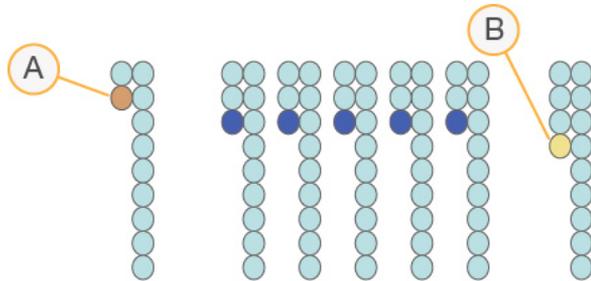
Wenn die Registrierung für ein Bild in einem Zyklus fehlschlägt, werden für diese Platte in diesem Zyklus keine Base-Calls erzeugt.

## 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 vorausseilt.

**Abbildung 29** Phasierung und Vorphasierung



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

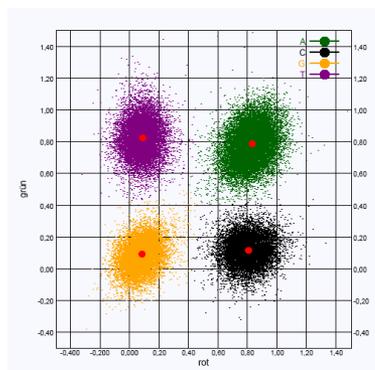
RTA 2 korrigiert die Auswirkungen der Phasierung und der Vorphasierung, sodass bei jedem Zyklus des Laufs eine maximale Datenqualität erzielt wird.

## 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 (PF), wenn nicht mehr als ein Base-Call in den ersten 25 Zyklen eine Reinheit  $< 0,63$  aufweist. Für Cluster, die die Filter nicht passieren, erfolgt kein Base-Call.

## Hinweise zur Indizierung

Das Base-Calling-Verfahren für Index-Reads unterscheidet sich von dem für andere Reads.

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)
<b>Q20</b>	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 .....	61
Ordnerstruktur der Ausgabedaten .....	64
Scan-Ausgabedateien .....	65
Ordnerstruktur der ausgegebenen Scan-Daten .....	65

## 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	Binäre Berichtsdateien. 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

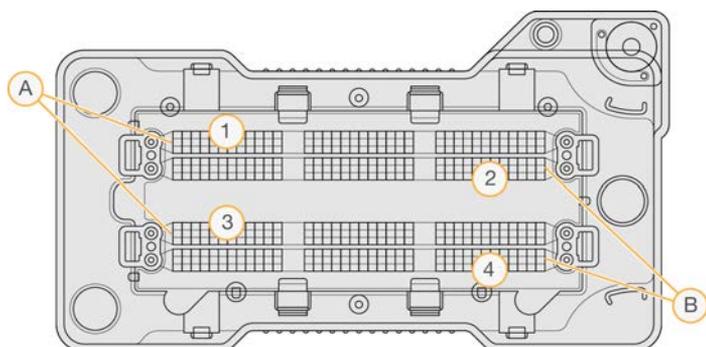
Platten sind kleine Bildgebungsbereiche auf der Fließzelle, die von der Kamera als das Bildfeld betrachtet werden. Die Gesamtzahl der Platten hängt von der Anzahl der Lanes, Bildstreifen und Oberflächen ab, die auf der Fließzelle aufgenommen werden, und davon, wie die Kameras beim Erfassen der Bilder 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 ergibt sich aus Lanes × Oberflächen × Bildstreifen × Kamerasegmente × Platten pro Bildstreifen pro Segment.

## Lane-Nummerierung

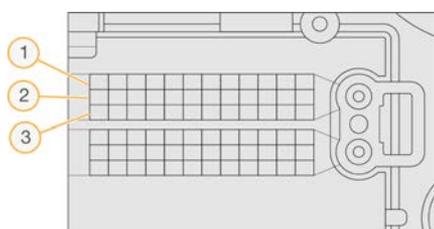
Die Lanes 1 und 3 (Lane-Paar A) werden gleichzeitig aufgenommen. Die Lanes 2 und 4 (Lane-Paar B) werden aufgenommen, sobald Lane-Paar A aufgenommen wurde.

**Abbildung 31** Lane-Nummerierung

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

## Bildstreifennummerierung

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

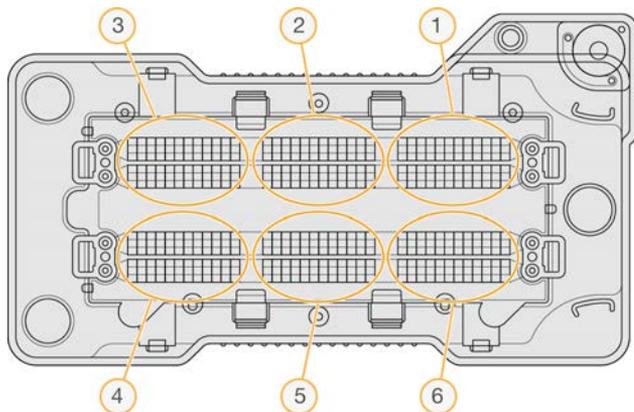
**Abbildung 32** Bildstreifennummerierung

## Kameranummerierung

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

Die Kameras sind von 1 bis 6 nummeriert. 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.

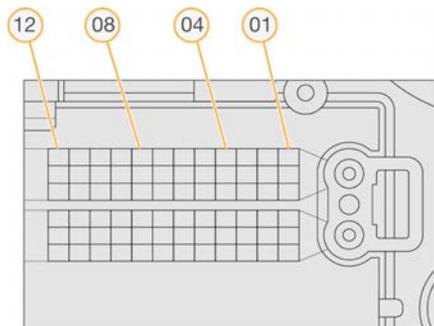
**Abbildung 33** Kamera- und Segmentnummerierung (Hochleistungsfließzelle abgebildet)



## 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 61](#).

## Ordnerstruktur der Ausgabedaten

Die Betriebssoftware 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.

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

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

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

📄 RTAComplete.txt

📄 RTAConfiguration.xml

📄 RunInfo.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. <b>[Barcode]_[Probe].gtc</b>
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). <b>[Barcode]_[Probe]_[Abschnitt]_[Bildstreifen]_[Kamera]_[Platte]_[Kanal].jpg</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Barcode:</b> Der Dateiname beginnt mit dem BeadChip-Barcode.</li> <li>• <b>Probe:</b> Ein Bereich des BeadChips, der als Reihe (R0X), von oben bis unten, und Spalte (C0X), von links nach rechts, nummeriert ist.</li> <li>• <b>Abschnitt:</b> Eine nummerierte Zeile innerhalb einer Probe.</li> <li>• <b>Bildstreifen:</b> BeadChips werden als eine Sammlung überlappender Platten abgebildet. Daher wird nur ein Bildstreifen zum Abbilden des Abschnitts verwendet.</li> <li>• <b>Kamera:</b> Die zum Erstellen des Bilds verwendete Kamera.</li> <li>• <b>Platte:</b> Ein von der Kamera als Sichtfeld definierter Bildgebungsbereich.</li> <li>• <b>Kanal:</b> Ein Kanal ist entweder rot oder grün.</li> </ul>

## Ordnerstruktur der ausgegebenen Scan-Daten

<ul style="list-style-type: none"> <li>📁 [Datum]_[Gerätename]_[Scan-Nr.]_[Barcode] <ul style="list-style-type: none"> <li>📁 [Barcode] <ul style="list-style-type: none"> <li>📁 Config <ul style="list-style-type: none"> <li>📄 Effective.cfg: Zeichnet die während des Scan-Vorgangs verwendeten Konfigurationseinstellungen auf.</li> </ul> </li> <li>📁 Focus: Enthält Bilddateien, die zum Fokussieren des Scans verwendet werden.</li> <li>📁 Logs: Enthält Protokolldateien, in denen die einzelnen Schritte des Scan-Vorgangs protokolliert wurden.</li> <li>📁 PreScanDiagnosticFiles <ul style="list-style-type: none"> <li>📁 [Datum_Uhrzeit] Barcode Scan <ul style="list-style-type: none"> <li>📄 ProcessedBarcode.jpg: Bild des BeadChip-Barcodes.</li> <li>📄 Scanning Diagnostics (Protokolldateien)</li> <li>📄 PreScanChecks.csv: Zeichnet die Ergebnisse der automatischen Prüfung auf.</li> </ul> </li> </ul> </li> <li>📄 GTC-Dateien: Genotypaufrufdateien (eine Datei pro Probe).</li> <li>📄 IDAT-Dateien: [Optional] Intensitätsdatendateien (zwei Dateien pro Probe; eine Datei pro Kanal).</li> <li>📄 Bilddateien: Scan-Bilder für jede Probe, jeden Abschnitt, jeden Bildstreifen, jede Kamera, jede Platte und jeden Kanal.</li> <li>📄 [Barcode]_sample_metrics.csv</li> <li>📄 [Barcode]_section_metrics.csv</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
--

📄 ScanParameters.xml



# Index

## A

- Adapter
  - BeadChip-Ausrichtung 29
  - BeadChip Laden 31
  - Überblick 5
- Analyse
  - Ausgabedateien 61
- Analyse, primär
  - Signalreinheit 58
- Audio 10
- Ausgabedateien 61
- Ausgabedateien, Scannen
  - GTC, IDAT 65
- Ausgabedateien, Sequenzierung 61
- Ausschalten des Geräts 41

## B

- Base-Call-Dateien 61
- Base-Calling 57
  - Indizierungshinweise 58
- BaseSpace 52
  - Anmeldung 16
- BaseSpace-Konfiguration 21
- BeadChip
  - Adapter 5, 29
  - Analyse 1
  - Barcode-Ausrichtung 29
  - Einlesen des Barcodes nicht möglich 49
  - Laden 31
  - Registrierungsfehler 49
  - Typen 1
- Benutzername und Kennwort 9
- Bildgebung, Zweikanal-Sequenzierung 57
- Bildgebungskammer 3
- Bildstreifennummerierung 62
- BlueFuse Multi-Software 1

## C

- Cluster nach Filterung 58
- Clusterbildung 13, 23
- Clusterspeicherort
  - Dateien 61
  - Matrizenbildung 56

## D

- Datenübertragung
  - allgemeiner Kopierdienst 24
  - Scannen von Daten 33
- Decode File Client 27
  - Zugriff nach BeadChip 29
  - Zugriff nach Konto 28
- DMAP-Ordner
  - Decode File Client 27
  - Herunterladen 28
- Dokumentation 1, 71

## E

- Eigenständige Konfiguration 22
- Ein/Aus-Taste 4, 9
- Eingabedateien, Scannen
  - Clusterdateien 27, 50
  - DMAP-Ordner 27
  - DMAP-Ordner, Herunterladen 28
  - Manifestdateien 27, 50
- Empirische Phasierung 57
- Entsorgen von Verbrauchsmaterialien 11
- Erweiterte Ladeoption 11

## F

- Fehler und Warnungen 4, 55
- Fehlerbehebung
  - Behälter für verbrauchte Reagenzien 46
  - Einlesen des BeadChip-Barcodes nicht möglich 49
  - Kennzahlen mit geringer Intensitätszahl 47
  - Laufspezifische Dateien 43
  - Manifest- und Clusterdateien ersetzen 50
  - Scan-Registrierungsfehler 49
  - Scanspezifische Dateien 44
  - Selbsttest 44
- Fehlerwahrscheinlichkeit 58
- Filterdateien 61
- Fließzelle
  - Ausrichtungsstifte 16
  - Bildgebung 63
  - Bildstreifennummer 62
  - Lane-Nummerierung 62
  - Lane-Paare 6
  - Platten 61

- Plattenummerierung 63
- Rehybridisierung 47
- Reinigen 15
- Überblick 6
- Verpackung 15
- Formamid, Position 6 20

## G

- Gerät
  - Ausschalten 41
  - Avatar 10
  - Ein/Aus-Taste 4
  - Konfigurationseinstellungen 51
  - Kurzname 10
  - Modusanzeigen 10
  - Neu starten 41
  - Neustart durchführen 41
  - Starten 9
- Gerät verwalten
  - Ausschalten 42
- Gerätewartung
  - Verbrauchsmaterialien 12
- Gerätewaschlauf 35
- GTC-Dateien 65

## H

- Hilfe
  - Dokumentation 1
- Hilfe, technische 71

## I

- Im Forschungsmodus neu starten 10
- Indizierungshinweise 58
- Intensitäten 57
- InterOp-Dateien 43, 61

## K

- Kameranummerierung 63
- Kennzahlen
  - Base-Calling 57
  - Clusterdichtezyklen 23
  - Intensitätszyklen 23
- Kompatibilität
  - Fließzelle, Reagenzienkartusche 5
  - RFID-Tracking 5, 7

- Komponenten
  - Bildgebungskammer 3
  - Pufferkammer 3
  - Reagenzienkammer 3
  - Statusleiste 3
- Konfiguration 52
- Konfigurationseinstellungen 51
- Kundendienst 71

## L

- Lane-Nummerierung 62
- Lane-Paare 62
- Laufdauer 13-14
- Laufkennzahlen 23
- Laufkonfiguration, erweiterte Option 11
- Laufparameter
  - BaseSpace-Modus 21
  - Eigenständiger Modus 22
  - Parameter bearbeiten 21
- locs-Dateien 61
- Luftfilter 3, 38

## M

- Matrizenbildung 56

## N

- Nach Filterung (Passing Filter, PF) 58
- Nachwaschung 25
- Natriumhypochlorit, Waschlauf 36
- Netzschalter 9
- Neustart 41
  - Gerät 41

## O

- Online-Schulungen 1
- Ordnerspeicherort 22

## P

- Phasierung, Vorphasierung 57
- Phred-Algorithmus 58
- Plattenummerierung 63
- Präventive Wartung 35
- Primer-Rehybridisierung 47
- Pufferkammer 3
- Pufferkartusche 8, 19

## Q

Q-Scores 58

## R

RAID-Fehlermeldung 51  
 Read-Länge 13-14  
 Reagenzien  
     Im Kit 5  
     ordnungsgemäße Entsorgung 19  
 Reagenzienkammer 3  
 Reagenzienkartusche  
     Behälter in Position 28 36  
     Behälter in Position 6 20  
     Überblick 7  
 Real-Time Analysis-Software 4  
     Ergebnisse 61  
     Phasierung 57  
     Workflow 56  
 Rehybridisierung, Read 1 47  
 Reinheitsfilter 58  
 RFID-Tracking 5  
 Richtlinien für Wasser in Laborqualität 12  
 RunInfo.xml 43, 61  
 RUO-Modus 10

## S

Scan-Ausgabedateien  
     GTC, IDAT 65  
 Selbsttest 23, 32  
 Selbsttestfehler 44  
 Sequenzierung  
     Einleitung 13  
     Vom Benutzer bereitzustellende  
         Verbrauchsmaterialien 12  
 Sequenzierungsworkflow 14, 56  
 Software  
     Automatisch aktualisieren 40  
     Bildanalyse, Base-Calling 4  
     im Gerät 4  
     Initialisierung 9  
     Konfigurationseinstellungen 51  
     Laufdauer 13-14  
     Manuelles Update 40  
 Statusalarme 4  
 Statusleiste 3  
 Steuerungssoftware 4

Symbole

    Fehler und Warnungen 4  
     Status 4

Systembenutzername und -kennwort 9  
 Systemeinstellungen 10

## T

Tastatur 10  
 Technische Unterstützung 71

## U

Überwachungsdienst Illumina Proactive 52  
 Universal Copy Service (allgemeiner  
     Kopierdienst) 24  
 Update der Software 39

## V

Verbrauchsmaterialien 5  
     Fließzelle 6  
     Gerätewartung 12  
     Pufferkartusche 8  
     Reagenzienkartusche 7  
     Sequenzierungsläufe 12  
     Waschlauf-Verbrauchsmaterialien 35-36  
     Wasser in Laborqualität 12  
 Verbrauchte Reagenzien  
     Behälter voll 46  
     Entsorgung 18, 37  
 Verwalten des Geräts  
     Ausschalten 41  
 Vom Benutzer bereitzustellende  
     Verbrauchsmaterialien 12

## W

Wartung, präventive 35  
 Waschlauf  
     Automatisch 25  
     Manueller Waschlauf 35  
     Vom Benutzer bereitzustellende  
         Verbrauchsmaterialien 35  
     Waschlaufkomponenten 35  
 Windows  
     Beenden 42  
 Workflow  
     BaseSpace-Anmeldung 16  
     BaseSpace-Modus 21

BeadChip 31  
Eigenständiger Modus 22  
Erweiterte Ladeoption 11  
Fließzelle 16  
Fließzelle vorbereiten 15  
Indizierungshinweise 58  
Laufdauer 13-14  
Laufkennzahlen 23  
Natriumhypochlorit 36  
Pufferkartusche 19  
Reagenzienkartusche 19  
Selbsttest 23, 32  
Sequenzierung 56  
Überblick 14, 28  
Verbrauchte Reagenzien 18

## Z

Zyklen in einem Read 13

# Technische Unterstützung

Wenn Sie technische Unterstützung benötigen, wenden Sie sich bitte an den technischen Support von Illumina.

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

## Telefonnummern des Illumina-Kundendiensts

Region	Gebührenfrei	Regional
Nordamerika	+1.800.809.4566	
Andere Länder	+44.1799.534000	
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, China	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
Südkorea	+82 80 234 5300	
Taiwan, China	00806651752	

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

Die Produktdokumentation steht unter [support.illumina.com](http://support.illumina.com) zum Herunterladen zur Verfügung.





Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Kalifornien 92122, USA

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (außerhalb von Nordamerika)

[techsupport@illumina.com](mailto:techsupport@illumina.com)

[www.illumina.com](http://www.illumina.com)

**Nur für Forschungszwecke.  
Nicht zur Verwendung in Diagnoseverfahren.**

© 2021 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten.

**illumina®**