

# NextSeq 1000 a 2000

Příručka sekvenačního systému

Tento dokument a jeho obsah je vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. a jejích přidružených společností (dále jen „Illumina“). Slouží výlučně zákazníkovi ke smluvním účelům v souvislosti s použitím zde popsaných produktů a k žádnému jinému účelu. Tento dokument a jeho obsah nesmí být používán ani šířen za žádným jiným účelem ani jinak sdělován, zveřejňován či rozmnožován bez předchozího písemného souhlasu společnosti Illumina. Společnost Illumina nepředává tímto dokumentem žádnou licenci na svůj patent, ochrannou známku, autorské právo či práva na základě zvykového práva ani žádná podobná práva třetích stran.

Pokyny v tomto dokumentu musí být důsledně a výslovně dodržovány kvalifikovaným a řádně proškoleným personálem, aby bylo zajištěno správné a bezpečné používání zde popsaných produktů. Veškerý obsah tohoto dokumentu musíte před použitím takových produktů beze zbytku přečíst a pochopit.

**NEDODRŽENÍ POŽADAVKU NA PŘEČTENÍ CELÉHO TEXTU A NA DŮSLEDNÉ DODRŽOVÁNÍ ZDE UVEDENÝCH POKYNŮ MŮŽE VÉST K POŠKOZENÍ PRODUKTŮ, PORANĚNÍ OSOB, AŽ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A POVEDE KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.**

**SPOLEČNOST ILLUMINA NA SEBE NEBERE ŽÁDNOU ODPOVĚDNOST VYPLÝVAJÍCÍ Z NESPRÁVNÉHO POUŽITÍ ZDE POPSANÝCH PRODUKTŮ (VČETNĚ DÍLŮ TĚCHTO PRODUKTŮ NEBO SOFTWARE).**

© 2021 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím společnosti Illumina, Inc. nebo jejích příslušných vlastníků. Informace o konkrétních ochranných známkách naleznete na adrese [www.illumina.com/company/legal.html](http://www.illumina.com/company/legal.html).

# Historie revizí

Dokument č.	Datum	Popis změny
1000000109376 v04	Duben 2021	Byly přidány pokyny pro import souborů s definicí základní úrovně. Byl přidán pracovní postup analýzy DRAGEN DNA Amplicon. Byly přidány funkce řídicího softwaru NextSeq 1000/2000 verze 1.3. Byly přidány informace o výběru proxy serveru. Byla aktualizována přepravní a skladovací teplota resuspenzačního pufu (RSB) s roztokem Tween 20. Byl aktualizován pracovní postup DRAGEN RNA, aby zahrnoval diferenciální expresi genů. Byla aktualizována struktura výstupní složky sekvenování. Byla aktualizována doporučení pro formátování seznamu vzorků verze 2.
1000000109376 v03	Listopad 2020	Byla opravena katalogová čísla. Byly přidány informace o přidávání nových uživatelů.

Dokument č.	Datum	Popis změny
1000000109376 v02	Říjen 2020	<p>Byla přidána sada reagensů NextSeq 1000/2000 P3.</p> <p>Byl přidán pracovní postup analýzy DRAGEN Single Cell RNA.</p> <p>Byl přidán pracovní postup analýzy DRAGEN Enrichment.</p> <p>Byly přidány možnosti komprese souborů FASTQ.</p> <p>Byly přidány pokyny pro instalaci aktualizací plánů a licence softwaru DRAGEN.</p> <p>Byly přidány pokyny pro import vlastních referenčních genomů.</p> <p>Byly aktualizovány objemy a koncentrace pro vložení pro jednotlivé typy knihoven.</p> <p>Byly aktualizovány pokyny k ředění.</p> <p>Byly přidány pokyny pro automatické čištění kazety s reagensy.</p> <p>Byly aktualizovány informace o podporovaném počtu cyklů.</p> <p>Byly aktualizovány možnosti přizpůsobení přístroje.</p> <p>Byly aktualizovány pokyny k nastavení běhu přístroje.</p> <p>Byla aktualizována struktura výstupu sekvenování DRAGEN.</p> <p>Byly přidány informace o výkazech kontroly kvality DRAGEN.</p> <p>Byly přidány informace o odstranění vlastních referenčních genomů z pevného disku.</p> <p>Byly přidány informace o provádění kontrol systému.</p> <p>Byla aktualizována nastavení seznamu vzorků verze 2.</p>

Dokument č.	Datum	Popis změny
1000000109376 v01	Červen 2020	<p>Byl aktualizován popis řídicího softwaru NextSeq 1000/2000.</p> <p>Napříč příručkou byl vysvětlen rozdíl mezi cloudovým, hybridním, místním a samostatným režimem.</p> <p>Byly aktualizovány pokyny ke skladování a rozmrazování kazet.</p> <p>Byly aktualizovány informace o podporovaném počtu cyklů.</p> <p>Byly aktualizovány pokyny pro nastavení sekundární analýzy.</p> <p>Byla aktualizována katalogová čísla sad reagentů.</p> <p>Byl aktualizován diagram protokolu sekvenování.</p> <p>Byly aktualizovány pokyny pro zadání síťového disku jako výchozí výstupní složky.</p> <p>Byla aktualizována tabulka podporovaných typů knihoven.</p> <p>Byly přidány pokyny pro import vlastního referenčního genomu.</p> <p>Byly přidány pokyny pro nastavení běhu pomocí vlastní indexační sady a uživatelské sady na přípravu knihoven.</p> <p>Byly aktualizovány požadavky na uživatelský účet a heslo.</p> <p>Byly přidány podrobnosti o struktuře výstupní složky DRAGEN.</p> <p>Byly vysvětleny pokyny k vypuštění použitých reagentů z kazety.</p> <p>Byly přidány základní informace o tabulce kvality.</p> <p>Byly aktualizovány pokyny pro instalaci aktualizací řídicího softwaru.</p> <p>Byly přidány pokyny k opětovnému zařazení běhu.</p>

<b>Dokument č.</b>	<b>Datum</b>	<b>Popis změny</b>
1000000109376 v01	Červen 2020	Byly přidány pokyny pro aktualizaci plánů a licence softwaru DRAGEN. Byly aktualizovány pokyny pro přizpůsobení přístroje. Byly aktualizovány obrázky tak, aby odrážely nové štítky. Napříč příručkou byl změněn pojem „dvířka“ na „štít“. Byl přidán popis dvou ethernetových portů.
1000000109376 v00	Březen 2020	První vydání.

# Obsah

Přehled systému .....	1
Další zdroje .....	1
Hardware přístroje .....	3
Vestavěný software .....	5
Řízení procesu .....	6
Diagram protokolu sekvenování .....	8
Jak funguje sekvenování .....	8
Konfigurace systému .....	11
Požadavky na uživatelský účet .....	11
Konfigurace prostředí BaseSpace Sequence Hub a služby Proactive Support .....	13
Zadání umístění výchozí výstupní složky .....	15
Import vlastních referenčních genomů .....	18
Import souborů s definicí základní úrovně šumu .....	18
Konfigurace režimu běhu .....	20
Přizpůsobení přístroje .....	21
Spotřební materiál a vybavení .....	23
Spotřební materiál pro sekvenování .....	23
Pomocný spotřební materiál .....	26
Pomocné vybavení .....	28
Protokol .....	30
Důležité okolnosti sekvenování .....	30
Naplánování běhu sekvenování v prostředí BaseSpace Sequence Hub .....	31
Rozmrazení zabalené kazety a průtokové kyvety .....	40
Ředění knihoven .....	42
Vložení spotřebního materiálu do kazety .....	44
Spuštění běhu sekvenování .....	46
Výstupní data sekvenování .....	55
Přehled softwaru Real-Time Analysis .....	55
Pracovní postup softwaru Real-Time Analysis .....	57
Výstupní soubory sekvenování .....	61
Výstupní soubory sekundární analýzy DRAGEN .....	62
Struktura výstupní složky sekundární analýzy DRAGEN .....	71
Údržba .....	74
Uvolnění místa na pevném disku .....	74
Aktualizace softwaru .....	74
Aktualizace pracovních postupů a licence DRAGEN .....	76

Výměna vzduchového filtru .....	78
Řešení problémů .....	80
Řešení chybových zpráv .....	80
Vrácení spotřebního materiálu do skladovacího prostoru .....	81
Zrušení běhu .....	81
Opětovné zařazení běhu .....	82
Vypnutí a zapnutí přístroje .....	82
Provedení kontroly systému .....	83
Obnovení do továrního nastavení .....	84
Vytvoření bitové kopie instalace .....	84
Obnovení uložené bitové kopie .....	84
Literatura .....	86
Nastavení seznamu vzorků verze 2 .....	86
Sekvenování v režimu tmy .....	100
Rejstřík .....	102
<b>Technická pomoc .....</b>	<b>106</b>



# Přehled systému

Sekvenační systém Illumina® NextSeq™ 1000 a Illumina® NextSeq™ 2000 zajišťuje cílený přístup k sekvenování nové generace (NGS)<sup>1</sup>. Tento systém založený na aplikacích dodává sekvenační technologii Illumina v cenově dostupném stolním přístroji. Nabízí tyto funkce:

- **Jednoduché ovládání a spolehlivost.** Systém NextSeq 1000/2000 je vybaven místní analýzou DRAGEN a denaturací a ředěním v přístroji. Zobrazovací modul je součástí systému a průtočné součásti jsou vestavěny ve spotřebním materiálu. To usnadňuje údržbu přístroje.
- **Vkládání spotřebního materiálu v jednom kroku.** Všechny reagensy nezbytné pro běh jsou vloženy v kazetě na jedno použití. Knihovna a průtoková kyveta se vkládají přímo do kazety, která se následně vloží do přístroje. Integrované identifikační prvky umožňují přesné sledování.
- **Software systému NextSeq 1000/2000.** Sada integrovaného softwaru řídí provoz přístroje; zpracovává obrazy a generuje přiřazení báze.
  - **Cloud mode** (Cloudový režim). Umožňuje naplánovat běh pomocí možnosti Instrument Run Setup (Nastavení běhu přístroje) v prostředí BaseSpace Sequence Hub. Vybraný pracovní postup analýzy je spuštěn automaticky v cloudu. Data běhu a výsledky analýzy jsou také poskytnuty v cloudu.
  - **Hybrid mode** (Hybridní režim). Umožňuje naplánovat běh pomocí možnosti Instrument Run Setup (Nastavení běhu přístroje) v prostředí BaseSpace Sequence Hub. Vybraný pracovní postup analýzy je následně spuštěn prostřednictvím analýzy DRAGEN v přístroji.
  - **Local mode** (Místní režim). Umožňuje naplánovat běh místně, pomocí souboru ve formátu seznamu vzorků verze 2. Vybraný pracovní postup analýzy je spuštěn automaticky prostřednictvím analýzy DRAGEN v přístroji.
  - **Standalone mode** (Samostatný režim). Umožňuje naplánovat běh pomocí seznamu vzorků.

V této části je uveden přehled systému včetně informací o hardwaru, softwaru a analýze dat. Shrnuje také základní koncepce a termíny používané v dokumentaci. Podrobné specifikace, technické listy, aplikace a související produkty naleznete na [stránce produktů sekvenačních systémů NextSeq 1000 a NextSeq 2000](#) na webu Illumina.

## Další zdroje

Další zdroje k systému najdete na [stránkách podpory sekvenačních systémů NextSeq 1000 a NextSeq 2000](#) na webu společnosti Illumina. Mezi tyto zdroje patří software, školení, kompatibilní produkty a příslušná dokumentace. Stránky podpory pravidelně kontrolujte, naleznete na nich vždy nejnovější verze.

---

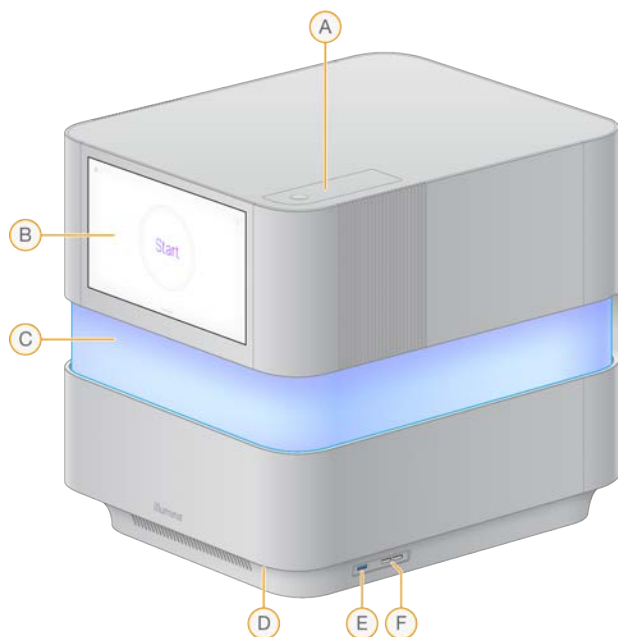
<sup>1</sup>sekvenování nové generace

Zdroj	Popis
<a href="#">Custom Protocol Selector</a> (Selektor vlastního protokolu)	Nástroj ke generování ucelených pokynů navržený pro vaši metodu přípravy knihovny, parametry běhu a analytickou metodu s možnostmi úprav úrovně podrobností.
<i>Příručka bezpečnosti a souladu s předpisy pro sekvenační systémy NextSeq 1000 a NextSeq 2000 (č. dokumentu 1000000111928)</i>	Obsahuje informace o tom, na co je třeba dbát z hlediska bezpečnosti provozu, prohlášení o souladu s předpisy a označení přístroje.
<i>Příručka souladu s předpisy pro modul čtečky RFID (dokument č. 1000000002699)</i>	Obsahuje informace o čtečce RFID v přístroji, certifikace souladu s předpisy a informace o bezpečnosti.
<i>Příručka pro denaturaci a ředění pro systémy NextSeq 1000 a 2000 (dokument č. 1000000139235)</i>	Obsahuje pokyny k ruční denaturaci a ředění knihoven připravených pro běh sekvenování a k přípravě volitelné kontroly PhiX.
<i>Příručka pro vlastní primery systémů NextSeq 1000 a 2000 (dokument č. 10000000139569)</i>	Obsahuje informace o výměně sekvenačních primerů Illumina za vlastní sekvenační primery.
<i>Příručka pro přípravu pracoviště sekvenačního systému NextSeq 2000 (dokument č. 1000000109378)</i>	Obsahuje specifikace laboratorního prostoru, požadavky na elektrické připojení a poznámky k prostředí a síti.
<i>Nápověda k softwaru BaseSpace</i> ( <a href="http://help.basespace.illumina.com">help.basespace.illumina.com</a> )	Obsahuje informace o používání systému BaseSpace™ a dostupných možnostech analýzy.
<i>Příručka pro sdružování indexových adaptérů do fondů (dokument č. 1000000041074)</i>	Obsahuje pokyny pro sdružování do fondů a strategie dvojitého indexování.
<i>Sekvence adaptéru Illumina (dokument č. 1000000002694)</i>	Obsahuje seznamy sekvencí adaptérů pro sady pro přípravu knihoven Illumina.

## Hardware přístroje

Sekvenační systémy NextSeq 1000 a NextSeq 2000 se skládají z vypínače, monitoru, stavového proužku, přihrádky na spotřební materiál a portů USB.

Obrázek 1 Vnější součásti systému



- A. **Přihrádka na vzduchový filtr:** Poskytuje přístup k výměnnému vzduchovému filtru.
- B. **Dotyková obrazovka:** Umožňuje nastavení a konfiguraci přístroje pomocí rozhraní řídicího softwaru.
- C. **Stavový proužek:** Barva světelného proužku se mění podle průběhu pracovního postupu. Modrá a purpurová barva značí interaktivní činnosti (např. kontroly před během) a vícebarevné osvětlení značí důležité mezníky a data (např. dokončení sekvenování). Kritické chyby jsou signalizovány červeným světlem.
- D. **Vypínač:** Zapíná a vypíná přístroj a signalizuje, zda je přístroj zapnutý (svítí), vypnutý (nesvítí) nebo vypnutý pod napětím (bliká).
- E. **Port USB 3.0:** Slouží k připojení externího přenosného disku za účelem přenosu dat.
- F. **Porty USB 2.0:** Slouží k připojení myši a klávesnice.

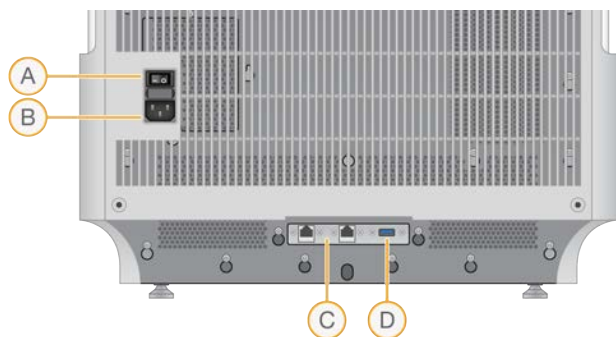
### Připojení napájení a příslušenství

Chcete-li získat přístup k vypínači, portu USB a konektorům pro příslušenství na zadní straně přístroje, můžete přístroj opatrně posunout.

Na zadní straně přístroje je přepínač a vstupní přívod. Tyto součásti zajišťují napájení přístroje. Dále jsou zde dva ethernetové porty pro volitelné připojení k Ethernetu. Port USB 3.0 umožňuje připojit přenosný disk pro přenos dat (na této platformě se systémem Linux není podporován souborový systém exFAT).

Sekvenační systémy NextSeq 1000 a NextSeq 2000 jsou vybaveny dvěma ethernetovými porty, které zlepšují funkčnost a flexibilitu systému. Jeden ethernetový port lze například vyhradit pro komunikaci s interním síťovým diskem. Druhý port lze vyhradit pro externí komunikaci, např. s prostředím BaseSpace Sequence Hub nebo službou Proactive Support.

Obrázek 2 Součásti zadního panelu

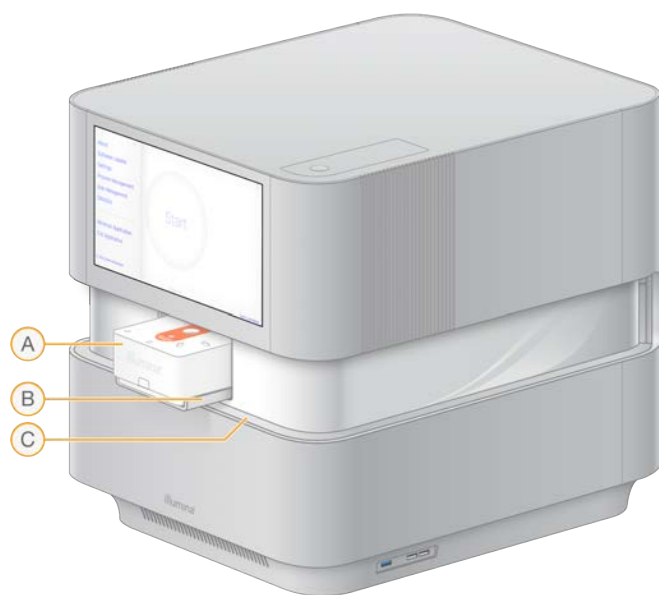


- A. **Přepínač:** Zapíná a vypíná napájení přístroje.
- B. **Konektor pro přívod napájení:** Slouží k připojení napájecího kabelu.
- C. **Ethernetové porty:** Volitelné připojení ethernetovým kabelem.
- D. **Port USB 3.0:** Slouží k připojení externího přenosného disku za účelem přenosu dat.

### Přihrádka na spotřební materiál

Přihrádka na spotřební materiál obsahuje kazetu pro běh sekvenování, jejíž součástí je průtoková kvyeta a zředěná knihovna.

Obrázek 3 Naplněná přihrádka na spotřební materiál



- A. **Kazeta:** Obsahuje průtokovou kyvetu, knihovnu a reagentie a shromažďuje použité reagentie v průběhu běhu sekvenování.
- B. **Přihrádka:** Drží kazetu během sekvenování.
- C. **Štít:** Jeho otevřením se zpřístupní přihrádka na spotřební materiál.

## Vestavěný software

Součástí sady softwaru systému jsou vestavěné aplikace, které provádějí běhy sekvenování a analýzu.

- **Řídicí software NextSeq 1000/2000:** Řídí činnost přístroje a poskytuje rozhraní pro konfiguraci systému, nastavení běhu sekvenování a sledování statistických informací o běhu v průběhu sekvenování.
- **Real-Time Analysis (RTA3):** Při běhu provádí analýzu obrazů a přiřazení báze. Další informace naleznete v části [Výstupní data sekvenování na straně 55](#).
- **Universal Copy Service:** Kopíruje výstupní soubory sekvenování ze složky běhu do prostředí BaseSpace Sequence Hub (v případě potřeby) a do výstupní složky, kde k nim máte přístup.

Řídicí software je interaktivní a spouští automatizované procesy na pozadí. Software Real-Time Analysis a služba Universal Copy Service spouští pouze procesy na pozadí.

### Systémové informace

Vyberte nabídku řídicího softwaru v levé horní části a přejděte k části About (O aplikaci). Část About (O aplikaci) obsahuje kontaktní údaje společnosti Illumina a následující informace o systému:

- Sériové číslo přístroje

- Název počítače
- Verze sady systému
- Verze operačního systému
- Celkový počet běhů

## Upozornění a výstrahy

Ikona upozornění se nachází v pravé horní části. V případě výskytu varování nebo chyby se vysune pravý panel a zobrazí upozornění. Kliknutím na ikonu můžete kdykoliv zobrazit seznam aktuálních nebo starších upozornění na varování a chyby.

- Varování vyžadují pozornost, ale nezastaví běh přístroje, takže není potřeba provádět žádnou akci, pouze je vzít na vědomí.
- Chyby vyžadují nápravnou akci, než bude možné spustit běh nebo pokračovat v běhu.

## Minimalizace řídicího softwaru

Minimalizováním řídicího softwaru získáte přístup k jiným aplikacím. Tuto možnost využijete například tehdy, pokud potřebujete vyhledat výstupní složku v průzkumníku souborů nebo vyhledat seznam vzorků.

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Minimize Application** (Minimalizovat aplikaci). Řídicí software se minimalizuje.
2. Chcete-li maximalizovat řídicí software, vyberte na panelu nástrojů možnost **NextSeq 1000/2000 Control Software** (Řídicí software NextSeq 1000/2000).

## Řízení procesu

Na stránce Process Management (Řízení procesu) jsou zobrazeny dočasné běhy, které jsou uloženy ve složce `/usr/local/illumina/runs`. Každý běh je označen datem, názvem a ID běhu. Ke každému běhu se také zobrazují informace, jako je stav běhu, sekundární analýza, výstupní složka a cloud. Pokud chcete zobrazit další informace, jako je pracovní postup, průměrné procento Q30, celkový počet čtení, které vyhoví filtru úspěšnosti (PF), a celková výtěžnost, vyberte běh. Pokud chcete odstranit běhy a uvolnit místo, postupujte podle části [Uvolnění místa na pevném disku na straně 74](#). Pokud chcete znovu zařadit analýzu v přístroji, postupujte podle části [Opětovné zařazení běhu na straně 82](#).

### Stav běhu

V této části je zobrazen stav běhu sekvenování:

- **In Progress** (Probíhá). Běh sekvenování probíhá.
- **Complete** (Dokončeno). Běh sekvenování je dokončen.

- **Stopped** (Zastaveno). Běh sekvenování byl zastaven.
- **Errored** (Chyba). Běh sekvenování zaznamenal chybu.

### Stav sekundární analýzy

V této části je zobrazena sekundární analýza DRAGEN v přístroji. Pokud se analýza provádí v prostředí BaseSpace Sequence Hub, zobrazí se zde N/A (Není k dispozici).

- **Not Started** (Nezahájeno). Analýza DRAGEN ještě nebyla spuštěna.
- **In Progress** (Probíhá). Analýza DRAGEN probíhá.
- **Stopped** (Zastaveno). Analýza DRAGEN byla zastavena.
- **Errored** (Chyba). Analýza DRAGEN zaznamenala chybu.
- **Complete** (Dokončeno). Analýza DRAGEN je dokončena.

### Stav výstupní složky

V této části je zobrazen stav souborů, které se kopírují do výstupní složky:

- **In Progress** (Probíhá). Soubory jsou kopírovány do výstupní složky.
- **Complete** (Dokončeno). Soubory byly úspěšně zkopírovány do výstupní složky.

### Stav cloudu (BaseSpace Sequence Hub)

V této části je zobrazen stav souborů, které se nahrávají do prostředí BaseSpace Sequence Hub prostřednictvím cloudu:

- **In Progress** (Probíhá). Řídicí software nahrává soubory do prostředí BaseSpace Sequence Hub.
- **Complete** (Dokončeno). Všechny soubory byly úspěšně nahrány do prostředí BaseSpace Sequence Hub.

### Řešení problému se stavem

- Pokud běh probíhá, zavřete obrazovku Process Management (Řízení procesu), počkejte přibližně pět minut a znovu ji otevřete.
- Pokud běh neprobíhá, vypněte a zapněte přístroj a znovu otevřete obrazovku Process Management (Řízení procesu). Viz část [Vypnutí a zapnutí přístroje na straně 82](#).

## Diagram protokolu sekvenování

Na následujícím diagramu je znázorněn protokol sekvenování využívající systém NextSeq 1000/2000.



## Jak funguje sekvenování

Sekvenování na sekvenačních systémech NextSeq 1000 a NextSeq 2000 se skládá z generování klastrů, sekvenování a analýzy. Každý z těchto kroků v rámci běhu sekvenování probíhá automaticky. V závislosti na konfiguraci systému se může po dokončení běhu provádět i další analýza mimo přístroj.

### Generování klastrů

Knihovna<sup>1</sup> se automaticky denaturuje do jednotlivých vláken a následně zředěná vstupuje do přístroje. Během generování klastrů se jednotlivé molekuly DNA vážou k povrchu průtokové kyvety a amplifikují se, až vytvoří klastry<sup>2</sup>. Generování klastrů trvá přibližně 4 hodiny.

<sup>1</sup>Vzorek DNA nebo RNA s připojeným adaptérem pro sekvenování. Metody přípravy se mohou lišit.

<sup>2</sup>Klonální skupina vláken DNA na průtokové kyvetě, která vytváří jedno sekvenační čtení. Každé vlákno DNA na průtokové kyvetě představuje základ šablony, která se amplifikuje, dokud nevznikne klastr ze stovek nebo tisíců kopií. Průtoková kyveta s 10 000 klastry například vytvoří 10 000 jednotlivých čtení nebo 20 000 čtení párových konců.



## Sekvenování

Klastry jsou snímány pomocí chemické analýzy založené na dvou kanálech, jednom zeleném a jednom modrém. Pomocí nich jsou data zakódována pro čtyři nukleotidy. Po dokončení snímání dlaždice průtokové kyvety začne snímání následující dlaždice. Tento proces se opakuje pro každý cyklus sekvenování (přibližně 5 minut na cyklus). Po analýze obrazu provede software Real-Time Analysis přiřazení báze<sup>1</sup>, filtrování a vyhodnocení kvality.<sup>2</sup>

## Primární analýza

Během provádění běhu řídicí software automaticky přemísťuje soubory přiřazení báze<sup>3</sup> (\*.cbcl) do zadané výstupní složky pro analýzu dat. Během sekvenování software pro analýzu v reálném čase (RTA3) provádí analýzu obrazů, přiřazování bází a demultiplexování<sup>4</sup>. Po dokončení sekvenování je zahájena sekundární analýza. Metoda sekundární analýzy dat závisí na konfiguraci použité aplikace a systému.

## Sekundární analýza

BaseSpace Sequence Hub je cloudové počítačové prostředí společnosti Illumina pro sledování běhů, analýzu a ukládání dat a spolupráci. Prostředí poskytuje aplikace DRAGEN a BaseSpace Sequence Hub, které pomáhají provádět běžné analytické metody sekvenování.

Po dokončení počáteční sekvenační analýzy provede software DRAGEN sekundární analýzu s použitím některého z dostupných plánů analýzy.

Pokud používáte cloudový nebo hybridní režim, software DRAGEN načte seznam vzorků, referenční genom a vstupní soubory běhu z nastavení běhu v prostředí BaseSpace Sequence Hub. V cloudovém režimu jsou data cBCL automaticky nahrána do prostředí BaseSpace Sequence Hub a prostředí BaseSpace Sequence Hub zahájí sekundární analýzu DRAGEN. V hybridním režimu je sekundární analýza DRAGEN prováděna v přístroji a výstupní soubory lze uložit ve vybrané složce nebo v cloudu.

Pokud používáte místní režim, software DRAGEN načte poskytnutý seznam vzorků, referenční genom a vstupní soubory běhu ze sekvenačních systémů NextSeq 1000 a NextSeq 2000. Sekundární analýza DRAGEN je provedena v přístroji a výstupní soubory jsou uloženy ve vybrané výstupní složce. Pokud je vybrána možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu), lze analýzu spustit také prostřednictvím aplikací BaseSpace Sequence Hub po dokončení sekvenování.

Pokud používáte samostatný režim, nastavte běh bez seznamu vzorků. Tento pracovní postup se doporučuje při provádění vlastních analýz vycházejících z dat cBCL.

---

<sup>1</sup>Určení báze (A, C, G nebo T) pro každý klastr dané dlaždice v konkrétním cyklu.

<sup>2</sup>Vypočítá sadu předpovědí pro jednotlivá přiřazení báze a potom hodnoty indicií použije k vyhledání skóre kvality.

<sup>3</sup>Obsahuje přiřazení báze a s ním spojené skóre kvality pro každý klastr každého cyklu sekvenování.

<sup>4</sup>Zpracování analýzy, při kterém se rozlišuje čtení pro každou knihovnu ve fondu.

- Další informace o prostředí BaseSpace Sequence Hub naleznete v [online nápovědě prostředí BaseSpace Sequence Hub](#).
- Další informace o softwaru DRAGEN naleznete na [stránce podpory platformy DRAGEN Bio-IT](#).
- Přehled všech aplikací naleznete na stránce [BaseSpace Apps](#) (Aplikace BaseSpace).

# Konfigurace systému

V této části jsou uvedeny pokyny k nastavení systému včetně popisu softwarových nastavení.

Tyto pokyny popisují především řídicí software a uvádějí některé informace o konfiguraci sítě a operačního systému.

**i** | Pokud v přístroji použijete prohlížeč Google Chrome, vyzve vás k odemčení správce přihlašovacích klíčů. Tuto výzvu můžete ignorovat a zavřít.

## Požadavky na uživatelský účet

Operační systém Linux má tři účty:

- root (supersprávce)
- ilmnadmin (správce)
- ilmnuser (uživatel)

Účet správce slouží pouze k instalaci aktualizací systému, například aktualizaci řídicího softwaru NextSeq 1000/2000, nebo jej mohou pracovníci IT použít pro připojení k trvalému síťovému disku.

Pro všechny ostatní funkce včetně sekvenování použijte uživatelský účet.

### Požadavky na heslo

Servisní technik provede změnu hesla pro všechny tři účty po dokončení instalace přístroje. Každé heslo pak aktualizujte jednou za 180 dní, až k tomu budete vyzváni.

Tabulka 1 Výchozí zásady pro hesla

Zásada	Nastavení
Enforce password history (Vynutit použití historie hesel)	Pamatováno pět předcházejících hesel
Lockout threshold (Limit zamknutí)	Deset neplatných pokusů o přihlášení
Minimum password length (Minimální délka hesla)	10 znaků
Minimum character variety (Minimální počet rozdílných druhů znaků)	Nejméně tři z těchto druhů: číslice, velké písmeno, malé písmeno a symbol

Zásada	Nastavení
Maximum repeating characters (Maximální počet opakujících se znaků)	Tři znaky
Password must meet complexity requirements (Heslo musí splňovat požadavky na složitost)	Zakázáno
Store passwords using reversible encryption (Ukládat hesla pomocí reverzibilního šifrování)	Zakázáno

## Přidání nového uživatele

1. Přihlaste se k účtu `ilmnadmin`.
2. Stiskněte vypínač a poté otevřete rozevírací nabídku účtu `ilmnadmin`.
3. Vyberte možnost **Account Settings** (Nastavení účtu).
4. Vyberte možnost **Unlock** (Odemknout) a zadejte heslo k účtu `ilmnadmin`.
5. Vyberte možnost **Add User** (Přidat uživatele).
6. Jako typ účtu vyberte možnost Standard (Standardní) a zadejte uživatelské jméno nového uživatele.
7. Vyberte možnost **Set password now** (Nastavit heslo) a zadejte heslo.
8. Vyberte možnost **Add** (Přidat).  
Nový uživatel bude přidán do seznamu uživatelů.
9. Následující postupem udělíte uživateli přístup k řídicímu softwaru NextSeq 1000/2000.
  - a. Otevřete terminál.
  - b. Zadejte následující příkaz:  

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <uživatelské jméno nového uživatele>
```
  - c. Pokud k tomu budete vyzváni, zadejte heslo k účtu `ilmnadmin`.
10. Chcete-li ověřit, zda byla uživatelská oprávnění nastavena správně, postupujte následovně.
  - a. Přihlaste se k novému uživatelskému účtu.
  - b. Přejděte k řídicímu softwaru NextSeq 1000/2000.
  - c. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).
  - d. Zkontrolujte, zda můžete v části Default Output Folder (Výchozí výstupní složka) vybrat a uložit cestu k výstupní složce.  
Pokud můžete bez chyb vybrat a uložit cestu k výstupní složce, jsou oprávnění nastavena správně.

## Obnovení hesla

V této části je popsán postup obnovení hesla k účtům `ilmnuser`, `ilmnadmin` nebo `root`. Zapomenuté heslo nelze obnovit. Obnovením hesla nelze obejít zablokování účtu v důsledku příliš velkého počtu neúspěšných pokusů o zadání hesla. Před obnovením hesla nebo pokusem o přihlášení musíte počkat 10 minut.

### Obnovení hesla k účtu `ilmnuser`

Heslo k účtu `ilmnuser` můžete obnovit, pokud znáte heslo k účtu `ilmnadmin` nebo `root`.

1. Přihlaste se k účtu `ilmnadmin`.
2. Otevřete terminál.
3. Zadejte příkaz `sudo passwd ilmnuser`.
4. Až k tomu budete vyzváni, zadejte heslo k účtu `ilmnadmin`.
5. Až k tomu budete vyzváni, zadejte nové heslo k účtu `ilmnuser`.
6. Až k tomu budete vyzváni, potvrďte nové heslo k účtu `ilmnuser` jeho opětovným zadáním.

### Obnovení hesla k účtu `ilmnadmin`

Heslo k účtu `ilmnadmin` můžete obnovit, pokud znáte heslo k účtu `root`.

1. Přihlaste se k účtu `root`.
2. Otevřete terminál.
3. Pokud chcete změnit heslo k účtu `ilmnadmin`, zadejte heslo k účtu `ilmnadmin`. Pokud chcete změnit heslo k účtu `ilmnuser`, zadejte heslo k účtu `ilmnuser`.
4. Až k tomu budete vyzváni, zadejte nové heslo.
5. Až k tomu budete vyzváni, potvrďte nové heslo jeho opětovným zadáním.

### Obnovení hesla k účtu `root`

K obnovení hesla k účtu `root` použijte některou z následujících možností:

- Pokud znáte heslo z doby, kdy byla naposledy uložena bitová kopie operačního systému, obnovte danou kopii.
- Pokud si heslo nepamatujete, kontaktujte technickou podporu společnosti Illumina.

## Konfigurace prostředí BaseSpace Sequence Hub a služby Proactive Support

Při konfiguraci prostředí BaseSpace Sequence Hub a služby Proactive Support v systému postupujte podle následujících pokynů. Informace o nastavení účtu BaseSpace Sequence Hub naleznete v [online nápovědě prostředí BaseSpace Sequence Hub](#).

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).

2. Pokud chcete zobrazit nastavení prostředí BaseSpace Sequence Hub a služby Proactive Support, vyberte některou z následujících možností:

Možnost	Popis a požadavky
<b>Proactive Support Only (Pouze služba Proactive Support)*</b>	Odešle provozní údaje přístroje do společnosti Illumina za účelem rychlejšího vyřešení problému. Vyžaduje připojení k internetu.
<b>Proactive and Run Monitoring (Proaktivní podpora a sledování běhu)</b>	Odešle soubory InterOp a soubory protokolů do prostředí BaseSpace Sequence Hub ke vzdálenému sledování běhu. Tato možnost je výchozí. Vyžaduje účet BaseSpace Sequence Hub a připojení k internetu.
<b>Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu)</b>	Odešle soubory InterOp, soubory protokolů a data běhu do prostředí BaseSpace Sequence Hub ke vzdálenému sledování a analýze. Vyžaduje účet BaseSpace Sequence Hub, připojení k internetu a seznam vzorků.
<b>None (Žádná)</b>	Odpojí běhy od účtů BaseSpace Sequence Hub a neodešle provozní údaje přístroje do služby Illumina Proactive Support.

\* V závislosti na verzi řídicího softwaru se může název tohoto nastavení v softwarovém rozhraní lišit od názvu uvedeného v této příručce.

Když je vybrána jiná možnost než None (Žádná), je služba Proactive Support povolena. Jde o bezplatnou službu, pomocí které lze zobrazit provozní údaje na ovládacím panelu MyIllumina Customer Dashboard a která umožňuje servisním týmům společnosti Illumina rychleji řešit problémy.

- i** | Ve výchozím nastavení je zapnuta možnost Proactive and Run Monitoring (Proaktivní podpora a sledování běhu). Pokud tuto službu nechcete využívat, vyberte možnost **None (Žádná)**.
- Pokud jste v kroku 2 vybrali možnost None (Žádná), dokončete akci výběrem možnosti **Save (Uložit)**. Jinak pokračujte krokem 6.
  - V seznamu umístění hostitele vyberte umístění serveru BaseSpace Sequence Hub, na který se nahrávají data.  
Dbejte na to, abyste použili umístění hostitele ve vašem regionu nebo v jeho blízkosti.
  - Pokud máte předplatné Enterprise, zadejte název domény (adresu URL), který používáte pro svůj účet BaseSpace Sequence Hub.  
Příklad: [https://vase\\_laborator.basespace.illumina.com](https://vase_laborator.basespace.illumina.com).
  - Vyberte možnost **Save (Uložit)**.

## Zadání umístění výchozí výstupní složky

Podle pokynů v této části vyberte umístění výchozí výstupní složky. Výstupní složku pro každý běh můžete změnit během nastavení běhu. Software ukládá soubory BCL<sup>1</sup> a další data běhu do výstupní složky.

Výstupní složka je požadována, pokud prostředí BaseSpace Sequence Hub není nakonfigurováno na možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu). Jako výchozí výstupní složku používejte pouze externí nebo síťový disk. Použití výstupní složky v přístroji má nepříznivý vliv na běh sekvenování.

### Zadání výstupní složky na externím disku

Následujícím postupem vyberte externí přenosný disk jako výchozí výstupní složku. Doporučuje se napájený disk formátovaný systémem souborů NTFS nebo GPT/EXTA.

1. Připojte externí přenosný disk k portu USB 3.0 na boční nebo zadní straně přístroje.  
Ujistěte se, že na externí přenosný disk je povoleno zapisovat. Pokud je disk nastaven pouze ke čtení, nemůže na něj řídicí software ukládat data.
2. Vytvořte novou složku na externím přenosném disku. Tato složka se stane výchozí výstupní složkou.  
Řídicí software NextSeq 1000/2000 vyžaduje nejméně dvě úrovně vnořených složek, aby rozpoznal umístění jako externí přenosný disk.
3. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).
4. V části Default Output Folder (Výchozí výstupní složka) vyberte cestu k existující složce a přejděte na novou složku na externím přenosném disku.
5. **[Volitelný postup]** Pokud jste v nastavení Run Mode (Režim běhu) vybrali možnost **Online Run Setup** (Nastavení běhu online), vyberte možnost v rozevírací nabídce Hosting Location (Umístění hostitele).
6. Vyberte možnost **Save** (Uložit).

### Zadání výchozí výstupní složky na síťovém disku

Pomocí následujících pokynů připojte trvalý síťový disk a zadejte umístění výchozí výstupní složky. Jediným způsobem trvalého připojení síťové jednotky k systému NextSeq1000/2000 je použití protokolů SMB (Server Message Block), Common Internet File System (CIFS) a Network File System (NFS).

Pokyny k připojení pomocí protokolu SMB nebo CIFS

1. Pokud je spuštěný řídicí software NextSeq 1000/2000, vyberte možnost **Minimize Application** (Minimalizovat aplikaci).

---

<sup>1</sup>Obsahuje přiřazení báze a s ním spojené skóre kvality pro každý klastr každého cyklu sekvenování.

2. Přihlaste se k účtu `ilmnadmin`.
3. Vyberte možnost **Applications** (Aplikace).
4. V části **Favorites** (Oblíbené) vyberte možnost **Terminal** (Terminál).
5. Zadejte `sudo touch /root/.smbcreds` a stiskněte **Enter**.
6. Po vyzvání zadejte heslo k účtu `ilmnadmin`.  
Heslo k účtu `ilmnadmin` je nutné zadat při každém použití příkazu `sudo`.
7. Zadáním příkazu `sudo gedit /root/.smbcreds` a následným stisknutím **Enter** otevřete textový soubor s názvem `smbcreds`.
8. Po otevření textového souboru `.smbcreds` zadejte své síťové přihlašovací údaje v následujícím formátu.  

```
username=<uživatelské jméno>  
password=<heslo>  
domain=<název_domény>
```

Uvedené ostré závorky není třeba s uživatelským jménem, heslem a názvem domény zadávat. Název domény je požadován pouze tehdy, pokud je vzdálený účet součástí domény.
9. Vyberte možnost **Save** (Uložit) a zavřete soubor.
10. Určete název serveru a název sdílené položky serveru SMB nebo CIFS.  
Název serveru a název sdílené položky nesmí obsahovat mezery. Příklad:  
Název serveru: `192.168.500.100` nebo `Můjserver-mojefirma-03`  
Název sdílené položky: `/sdileni1`
11. Zadáním příkazu `sudo chmod 400 /root/.smbcreds` na terminálu a následným stisknutím **Enter** udělte přístup ke čtení textového souboru `.smbcreds`.
12. Zadejte `sudo mkdir /mnt/<místní název>`.  
`<místní název>` je název síťového adresáře na síťovém disku. Tento název nesmí obsahovat mezery. Tento adresář se zobrazí v přístroji.
13. Stiskněte **Enter**.
14. Zadejte `sudo gedit /etc/fstab` a stiskněte **Enter**.
15. Po otevření souboru `fstab` zadejte na konec souboru následující příkaz a stiskněte **Enter**.  

```
//<název serveru>/<název sdíleného prostředku> /mnt/<místní název> cifs  
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_  
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```
16. Vyberte možnost **Save** (Uložit) a zavřete soubor.
17. Na terminálu zadejte `sudo mount -a -vvv` a stiskněte **Enter**.  
Síťový disk je nyní připojen jako `/mnt/<místní název>`.
18. Pokud chcete ověřit úspěšnost připojení, zadejte `<df | grep <místní název>>` a stiskněte **Enter**.  
Měl by se zobrazit název sdíleného souboru.



19. Zadááním příkazu `sudo mkdir /mnt/<místní název>/<výstupní adresář>` vytvořte podsložku uvnitř místního adresáře. <výstupní adresář> představuje umístění výchozí výstupní složky. Řídící software NextSeq 1000/2000 vyžaduje nejméně dvě úrovně vnořených složek, aby rozpoznal umístění jako připojený síťový disk.
20. Vypněte a zapněte přístroj. Viz část [Vypnutí a zapnutí přístroje na straně 82](#).
21. Nastavte trvale připojený síťový disk jako výchozí výstupní složku. Viz část [Zadání trvale připojeného síťového disku jako výchozí výstupní složky na straně 17](#).

## Pokyny k připojení pomocí protokolu SMB nebo CIFS

1. Pokud je spuštěný řídicí software NextSeq 1000/2000, vyberte možnost **Minimize Application** (Minimalizovat aplikaci).
2. Přihlaste se k účtu `ilmnadmin`.
3. Zadejte název serveru NFS.  
Název serveru nesmí obsahovat mezery. Příklad:  
Název serveru: `192.168.500.100` nebo `Můjserver-mojefirma-03`
4. Vyberte možnost **Applications** (Aplikace).
5. V části Favorites (Oblíbené) vyberte možnost **Terminal** (Terminál).
6. Zadejte `sudo mkdir /mnt/<místní název>` a stiskněte **Enter**.  
<místní název> je název nového adresáře na síťovém disku.
7. Zadejte `sudo gedit /etc/fstab` a stiskněte **Enter**.
8. Po otevření souboru `fstab` zadejte následující příkaz a stiskněte **Enter**.  

```
Server name: /share //mnt/<místní název> nfs x-systemd.automount,defaults 0 0
```
9. Vyberte možnost **Save** (Uložit) a zavřete soubor.
10. Na terminálu zadejte `sudo mount -a -vvv` a stiskněte **Enter**.  
Síťový disk je nyní připojen v adresáři `/mnt/directory` uvnitř složky <místní název>.
11. Vytvořte novou podsložku <pod složka> uvnitř složky <místní název>. Výstupní adresář představuje umístění výchozí výstupní složky.  
Řídící software NextSeq 1000/2000 vyžaduje nejméně dvě úrovně vnořených složek, aby rozpoznal umístění jako připojený síťový disk.
12. Vypněte a zapněte přístroj. Viz část [Vypnutí a zapnutí přístroje na straně 82](#).
13. Nastavte trvale připojený síťový disk jako výchozí výstupní složku. Viz část [Zadání trvale připojeného síťového disku jako výchozí výstupní složky na straně 17](#).

## Zadání trvale připojeného síťového disku jako výchozí výstupní složky

1. Přihlaste se k účtu `ilmnuser`.
2. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).

3. V části Default Output Folder (Výchozí výstupní složka) vyberte připojení trvalého síťového disku v adresáři /mnt/<místní název>/<výstupní adresář>.
4. **[Volitelný postup]** Pokud jste v nastavení Run Mode (Režim běhu) vybrali možnost **Online Run Setup** (Nastavení běhu online), vyberte možnost v rozevřací nabídce Hosting Location (Umístění hostitele).
5. Vyberte možnost **Save** (Uložit).

## Import vlastních referenčních genomů

Nové vlastní referenční genomy lze importovat pouze pomocí účtu správce. Seznam všech kompatibilních referenčních genomů naleznete na stránce NextSeq 1000/2000 Product Compatibility (Kompatibilita produktů se systémem NextSeq 1000/2000).

1. K vytvoření referenčního genomu použijte aplikaci Reference Builder for Illumina Instruments BaseSpace Sequence Hub. Další informace naleznete v *online nápovědě k aplikaci Reference Builder for Illumina Instruments verze 1.0.0*.
2. Vyberte nabídku řídicího softwaru a pak vyberte možnost **Process Management** (Řízení procesu).
3. Ujistěte se, že neprobíhají žádné běhy sekvenování ani sekundární analýzy v přístroji.
4. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Minimize Application** (Minimalizovat aplikaci).
5. Přihlaste se k účtu ilmnadmin.
6. Vyberte nabídku řídicího softwaru a pak vyberte možnost **DRAGEN**.
7. V části Genome (Genom) vyberte možnost **View Installed Genomes** (Zobrazit instalované genomy). Zobrazí se seznam aktuálně nainstalovaných genomů Illumina a vlastních genomů.
8. Zavřete okno.
9. Vyberte možnost **Choose** (Zvolit) v části Import New Reference Genomes (Import nových referenčních genomů), přejděte k souboru referenčního genomu (\*.tar.gz) na přenosném nebo připojeném síťovém disku a poté vyberte možnost **Open** (Otevřít).
10. Vyberte možnost **Import** (Importovat).

## Import souborů s definicí základní úrovně šumu

Pokud používáte pracovní postup DRAGEN Enrichment v somatickém režimu, můžete pomocí souboru s definicí základní úrovně šumu odfiltrovat šum sekvenování nebo systematický šum. Můžete si stáhnout standardní soubory s definicí základní úrovně šumu z [webu podpory společnosti Illumina](#) nebo můžete vytvořit vlastní soubor s definicí základní úrovně šumu.

### Vygenerování vlastního souboru s definicí základní úrovně šumu

Pokud používáte somatický režim, můžete vygenerovat vlastní soubor s definicí základní úrovně šumu. Soubor s definicí základní úrovně šumu je sestaven pomocí normálních vzorků, které neodpovídají jedinci, od něhož vzorky pocházejí. Doporučený počet normálních vzorků je 50.

Pokud chcete vygenerovat vlastní soubor s definicí základní úrovně šumu, použijte některý z následujících způsobů:

- Použijte server platformy DRAGEN Bio-IT. Pokyny naleznete v *online nápovědě* platformy DRAGEN Bio-IT.
- Použijte aplikaci DRAGEN Baseline Builder v prostředí BaseSpace Sequence Hub. Pomocí plánu BCL Convert v nastavení běhu přístroje v prostředí BaseSpace Sequence Hub vygenerujte soubory FASTQ. Po dokončení běhu sekvenování, když máte k dispozici 50 vzorků, zadejte soubory FASTQ do aplikace DRAGEN Baseline Builder.

### Import souborů s definicí základní úrovně pomocí uživatelského rozhraní

Po importu souboru s definicí základní úrovně můžete nastavit běh sekvenování pomocí pracovního postupu DRAGEN Enrichment v somatickém režimu.

1. Stáhněte si standardní soubor s definicí základní úrovně ze [stránky podpory společnosti Illumina](#) nebo si stáhněte vlastní soubor s definicí základní úrovně ze serveru DRAGEN nebo aplikace DRAGEN Baseline Builder.
2. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Minimize Application** (Minimalizovat aplikaci).
3. Přihlaste se k účtu ilmnadmin.
4. Vyberte možnost **Applications** (Aplikace) a poté možnost **Favorites** (Oblíbené).
5. Vyberte možnost **+Other Locations** (Přidat další umístění) a poté možnost **Computer** (Počítač).
6. Dvakrát klikněte na **usr** a poté na **local**.
7. Klikněte dvakrát na **illumina** a poté na **aux\_files**.
8. Přesuňte myší soubor s definicí základní úrovně šumu do složky **aux\_files**.

### Import souborů s definicí základní úrovně pomocí terminálového okna

Po importu souboru s definicí základní úrovně můžete nastavit běh sekvenování pomocí pracovního postupu DRAGEN Enrichment v somatickém režimu.

1. Stáhněte si standardní soubor s definicí základní úrovně ze [stránky podpory společnosti Illumina](#) nebo si stáhněte vlastní soubor s definicí základní úrovně ze serveru DRAGEN nebo aplikace DRAGEN Baseline Builder.
2. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Minimize Application** (Minimalizovat aplikaci).
3. Přihlaste se k účtu ilmnadmin.
4. Vyberte možnost **Applications** (Aplikace).
5. V části Favorites (Oblíbené) vyberte možnost **Terminal** (Terminál).
6. Zadejte následující příkaz.

```
cp [/path/to/baselinefile] /usr/local/illumina/aux_files
```

## Konfigurace režimu běhu

Režim běhu se použije na všechny běhy a určuje, kam je třeba zadat parametry běhu a jak analyzovat data.

### Cloudový nebo hybridní režim

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).
2. Vyberte možnost **Online Run Setup** (Nastavení běhu online) v nastavení BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support (Služby BaseSpace Sequence Hub a proaktivní podpora).
3. Vhodným způsobem nakonfigurujte další nastavení výběrem následujících možností:
  - a. **Proactive and Run Monitoring** (Proaktivní podpora a sledování běhu) nebo **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu).
  - b. Rozevírací nabídka **Hosting Location** (Umístění hostitele).
  - c. **[Volitelný postup]** Vyplňte pole **Private Domain Name** (Název soukromé domény).
4. Vyberte možnost **Save** (Uložit).

### Místní nebo samostatný režim

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).
2. Vyberte možnost **Local Run Setup** (Místní nastavení běhu) v nastavení BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support (Služby BaseSpace Sequence Hub a proaktivní podpora).
3. Vhodným způsobem nakonfigurujte další nastavení výběrem následujících možností:
  - a. **Proactive Support Only** (Pouze proaktivní podpora), **Proactive and Run Monitoring** (Proaktivní podpora a sledování běhu), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu) nebo **None** (Žádná).



Prostředí BaseSpace Sequence Hub umožní opětovné zařazení běhu pouze tehdy, když je vybrána možnost **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu). Pokud je seznam vzorků neplatný, můžete jej opravit a znovu zařadit analýzu demultiplexování. Funkce opětovného zařazení běhu v přístroji je popsána v části [Opětovné zařazení běhu na straně 82](#) (Opětovné zařazení běhu).

- b. Rozevírací nabídka **Hosting Location** (Umístění hostitele).
  - c. **[Volitelný postup]** Vyplňte pole **Private Domain Name** (Název soukromé domény).
4. Vyberte možnost **Save** (Uložit).

## Použití seznamu vzorků v místním nebo samostatném režimu

K analýze pomocí softwaru DRAGEN musíte použít soubor ve formátu seznamu vzorků verze 2. Soubor ve formátu seznamu vzorků verze 2 je také kompatibilní s aplikacemi BaseSpace Sequence Hub, které nepodporují software DRAGEN. Další informace o vytvoření souboru ve formátu seznamu vzorků verze 2 naleznete v části [Nastavení seznamu vzorků verze 2 na straně 86](#).

## Přizpůsobení přístroje

V této části jsou uvedeny informace o konfiguraci dostupných nastavení přizpůsobení. Pokud chcete nastavit výchozí výstupní složku, postupujte podle části [Zadání umístění výchozí výstupní složky na straně 15](#).

### Název přístroje

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).
2. Do pole Instrument Nickname (Přezdívka přístroje) zadejte upřednostňovaný název přístroje. Tento název se bude zobrazovat v horní části každé obrazovky.
3. Vyberte možnost **Save** (Uložit).

### Nastavení předvoleb denaturace a ředění

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).
2. Zvolte, zda se mají knihovny automaticky denaturovat a ředit v přístroji. Výchozím nastavením je volba zvolená v předchozím běhu.
  - Pokud chcete automaticky denaturovat a ředit knihovny v přístroji, zaškrtněte políčko **Denature and Dilute On Board** (Denaturovat a ředit v přístroji).
  - Pokud chcete knihovny denaturovat a zředit ručně, zrušte zaškrtnutí políčka **Denature Dilute On Board** (Denaturovat a zředit v přístroji).Návod k ruční denaturaci a ředění knihoven naleznete v *Příručce pro denaturaci a ředění knihoven systému NextSeq 1000 a 2000 (dokument č. 1000000139235)*.

### Nastavení předvoleb automatického čištění reagensů

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).
2. Zvolte, zda systém automaticky čistí nepoužité reagensie do přihrádky pro použité reagensie po každém běhu, aby se po dokončení běhu urychlila likvidace reagenčního odpadu:
  - Pokud chcete provádět čištění automaticky, zaškrtněte políčko **Purge Reagent Cartridge** (Vyčistit kazetu s reagensii).
  - Pokud chcete automatické čištění přeskočit, zrušte zaškrtnutí políčka **Purge Reagent Cartridge** (Vyčistit kazetu s reagensii) (toto je výchozí nastavení).

Čištění nepoužitých reagensů prodlužuje pracovní postup o 2 hodiny.

3. Vyberte možnost **Save** (Uložit).

## Konfigurace aktualizací softwaru

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).
2. Vyberte, zda má systém automaticky kontrolovat dostupnost nových aktualizací softwaru:
  - Pokud chcete aktualizace kontrolovat automaticky, zaškrtněte políčko **Autocheck for software updates** (Automaticky kontrolovat aktualizace softwaru).
  - Pokud chcete aktualizace kontrolovat ručně, zrušte zaškrtnutí políčka **Autocheck for software updates** (Automaticky kontrolovat aktualizace softwaru).

Automatická kontrola aktualizací softwaru vyžaduje připojení k internetu. Další informace o instalaci aktualizací softwaru naleznete v části [Aktualizace softwaru na straně 74](#).

3. Vyberte možnost **Save** (Uložit).

## Změna jasu displeje LCD

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).
2. Přesuňte jezdec LCD Brightness (Jas displeje LCD) na požadovanou hodnotu v procentech.
3. Vyberte možnost **Save** (Uložit).

## Nastavení serveru proxy

Podpora proxy serveru je k dispozici pouze v řídicím softwaru NextSeq 1000/2000 verze 1.3.

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Settings** (Nastavení).
2. Vyberte aktuální nastavení serveru proxy. Otevře se obrazovka Proxy Settings (Nastavení serveru proxy).
3. Zaškrtněte políčko **Enable Proxy** (Povolit server proxy) a pak zadejte IP adresu portu.
4. **[Volitelný postup]** Pokud server proxy vyžaduje ověření, zaškrtněte políčko **Requires Username and Password** (Vyžaduje uživatelské jméno a heslo) a pak zadejte uživatelské jméno a heslo.
5. Výběrem možnosti **Save** (Uložit) uložte a potvrďte informace o serveru proxy.
6. Vyberte jednu z následujících možností:
  - Vyberte možnost **Yes, I'm Finished** (Ano, dokončeno), pokud chcete restartovat systém a použít nová nastavení serveru proxy.
  - Vyberte možnost **No, Take Me Back** (Ne, vrátit se), pokud se chcete vrátit na obrazovku Settings (Nastavení). Nová nastavení serveru proxy budou uložena, ale nepoužijí se, dokud nebude systém restartován.

# Spotřební materiál a vybavení

V této části jsou uvedeny všechny položky dodané v sadě reagensů a podmínky jejich skladování. Uveden je také pomocný spotřební materiál a vybavení, které musíte zakoupit, abyste mohli postupovat podle protokolu a provádět postupy údržby a řešení problémů.


## Spotřební materiál pro sekvenování

Sekvenování v systému NextSeq 1000/2000 vyžaduje sadu reagensů na jedno použití Illumina NextSeq 1000/2000 P2 nebo sadu reagensů na jedno použití Illumina NextSeq 1000/2000 P3. Sada reagensů NextSeq 1000/2000 P2 se dodává ve třech velikostech (pro 100 cyklů, 200 cyklů, 300 cyklů) a sada reagensů NextSeq 1000/2000 P3 se dodává ve čtyřech velikostech (50 cyklů, 100 cyklů, 200 cyklů, 300 cyklů).

Sekvenační systém NextSeq 1000 je kompatibilní pouze se sadou reagensů Illumina NextSeq 1000/2000 P2.

Sada reagensů obsahuje kazetu a průtokovou kyvetu na sekvenování. Po obdržení sady reagensů NextSeq 1000/2000 P2 nebo sady reagensů Illumina NextSeq 1000/2000 P3 postupujte takto:

- Ihned uskladněte jednotlivé součásti při určených teplotách, aby bylo zajištěno jejich správné fungování.
- Neotevírejte žádný sáček ze stříbrné fólie, dokud k tomu nebudete vyzváni.
- Kazety uskladněte v původní krabici, aby nedošlo k roztržení nebo propíchnutí sáčku.
- Kazety skladujte se šipkami směřujícími vzhůru.

 Pokud štítek na kazetě nesměřuje vzhůru, bude to mít nepříznivý vliv na data sekvenování.

Tabulka 2 Obsah sady

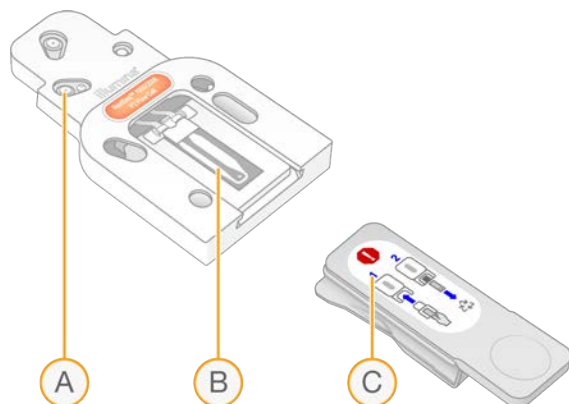
Spotřební materiál	Množství	Skladovací teplota	Rozměry
Kazeta	1	-25 až -15 °C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm
Průtoková kyveta	1	2 až 8 °C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm
Resuspenzační pufr (RSB) s roztokem Tween 20	1	-25 až -15 °C	4 cm × 6,6 cm × 5 cm

\*Přepravováno při pokojové teplotě.

Spotřební materiál má identifikátory pro sledování a zajištění kompatibility. Kazeta a průtoková kyveta využívají identifikaci RFID<sup>1</sup>.

## Průtoková kyveta

Průtoková kyveta je vzorovaná průtoková kyveta s jednou cestou. V plastové kazetě je vložena skleněná průtoková kyveta. K zajištění bezpečné manipulace slouží šedé ouško, které zakrývá průtokovou kyvetu a vyčnívá z ní.



- A. Plastová kazeta
- B. Průtoková kyveta
- C. Šedé ouško

Vnitřní povrch průtokové kyvety tvoří miliony nanoprvků. V nanoprvcích jsou generovány klastry, ze kterých se pak provádí sekvenovací reakce. Vzorované uspořádání nanoprvků zvyšuje počet výstupních čtení a dat.

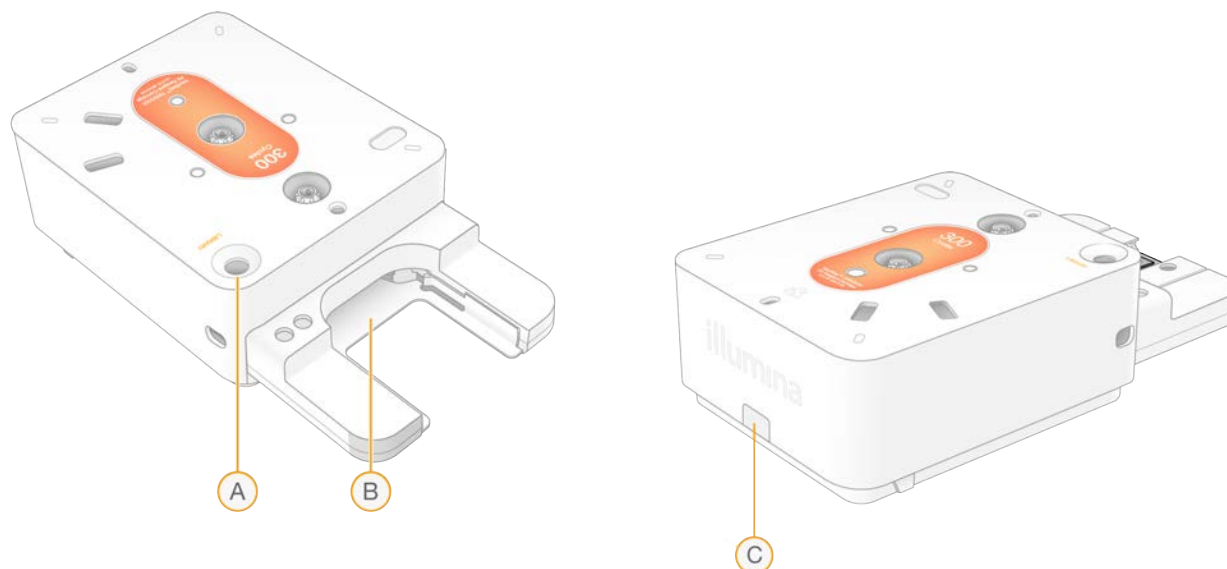
---

<sup>1</sup>radiofrekvenční identifikace



## Kazeta

Kazeta se sekvenačními reagensii je předem naplněna klastrovacími, sekvenačními, párovými-koncovými a indexovými reagensii. Zásobník zabalený ve fólii je vyhrazen pro knihovny a zdířka v přední části je vyhrazena pro průtokovou kyvetu.



- A. Zásobník knihovny
- B. Zdířka pro průtokovou kyvetu
- C. Vypouštěcí zátka

Kazeta obsahuje veškerý spotřební materiál pro běh: reagensie, knihovnu a průtokovou kyvetu. Knihovna a průtoková kyveta se vkládají do rozmražené kazety, která se následně vloží do přístroje. Po spuštění běhu se reagensie a knihovna automaticky přenesou z kazety do průtokové kyvety.

Kazeta obsahuje čerpadla, ventily a všechny průtočné součásti systému včetně zásobníku na spodní straně, který slouží ke sběru použitých reagensii. Kazeta se po skončení běhu vyhodí, takže přístroj není nutné promývat.

## Podporovaný počet cyklů

Štítek na kazetě určuje, kolik cyklů je analyzováno, nikoliv počet provedených cyklů. Průtoková kyveta je kompatibilní s libovolným počtem cyklů a libovolným typem čtení.

Všechny kazety pro 100 cyklů a 200 cyklů obsahují 38 cyklů navíc. Kazeta na 300 cyklů obsahuje 27 cyklů navíc. Například kazeta na 300 cyklů obsahuje dostatečné množství reagensii až pro 327 cyklů sekvenování. Informace o počtu cyklů k sekvenování naleznete v části [Počet cyklů ve čtení na straně 31](#).

## Významy symbolů

Následující tabulka popisuje významy symbolů na spotřebním materiálu nebo obalu spotřebních materiálů.

Symbol	Popis
	Datum, do kdy je možné spotřební materiál použít. V zájmu dosažení nejlepších výsledků použijte spotřební materiál před tímto datem.
	Označuje výrobce (Illumina).
	Použijte pouze pro účely výzkumu (Research Use Only – RUO).
	Označuje číslo součásti, aby bylo možné spotřební materiál rozpoznat. <sup>1</sup>
	Označuje kód dávky, aby bylo možné rozpoznat dávku nebo šarži, ve které byl spotřební materiál vyroben. <sup>1</sup>
	Označuje zdravotní riziko.
	Rozsah skladovacích teplot ve stupních Celsia. Spotřební materiál skladujte při uvedeném rozsahu. <sup>2</sup>

## Pomocný spotřební materiál

Pro sekvenování a údržbu nakupte následující spotřební materiál.

## Spotřební materiál pro sekvenování

Tabulka 3 Spotřební materiál pro sekvenování

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
Jednorázové rukavice, nepudrované	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Obecné účely.
Sada reagensí NextSeq 1000/2000 P2 (v3)	Illumina: katalogové č. 20046811 (100 cyklů) katalogové č. 20046812 (200 cyklů) katalogové č. 20046813 (300 cyklů)	Obsahuje kazetu reagensí, průtokovou kyvetu a resuspenzační pufr (RSB) NextSeq 1000/2000 s roztokem Tween 20 na jeden běh. NextSeq 1000 a NextSeq 2000
Sada reagensí NextSeq 2000 P3	Illumina: katalogové č. 20046810 (50 cyklů) katalogové č. 20040559 (100 cyklů) katalogové č. 20040560 (200 cyklů) katalogové č. 20040561 (300 cyklů)	Obsahuje kazetu reagensí, průtokovou kyvetu a resuspenzační pufr (RSB) NextSeq 1000/2000 s roztokem Tween 20 na jeden běh. Kompatibilní se systémem NextSeq 2000.
Mikrozkumavky, 1,5 ml	Fisher Scientific, katalogové číslo 14-222-158 nebo ekvivalentní zkumavky low-bind se sníženou vazností	Ředění knihoven na koncentraci pro vložení.
Hroty pro pipety, 10 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Knihovny pro ředění.
Hroty pro pipety, 20 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Knihovny pro ředění a vkládání.
Hroty pro pipety, 200 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Knihovny pro ředění.
Hroty pro pipety, 1 000 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Propíchnutí fólie zásobníku knihovny.
[Volitelné] PhiX Control v3	Illumina, katalogové číslo FC-110-3001	Provedení běhu pouze s PhiX nebo špičkami v kontrolním vzorku PhiX.

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
[Volitelně] Papírové utěrky	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Vysoušení kazety po vodní lázni.

## Spotřební materiál pro údržbu

Tabulka 4 Spotřební materiál pro údržbu

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
Jednorázové rukavice, nepudrované	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Obecné účely.
Výměna vzduchového filtru systému NextSeq 1000/2000*	Illumina, katalogové číslo 20029759	Výměna vzduchového filtru každých šest měsíců.

\* Přístroj se dodává s jedním zabudovaným a jedním náhradním filtrem. Pokud nepodléhá záruce, zajišťuje si náhradní součásti uživatel. Ponechte zabalené až do použití.

## Pomocné vybavení

Pro účely sekvenování nakupte následující vybavení.

Položka	Zdroj	Účel
Mraznička, -25 až -15 °C	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Skladování kazety.
Kbelík na led	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Odložení knihoven stranou do zahájení sekvenování.
Pipeta, 10 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Ředění knihoven na koncentraci pro vložení.
Pipeta, 20 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Ředění knihoven na koncentraci pro vložení a vložení knihoven do kazety.
Pipeta, 200 µl	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Ředění knihoven na koncentraci pro vložení.
Chladnička, 2 až 8 °C	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Skladování průtokové kvety nebo rozmrazení zásobníku.

Položka	Zdroj	Účel
<p>[Volitelně] Jedna z následujících vodních lázní s regulovanou teplotou nebo ekvivalentní lázeň, kterou lze udržovat při teplotě 25 °C:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Cirkulační vodní lázeň Thermo Scientific Precision 35L (pro 5 kazet současně)</li><li>• Digitální cirkulační vodní lázeň SHEL LAB 22L (pro 3 kazety současně)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Thermo Fisher Scientific, katalogové č. TSCIR 35</li><li>• Shel Lab, katalogové č. SWBC22</li></ul>	Rozmrazení kazety.

# Protokol

Tato část uvádí podrobné pokyny k přípravě spotřebního materiálu, ředění knihoven a nastavení běhu sekvenování na některý ze čtyřech režimů běhu (cloudový, hybridní a místní režim využívají software DRAGEN nebo prostředí BaseSpace Sequence Hub, zatímco samostatný režim představuje samostatný běh, jehož smyslem je pouze vytvořit data cBCL pro pracovní postupy vlastní analýzy).

Při práci s reagensy a dalšími chemickými látkami používejte ochranné brýle, laboratorní plášť a nepudrované rukavice.

Před zahájením protokolu zkontrolujte, zda máte k dispozici veškerý požadovaný spotřební materiál a vybavení. Viz část [Spotřební materiál a vybavení na straně 23](#).

Protokoly procházejte v uvedeném pořadí a použijte určené objemy, teploty a doby trvání.

## Důležité okolnosti sekvenování

Před zahájením protokolu si prostudujte následující informace, které vás připraví na ředění knihoven a nastavení běhu. Dosažení optimální koncentrace pro vložení je nejdůležitějším předpokladem pro úspěšné sekvenování a analýzu. Zadání správného počtu cyklů ve čtení pomůže zajistit optimální výstup dat.

### Objem a koncentrace pro vložení

Objem pro vložení je 20 µl. Koncentrace pro vložení se může lišit podle typu knihovny:

Typ knihovny	Koncentrace pro vložení (pM)
AmpliSeq™ for Illumina Library PLUS	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep with Enrichment	1000
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA PCR-Free	1000
100% PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1200
TruSeq DNA Nano 550	1500
TruSeq Stranded mRNA	1000

U ostatních typů knihoven je doporučena počáteční koncentrace pro vložení 650 µM. Tuto koncentraci lze během následujících cyklů optimalizovat, abyste identifikovali takovou koncentraci pro vložení, která konzistentně poskytuje data vyhovující specifikaci.

**i** | K optimalizaci koncentrace pro vložení použijte metriku % Loading Concentration (Procentuální koncentrace pro vložení) ve výstupním souboru `PrimaryAnalysisMetrics.csv`. Tento soubor je dostupný po dokončení běhu. Pokud je hodnota % Loading Concentration (Procentuální koncentrace pro vložení) menší než 95 %, při následujících bězích zvyšujte koncentraci pro vložení po přírůstcích 100 pM.

## Počet cyklů ve čtení

Pokud chcete zajistit kvalitu dat, zadejte minimálně 26 cyklů a maximálně 151 cyklů u každého čtení. Přesný počet cyklů závisí na vašem experimentu. Řídicí software NextSeq 1000/2000 vyžaduje nejméně 1 cyklus v položce Read 1 (Čtení 1), avšak zobrazí varování, pokud je počet cyklů v položce Read 1 (Čtení 1) menší než 26.

Celkový počet cyklů v položkách Read 1 (Čtení 1), Index 1, Index 2 a Read 2 (Čtení 2) nesmí být větší než počet cyklů podporovaných sadou navýšený o 38 cyklů v případě sad pro 100 cyklů a 200 cyklů a o 27 cyklů v případě sad P3 pro 300 cyklů. Řídicí software NextSeq 1000/2000 zobrazí varování, když mají Index 1 a Index 2 méně než 6 cyklů. Varování se nezobrazí, pokud má Index 1 nebo Index 2 nula cyklů.

Minimální a maximální počet cyklů zahrnuje i jeden mimořádný cyklus navíc. K požadované délce čtení vždy přidejte jeden cyklus navíc na opravu efektů fázování a předfázování. Délka čtení je počet cyklů *sekvenování* v položce Read 1 (Čtení 1) a Read 2 (Čtení 2) s vyloučením mimořádných cyklů a indexovacích cyklů. Další informace naleznete v odstavci Oprava fázování v části [Pracovní postup softwaru Real-Time Analysis na straně 57](#).

Příklad nastavení běhu:

- V případě délky čtení 35 (jednoduché čtení) zadejte do pole Read 1 (Čtení 1) hodnotu **36**.
- V případě délky čtení 150 na jedno čtení (párové-koncové) zadejte do pole Read 1 (Čtení 1) hodnotu **151** a do pole Read 2 (Čtení 2) také hodnotu **151**.

## Naplánování běhu sekvenování v prostředí BaseSpace Sequence Hub

Pomocí nabídky Instrument Run Setup (Nastavení běhu přístroje) v prostředí BaseSpace Sequence Hub vytvořte a nakonfigurujte nastavení běhu. Pokud nastavujete běh v cloudovém nebo hybridním režimu, zadejte konfiguraci běhu do svého seznamu naplánovaných běhů v účtu BaseSpace Sequence Hub na kartě Planned Runs (Naplánované běhy). Běhy dostupné k sekvenování v systémech NextSeq 1000 a NextSeq 2000 jsou zobrazeny na kartě Planned Runs (Naplánované běhy). Pokud nastavujete běh v místním režimu, pomocí nabídky Instrument Run Setup (Nastavení běhu přístroje) vytvořte a exportujte

seznam vzorků ve formátu verze 2. Alternativně můžete postupem v části [Nastavení seznamu vzorků verze 2 na straně 86](#) vytvořit seznam vzorků bez prostředí BaseSpace Sequence Hub, s použitím poskytnuté šablony.

Nabídka Instrument Run Setup (Nastavení seznamu vzorků) prostředí BaseSpace Sequence Hub nepodporuje více než 1536 vzorků.

## Nastavení běhu

1. Přejděte do prostředí BaseSpace Sequence Hub.
2. Zadejte e-mailovou adresu a heslo pro přístup k prostředí BaseSpace Sequence Hub a poté vyberte možnost **Sign In** (Přihlásit).
3. Vyberte kartu **Runs** (Běhy) a poté vyberte rozevírací nabídku **New Run** (Nový běh).
4. Vyberte položku **NextSeq 1000/2000**.
5. V poli Run Name (Název běhu) zadejte preferovaný jedinečný název k identifikaci aktuálního běhu. Název běhu může obsahovat nejvíce 225 alfanumerických znaků, mezer, pomlček a podtržitek.
6. Vyberte jedno z následujících umístění analýzy.

- **BaseSpace:** Analýza dat sekvenování v cloudu.
- **Local** (Místní): Analýza dat sekvenování v přístroji nebo vytvoření seznamu vzorků verze 2 pro místní nebo hybridní režim.

7. Vyberte typ a verzi analýzy.

Další informace o sekundárních analýzách naleznete v části [Výstupní soubory sekundární analýzy DRAGEN na straně 62](#) nebo v dokumentaci aplikace BaseSpace Sequence Hub. Pokud jste vybrali analýzu DRAGEN Single Cell RNA, navštivte stránku Products Files (Produktové soubory) systému NextSeq 1000/2000. Naleznete na ní informace o kompatibilitě se sadami pro přípravu knihoven pro jednobuněčné sekvenování RNA od nezávislých dodavatelů.



V případě analýzy v přístroji musí vybraná verze odpovídat verzi softwaru DRAGEN nainstalované v přístroji. Pokud chcete ověřit verzi softwaru DRAGEN nainstalovanou v přístroji, přečtěte si [Aktualizace pracovních postupů a licence DRAGEN na straně 76](#).

8. **[Volitelný postup]** Následujícím postupem vytvořte vlastní indexační sady. Pokud používáte více než jednu knihovnu, musí mít knihovny stejné délky čtení indexů.
  - a. Vyberte možnost **Add Custom Index Adapter Kit** (Přidat vlastní sadu indexového adaptéru) v rozevírací nabídce Index Adapter Kit (Sada indexového adaptéru).
  - b. Vyberte typ šablony a zadejte název sady, sekvence adaptéru, strategie pro index a sekvence indexu.  
Ujistěte se, že jsou sekvence adaptéru druhého indexu (i5) orientovány dopředně.
  - c. Vyberte možnost **Create New Kit** (Vytvořit novou sadu).
9. **[Volitelný postup]** Následujícím postupem vytvořte uživatelskou sadu na přípravu knihoven.
  - a. Vyberte možnost **Add Custom Library Prep Kit** (Přidat uživatelskou sadu na přípravu knihoven) v rozevírací nabídce Library Prep Kit (Sada na přípravu knihoven).



- b. Zadejte název, typy čtení, výchozí počet cyklů čtení a kompatibilní sady indexových adaptérů pro použitou uživatelskou sadu na přípravu knihoven.
  - c. Vyberte možnost **Create New Kit** (Vytvořit novou sadu).
10. Vyberte následující nastavení přístroje. V závislosti na sadě pro přípravu knihoven jsou automaticky vybrány doporučené možnosti. Některé sady pro přípravu knihoven mají pevně kódovaný počet čtení indexů a typů čtení, což nelze změnit.

- Sada pro přípravu knihoven
- Sada indexového adaptéru
- Počet čtení indexů
- Typ čtení
- Počet cyklů sekvenování na jedno čtení

**i** | Pokud je pro sadu pro přípravu knihoven vybrána možnost Not Specified (Neuvedeno), nebude počet čtení indexů aktualizován, dokud nejsou v části Sample Data (Data vzorků) zadány sekvence indexů.

11. Zadejte informace o vzorcích do tabulky s daty vzorků pomocí jedné z následujících možností. Pokud chcete seskupit vzorky pro agregaci dat během následné analýzy, přiřadte název skupiny ve sloupci Project (Projekt).

- Vyberte možnost **Import Data** (Import dat) a pak vyberte seznam vzorků. Dbejte na to, aby seznam vzorků splňoval požadavky na formátování. Viz část [Nastavení seznamu vzorků verze 2 na straně 86](#). Změna seznamu vzorků po jeho prvním stažení může způsobit selhání analýzy.
- Vložte ID vzorků a buď polohy jamek na indexační desce, nebo indexy i7 a i5 přímo z externího souboru. Před vložením zadejte počet řádků vzorků v poli Rows (Řádky) a poté vyberte symbol +. ID vzorků mohou obsahovat až 20 alfanumerických znaků, pomlček a podtržítok.

**i** | Indexační desky s pevným uspořádáním vyžadují zadání polohy jamek. Indexy, které nemají pevné uspořádání, vyžadují zadání indexů i7 a i5. Indexy i5 musí být zadány s dopřednou orientací.

- Ručně zadejte ID vzorků a odpovídající polohy jamek nebo indexy. Pokud je pro sadu pro přípravu knihoven vybrána možnost Not Specified (Neuvedeno), zadejte sekvence indexů 2 (i5) s dopřednou orientací.

12. Vyberte možnost **Next** (Další).

## Nastavení sekundární analýzy

Nakonfigurujte nastavení pro typ analýzy zvolený pro běh. Další informace o pracovních postupech analýzy DRAGEN naleznete v části [Výstupní soubory sekundární analýzy DRAGEN na straně 62](#).

### Illumina DRAGEN BCL Convert

Ke konfiguraci analýzy DRAGEN BCL Convert použijte následující postup.

1. Zadejte následující volitelná nastavení.

Nastavení	Popis
AdapterRead1	Sekvence adaptéru pro čtení 1. Pokud používáte sadu pro přípravu knihoven Illumina, ponechte pole AdapterRead1 prázdné.
AdapterRead2	Sekvence adaptéru pro čtení 2. Pokud používáte sadu pro přípravu knihoven Illumina, ponechte pole AdapterRead2 prázdné.
BarcodeMismatchesIndex1	Počet povolených nesouladů mezi prvním čtením indexů a sekvencí indexů. Výchozí hodnota je 1. Pokud má čárový kód délku 6 bp, je doporučena hodnota 0.
BarcodeMismatchesIndex2	Počet povolených nesouladů mezi druhým čtením indexů a sekvencí indexů. Výchozí hodnota je 1. Pokud má čárový kód délku 6 bp, je doporučena hodnota 0.
OverrideCycles	Řetězec sloužící k zadání počtu cyklů UMI a zamaskování cyklů čtení. Povoleny jsou následující hodnoty: <ul style="list-style-type: none"> <li>• N: Určuje počet cyklů, které budou ignorovány.</li> <li>• Y: Určuje počet cyklů sekvenování.</li> <li>• I: Určuje počet indexovacích cyklů.</li> <li>• U: Určuje počet cyklů UMI, které mají být oříznuty.</li> </ul> Jednotlivé prvky jsou odděleny středníky. Následují příklady zadání nastavení OverrideCycles. U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

2. Vyberte, zda se má uložit kopie souborů FASTQ. Soubory FASTQ se generují pouze tehdy, pokud vyberete zachování souborů FASTQ.
3. Vyberte jednu z následujících možností výstupního formátu souborů FASTQ:
  - **gzip**: Uloží soubory FASTQ ve formátu gzip.

- **DRAGEN:** Uloží soubory FASTQ ve formátu ora.
4. Dokončete konfiguraci běhu.
    - Pokud chcete odeslat konfiguraci běhu do svého účtu BaseSpace Sequence Hub, vyberte možnost **Submit Run** (Odeslat běh). Běhy odeslané do prostředí BaseSpace Sequence Hub se zobrazují v seznamu naplánovaných běhů a jsou dostupné pro systémy využívající cloudový nebo hybridní režim.
    - Pokud chcete uložit konfiguraci běhu jako soubor ve formátu seznamu vzorků verze 2, vyberte možnost **Export Sample Sheet** (Exportovat seznam vzorků) v rozevírací nabídce **Submit Run** (Odeslat běh). Ke spouštění běhů v systémech využívajících místní režim je požadován seznam vzorků. Tato možnost je k dispozici pouze tehdy, pokud byla pro umístění analýzy vybrána možnost Local (Místní).

## Illumina DRAGEN Enrichment

Ke konfiguraci analýzy Illumina DRAGEN Enrichment použijte následující postup.

1. Vyberte referenční genom.  
Je-li to možné, použijte referenční genom s přiřazením ALT-aware.
2. Vyberte soubor \*.bed obsahující oblasti, na které se chcete zaměřit, nebo nahrajte nový vlastní soubor.  
Ujistěte se, že referenční genom souboru BED odpovídá referenčnímu genomu zvolenému v kroku 1. Pro nový vlastní soubor BED použijte následující formát pojmenování: `název_panelu_verzeČíslo.referencegenome.bed`.
  - **Local mode** (Místní režim). Vyberte možnost **Select Custom File (Local)** (Vybrat vlastní soubor (místní)), pokud chcete nahrát jeden běh, nebo možnost **Upload Custom File (BaseSpace)** (Vybrat vlastní soubor (BaseSpace)), pokud požadujete opakované použití.
  - **Cloudový nebo hybridní režim.** Vyberte možnost **Upload Custom File (BaseSpace)** (Nahrát vlastní soubor (BaseSpace)). Vlastní soubor BED je k dispozici pouze v pracovní skupině, do které byl nahrán.
3. Vyberte detekční program pro germinální nebo somatické varianty.
4. **[Volitelný postup]** Pokud používáte detekční program pro somatické varianty, vyberte soubor s definicí základní úrovně šumu. Další informace naleznete v části [Import souborů s definicí základní úrovně šumu na straně 18](#).
5. Vyberte výstupní formát přiřazení/zarovnání.
6. Vyberte, zda se má uložit kopie souborů FASTQ. Soubory FASTQ se generují pouze tehdy, pokud vyberete zachování souborů FASTQ.
7. Vyberte jednu z následujících možností výstupního formátu souborů FASTQ:
  - **gzip:** Uloží soubory FASTQ ve formátu gzip.
  - **DRAGEN:** Uloží soubory FASTQ ve formátu ora.

8. Dokončete konfiguraci běhu.

- Pokud chcete odeslat konfiguraci běhu do svého účtu BaseSpace Sequence Hub, vyberte možnost **Submit Run** (Odeslat běh). Běhy odeslané do prostředí BaseSpace Sequence Hub se zobrazují v seznamu naplánovaných běhů a jsou dostupné pro systémy využívající cloudový nebo hybridní režim.
- Pokud chcete uložit konfiguraci běhu jako soubor ve formátu seznamu vzorků verze 2, vyberte možnost **Export Sample Sheet** (Exportovat seznam vzorků) v rozevírací nabídce **Submit Run** (Odeslat běh). Podpůrné soubory seznamu vzorků a sekundární analýzy jsou staženy ve složce souborů \*.zip. Jsou požadovány ke spouštění běhů v systémech využívajících režim Local mode (Místní režim). Tato možnost je k dispozici pouze tehdy, pokud byla pro umístění analýzy vybrána možnost Local (Místní).

### Illumina DRAGEN Germline

Ke konfiguraci analýzy Illumina DRAGEN Germline použijte následující postup.

1. Vyberte referenční genom.  
Je-li to možné, použijte referenční genom s přiřazením ALT-aware.
2. Vyberte výstupní formát přiřazení/zarovnání.
3. Vyberte, zda se má uložit kopie souborů FASTQ. Soubory FASTQ se generují pouze tehdy, pokud vyberete zachování souborů FASTQ.
4. Vyberte jednu z následujících možností výstupního formátu souborů FASTQ:
  - **gzip**: Uloží soubory FASTQ ve formátu gzip.
  - **DRAGEN**: Uloží soubory FASTQ ve formátu ora.
5. Dokončete konfiguraci běhu.
  - Pokud chcete odeslat konfiguraci běhu do svého účtu BaseSpace Sequence Hub, vyberte možnost **Submit Run** (Odeslat běh). Běhy odeslané do prostředí BaseSpace Sequence Hub se zobrazují v seznamu naplánovaných běhů a jsou dostupné pro systémy využívající cloudový nebo hybridní režim.
  - Pokud chcete uložit konfiguraci běhu jako soubor ve formátu seznamu vzorků verze 2, vyberte možnost **Export Sample Sheet** (Exportovat seznam vzorků) v rozevírací nabídce **Submit Run** (Odeslat běh). Podpůrné soubory seznamu vzorků a sekundární analýzy jsou staženy ve složce souborů \*.zip. Jsou požadovány ke spouštění běhů v systémech využívajících režim Local mode (Místní režim). Tato možnost je k dispozici pouze tehdy, pokud byla pro umístění analýzy vybrána možnost Local (Místní).

## Illumina DRAGEN RNA

Ke konfiguraci analýzy Illumina DRAGEN RNA použijte následující postup.

1. Vyberte referenční genom.  
Je-li to možné, použijte referenční genom bez přiřazení ALT-aware.
2. Vyberte výstupní formát přiřazení/zarovnání.
3. Vyberte, zda se má uložit kopie souborů FASTQ. Soubory FASTQ se generují pouze tehdy, pokud vyberete zachování souborů FASTQ.
4. Vyberte jednu z následujících možností výstupního formátu souborů FASTQ:
  - **gzip**: Uloží soubory FASTQ ve formátu gzip.
  - **DRAGEN**: Uloží soubory FASTQ ve formátu ora.
5. **[Volitelný postup]** Nahrajte soubor poznámek k RNA ve formátu GTF (Gene Transfer Format).
  - **Local mode** (Místní režim). Vyberte možnost **Select Custom File (Local)** (Vybrat vlastní soubor (místní)), pokud chcete nahrát jeden běh, nebo možnost **Upload Custom File (BaseSpace)** (Vybrat vlastní soubor (BaseSpace)), pokud požadujete opakované použití.
  - **Cloudový nebo hybridní režim**. Vyberte možnost **Upload Custom File (BaseSpace)** (Nahrát vlastní soubor (BaseSpace)). Soubor GTF je k dispozici pouze v pracovní skupině, do které byl nahrán.

Po nahrání souboru GTF do pracovní skupiny BaseSpace Sequence Hub vyberte v rozevřacím seznamu soubor poznámek k RNA.
6. Vyberte, zda má být povolena diferenciální exprese.
7. Pokud jste povolili diferenciální expresi, vyberte pro každý vzorek hodnotu kontroly nebo porovnání. V každé porovnávané skupině je jakýkoliv vzorek označený jako kontrola porovnán se všemi vzorky označenými jako porovnání. Pokud vzorek neobsahuje hodnotu kontroly nebo porovnání, vyberte jako hodnotu **na** (není k dispozici).
8. Dokončete konfiguraci běhu.
  - Pokud chcete odeslat konfiguraci běhu do svého účtu BaseSpace Sequence Hub, vyberte možnost **Submit Run** (Odeslat běh). Běhy odeslané do prostředí BaseSpace Sequence Hub se zobrazují v seznamu naplánovaných běhů a jsou dostupné pro systémy využívající cloudový nebo hybridní režim.
  - Pokud chcete uložit konfiguraci běhu jako soubor ve formátu seznamu vzorků verze 2, vyberte možnost **Export Sample Sheet** (Exportovat seznam vzorků) v rozevřací nabídce **Submit Run** (Odeslat běh). Podpůrné soubory seznamu vzorků a sekundární analýzy jsou staženy ve složce souborů \*.zip, pokud byl poskytnut volitelný soubor GTF. Jsou požadovány ke spouštění běhů v systémech využívajících režim Local mode (Místní režim). Tato možnost je k dispozici pouze tehdy, pokud byla pro umístění analýzy vybrána možnost Local (Místní).

## Illumina DRAGEN Single Cell RNA

Ke konfiguraci analýzy Illumina DRAGEN Single Cell RNA použijte následující postup.

1. Vyberte referenční genom.  
Je-li to možné, použijte referenční genom bez přiřazení ALT-aware.
2. **[Volitelný postup]** Nahrajte soubor poznámek k RNA ve formátu GTF (Gene Transfer Format).
  - **Local mode** (Místní režim). Vyberte možnost **Select Custom File (Local)** (Vybrat vlastní soubor (místní)), pokud chcete nahrát jeden běh, nebo možnost **Upload Custom File (BaseSpace)** (Vybrat vlastní soubor (BaseSpace)), pokud požadujete opakované použití.
  - **Cloudový nebo hybridní režim**. Vyberte možnost **Upload Custom File (BaseSpace)** (Nahrát vlastní soubor (BaseSpace)). Soubor GTF je k dispozici pouze v pracovní skupině, do které byl nahrán.

Po nahrání souboru GTF do pracovní skupiny BaseSpace Sequence Hub vyberte v rozevíracím seznamu soubor poznámek k RNA.
3. Vyberte výstupní formát přiřazení/zarovnání.
4. Vyberte, zda se má uložit kopie souborů FASTQ. Soubory FASTQ se generují pouze tehdy, pokud vyberete zachování souborů FASTQ.
5. Vyberte jednu z následujících možností výstupního formátu souborů FASTQ:
  - **gzip**: Uloží soubory FASTQ ve formátu gzip.
  - **DRAGEN**: Uloží soubory FASTQ ve formátu ora.
6. Vyberte konfiguraci, která je shodná s použitým typem sady pro přípravu knihoven.  
Pokud jste například jako sadu pro přípravu knihoven vybrali sadu Single Cell RNA Library Kit 1, vyberte v nastavení Configuration Type (Typ konfigurace) možnost Type 1 (Typ 1).
7. Vyberte čtení čárového kódu.
8. **[Volitelný postup]** Upravte počet bází v čárových kódech a UMI. Hodnoty jsou vyplněny automaticky na základě vybraného typu sady pro přípravu knihoven a typu konfigurace.
9. Vyberte orientaci vláken.
10. **[Volitelný postup]** Vyberte soubor obsahující sekvence čárového kódu nebo nahrajte nový vlastní soubor.
11. Pokud jako typ konfigurace použijete Advanced/Custom (Pokročilá/vlastní), zadejte hodnoty počtu cyklů přepsání, polohy čárového kódu a polohy UMI.
12. Dokončete konfiguraci běhu.
  - Pokud chcete odeslat konfiguraci běhu do svého účtu BaseSpace Sequence Hub, vyberte možnost **Submit Run** (Odeslat běh). Běhy odeslané do prostředí BaseSpace Sequence Hub se zobrazují v seznamu naplánovaných běhů a jsou dostupné pro systémy využívající cloudový nebo hybridní režim.

- Pokud chcete uložit konfiguraci běhu jako soubor ve formátu seznamu vzorků verze 2, vyberte možnost **Export Sample Sheet** (Exportovat seznam vzorků) v rozevírací nabídce **Submit Run** (Odeslat běh). Podpůrné soubory seznamu vzorků a sekundární analýzy jsou staženy ve složce souborů \*.zip, pokud byl poskytnut volitelný soubor GTF. Jsou požadovány ke spouštění běhů v systémech využívajících režim Local mode (Místní režim). Tato možnost je k dispozici pouze tehdy, pokud byla pro umístění analýzy vybrána možnost Local (Místní).

## Illumina DRAGEN Amplicon

Ke konfiguraci analýzy Illumina DRAGEN Amplicon použijte následující postup.

1. Vyberte referenční genom.
2. Vyberte soubor \*.bed obsahující oblasti, na které se chcete zaměřit, nebo nahrajte nový vlastní soubor.

Ujistěte se, že referenční genom souboru BED odpovídá referenčnímu genomu zvolenému v kroku

1. Pro nový vlastní soubor BED použijte následující formát pojmenování: `název_panelu_verzeČíslo.referencegenome.bed`.

- **Cloudový nebo hybridní režim.** Vyberte možnost **Upload Custom File (BaseSpace)** (Nahrát vlastní soubor (BaseSpace)). Vlastní soubor BED je k dispozici pouze v pracovní skupině, do které byl nahrán.
  - **Local mode (Místní režim).** Vyberte možnost **Select Custom File (Local)** (Vybrat vlastní soubor (místní)), pokud chcete nahrát jeden běh, nebo možnost **Upload Custom File (BaseSpace)** (Vybrat vlastní soubor (BaseSpace)), pokud požadujete opakované použití.
3. Vyberte detekční program pro germinální nebo somatické varianty.
  4. Vyberte výstupní formát přiřazení/zarovnání.
  5. **[Místní režim]** Vyberte, zda se má uložit kopie souborů FASTQ. Soubory FASTQ se generují pouze tehdy, pokud vyberete zachování souborů FASTQ.
  6. Vyberte, zda se má uložit kopie souborů FASTQ. Soubory FASTQ se generují pouze tehdy, pokud vyberete zachování souborů FASTQ.
  7. Vyberte jednu z následujících možností výstupního formátu souborů FASTQ:
    - **gzip:** Uloží soubory FASTQ ve formátu gzip.
    - **DRAGEN:** Uloží soubory FASTQ ve formátu ora.
  8. Dokončete konfiguraci běhu.
    - Pokud chcete odeslat konfiguraci běhu do svého účtu BaseSpace Sequence Hub, vyberte možnost **Submit Run** (Odeslat běh). Běhy odeslané do prostředí BaseSpace Sequence Hub se zobrazují v seznamu naplánovaných běhů a jsou dostupné pro systémy využívající cloudový nebo hybridní režim.

- **[Místní režim]** Pokud chcete uložit konfiguraci běhu jako soubor ve formátu seznamu vzorků verze 2, vyberte možnost **Export Sample Sheet** (Exportovat seznam vzorků) v rozevřací nabídce **Submit Run** (Odeslat běh). Podpůrné soubory seznamu vzorků a sekundární analýzy jsou staženy ve složce souborů \*.zip. Jsou požadovány ke spuštění běhů v systémech využívajících režim Local mode (Místní režim). Tato možnost je k dispozici pouze tehdy, pokud byla pro umístění analýzy vybrána možnost Local (Místní).

## Rozmrazení zabalené kazety a průtokové kyvety

V tomto kroku je rozmrazena kazeta *v neotevřeném sáčku* a připravena průtoková kyveta. K rozmrazení zabalené kazety použijte jednu ze tří metod: rozmrazení v kontrolované vodní lázni, rozmrazení v chladničce nebo rozmrazení na vzduchu při pokojové teplotě. Kazetu použijte okamžitě po rozmrazení. Nezmrazujte znovu. Pokud nemůžete kazetu použít bezprostředně po rozmrazení, postupujte podle části [Vrácení spotřebního materiálu do skladovacího prostoru na straně 81](#).

Obrázek 4 Zabalená kazeta



### Rozmrazení kazety v kontrolované vodní lázni

1. Nasadte si nové nepudrované rukavice a vyjměte kazetu ze skladovacího prostoru.
2. Pokud je kazeta umístěná v krabici, vyjměte ji, ale *neotevírejte sáček ze stříbrné fólie*.
- ! Rozmrazení roztrženého nebo děravého sáčku ve vodě může způsobit selhání sekvenování. V takovém případě rozmrazujte při pokojové teplotě nebo v chladničce.
3. Rozmrazujte zabalenou kazetu ve vodní lázni s kontrolovanou teplotou 25 °C po dobu 6 hodin:
  - Hladinu vody udržujte ve výšce nejméně 9,5–10 cm bez ohledu na počet rozmrazovaných kazet.



- Teplotu vodní lázně nastavte na 25 °C.
- Sáček vložte do lázně štítkem nahoru a neponořujte jej.
- ! | Nepokoušejte se kazetu zatížit, aby se ponořila. Pokud sáček není štítkem nahoru nebo se kazeta během rozmrazování převrátí, bude to mít nepříznivý vliv na data sekvenování.
- Nenechávejte kazetu ve vodní lázni déle než 8 hodin.
- Nerozmrazujte současně větší počet kazet, než pro který je vodní lázeň určena. Kompatibilní vodní lázně jsou uvedeny v části [Pomocné vybavení na straně 28](#).
- Neskládejte kazety na sebe.

4. Vyjměte kazetu z vodní lázně a osušte ji papírovými ručníky.

### Rozmrazení kazety v chladničce

1. Nasadte si nový pár nepudrovaných rukavic.
2. Jeden den před předpokládaným spuštěním běhu vyjměte kazetu ze skladovacích prostor s teplotou -25 až -15 °C.
3. Pokud je kazeta umístěná v krabici, vyjměte ji, ale *neotevírejte sáček ze stříbrné fólie*.
4. Umístěte kazetu na místo s pokojovou teplotou štítkem vzhůru tak, aby mohl vzduch cirkulovat po stranách a kolem horní části.

! | Pokud sáček není štítkem nahoru nebo se kazeta během rozmrazování převrátí, bude to mít nepříznivý vliv na data sekvenování.

5. Rozmrazujte při pokojové teplotě po dobu 6 hodin.
6. Vložte kazetu do chladničky s teplotou 2 až 8 °C štítkem vzhůru, aby mohl vzduch cirkulovat po stranách.

! | Pokud sáček není štítkem nahoru nebo se kazeta během rozmrazování převrátí, bude to mít nepříznivý vliv na data sekvenování.

7. Rozmrazujte v chladničce po dobu 12 hodin. Nepřekračujte dobu 72 hodin.

### Rozmrazování kazety při pokojové teplotě

1. Nasadte si nový pár nepudrovaných rukavic.
2. Vyjměte kazetu ze skladovacích prostor s teplotou -25 až -15 °C.
3. Pokud je kazeta umístěná v krabici, vyjměte ji, ale *neotevírejte sáček ze stříbrné fólie*.
4. Umístěte kazetu na místo s pokojovou teplotou štítkem vzhůru tak, aby mohl vzduch cirkulovat po stranách a kolem horní části.

- ! Pokud sáček není štítkem nahoru nebo se kazeta během rozmrazování převrátí, bude to mít nepříznivý vliv na data sekvenování.

5. Rozmrazujte při pokojové teplotě po dobu 9 hodin. Nepřekračujte dobu 16 hodin.

## Příprava průtokové kyvety a kazety

1. Připravte následujícím způsobem průtokovou kyvetu.
  - a. Vyjměte novou průtokovou kyvetu ze skladovacích prostor s teplotou 2 až 8 °C.
  - b. Ponechte neotevřené balení při pokojové teplotě po dobu 10–15 minut. Zabráňte tím kondenzaci při vyjmutí průtokové kyvety z obalu. Příprava průtokové kyvety v této fázi zajistí včasné dosažení pokojové teploty.
2. V případě rozmrazování v chladničce:
  - a. Vyjměte rozmrazenou kazetu ze skladovacích prostor s teplotou 2 až 10 °C.
  - b. Před sekvenováním ponechte neotevřené balení při pokojové teplotě po dobu nejméně 15 minut. Nepřekračujte dobu 1 hodiny.

## Ředění knihoven

Pokud používáte denaturaci a ředění v přístroji, zajistí tento krok zředění knihoven na použitelnou koncentraci pro vložení. Další metriky, diverzitu báze nebo pozitivní kontrolu poskytuje volitelná 2% špička PhiX<sup>1</sup>. Procento špičky PhiX by mělo být zvýšeno v případě knihoven s nižší diverzitou báze.

Pokud provádíte denaturaci a ředění knihoven ručně, řiďte se *Příručkou pro denaturaci a ředění knihoven systému NextSeq 1000 a 2000 (dokument č. 1000000139235)*. Tento krok se týká pouze denaturace a ředění v přístroji.

### Ředění knihovny na 2 nM

1. [Volitelný postup] Vyjměte 10nM kontrolu PhiX ze skladovacích prostor o teplotě -25 až -15 °C. Kontrola PhiX je vyžadována pouze pro volitelnou špičku nebo běh pouze s kontrolou PhiX.
2. [Volitelný postup] Rozmrazujte kontrolu PhiX při pokojové teplotě 5 minut. Potom proveďte kvantifikaci fluorescenční metodou, jako je Qubit, k potvrzení koncentrace PhiX. Pokud kvantifikace není možná, pokračujte s koncentrací 10 nM.
3. Krátce promíchejte knihovnu nebo PhiX ve vortexové třepačce a pak odstředujte při 280 g po dobu 1 minuty.
4. Pomocí resuspenzačního pufru (RSB) s roztokem Tween 20 použitým jako ředidlo připravte 2nM knihovnu o objemu nejméně 24 µl v low-bind mikrozkušavce. Pokyny pro špičku PhiX naleznete v části [Přidání kontroly PhiX \(volitelné\) na straně 44](#).
5. Krátce promíchejte ve vortexové třepačce a pak odstředujte při 280 g po dobu 1 minuty.

---

<sup>1</sup>PhiX představuje malou knihovnu Illumina připravenou k použití, s vyváženým zastoupením nukleotidů.

## Zředění 2nM knihovny na koncentraci pro vložení

1. Nakombinujte následující objemy v low-bind mikrozkuhavce, abyste si připravili knihovnu o objemu 24  $\mu$ l zředěnou na odpovídající koncentraci pro vložení:

Typ knihovny*	Koncentrace pro vložení (pM)	Objem knihovny s 2 nM ( $\mu$ l)	Objem resuspenzačního pufu (RSB) s roztokem Tween 20 ( $\mu$ l)
Ampliseq for Illumina Library PLUS	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15
Illumina DNA Prep with Enrichment	1000	12	12
Illumina Stranded Total RNA with Ribo-Zero Plus	750	9	15
Illumina Stranded mRNA Prep	750	9	15
Illumina DNA PCR-Free	1000	12	12
TruSeq DNA Nano 350	1200	14,4	9,6
TruSeq DNA Nano 550	1500	18	6
TruSeq Stranded mRNA	1000	12	12
100% PhiX	650	7,8	16,2

\* U typů knihoven, které nejsou uvedeny na seznamu, začněte s koncentrací pro vložení 650 pM a optimalizujte je v průběhu následujících běhů.

Tato tabulka uvádí příklad koncentrací pro vložení. Systém NextSeq 1000/2000 je kompatibilní se všemi soupravami pro přípravu knihoven Illumina, ale optimální koncentrace pro vložení se může lišit.

2. Krátce promíchejte ve vortexové třepačce a pak odstředějte při 280 g po dobu 1 minuty.
3. Odložte zředěnou knihovnu do ledu, dokud nebudete připraveni na sekvenování.  
Knihovny zředěné na koncentraci pro vložení sekvenujte ve stejný den, kdy jsou zředěny.
4. Postupujte podle následujících pokynů.
  - Pokud přidáváte kontrolu PhiX, postupujte podle části [Přidání kontroly PhiX \(volitelné na straně 44\)](#).
  - Pokud nepřidáváte kontrolu PhiX nebo provádíte běh pouze s kontrolou PhiX, postupujte podle části [Vložení spotřebního materiálu do kazety na straně 44](#).

## Přidání kontroly PhiX (volitelné)

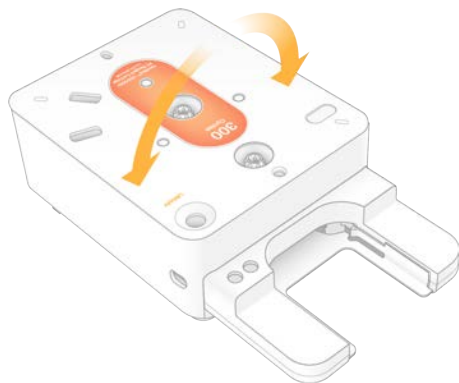
1. Nakombinujte následující objemy v low-bind mikrozkuhavce, abyste si připravili 20  $\mu$ l 1nM kontroly PhiX:
  - 10 nM PhiX (2  $\mu$ l)
  - Resuspenzační pufr (RSB) s roztokem Tween 20 (18  $\mu$ l)
2. Krátce promíchejte ve vortexové třepačce a pak odstřed'ujte při 280 g po dobu 1 minuty.
3. Přidejte 1  $\mu$ l 1nM kontroly PhiX do knihovny o objemu 24  $\mu$ l zředěné na finální koncentraci pro vložení.  
Tyto objemy vytvoří přibližně 2% špičku PhiX. Skutečné procento se liší v závislosti na kvalitě a množství v knihovně.
4. Odložte zředěnou knihovnu se špičkou PhiX do ledu, dokud nebudete připraveni na sekvenování. Sekvenujte knihovny se špičkou PhiX ve stejný den, kdy jsou zředěny.

## Vložení spotřebního materiálu do kazety

Tento krok připraví kazetu na sekvenování tím, že smíchá předem naplněné reagentie a vloží zředěné knihovny a průtokovou kyvetu.

### Příprava kazety

1. Otevřete sáček s kazetou – nůžkami sáček roztrhněte nebo rozstříhněte podél horního výřezu po obou stranách.
2. Vyměňte kazetu ze sáčku. Sáček a desikant vyhod'te.
3. Desetkrát kazetu obraťte nahoru a dolů, aby se reagentie promíchaly.  
Během obracení mohou komponenty uvnitř kazety chrastit, což je normální.



### Vložení průtokové kyvety

1. Otevřete stříbrné balení – nůžkami sáček roztrhněte nebo rozstříhněte podél horního výřezu po obou stranách.

Pokud nemůžete průtokovou kyvetu použít ihned, postupujte podle části [Vrácení spotřebního materiálu do skladovacího prostoru na straně 81](#).

2. Vyměňte průtokovou kyvetu z balení.

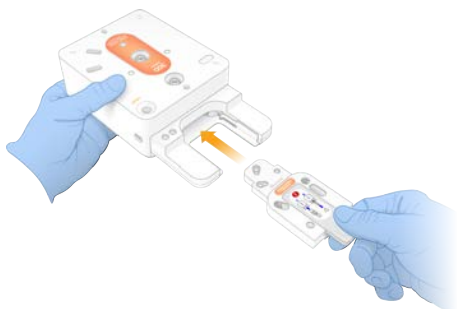
Balení s desikantem odložte bokem pro případ, že budete potřebovat vrátit průtokovou kyvetu do skladovacího prostoru. Desikant se nachází v sáčku ve spodní části balení. Po zahájení sekvenování ho vyhodte.



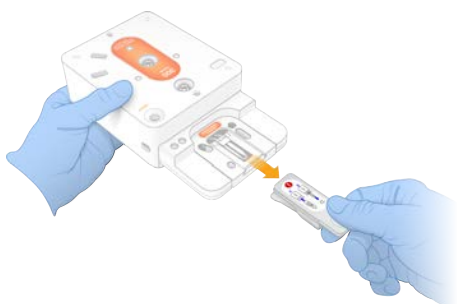
3. Držte průtokovou kyvetu za šedé ouško, štítkem nahoru.

4. Zatlačte průtokovou kyvetu do zdířky v přední části kazety.

Slyšitelné cvaknutí označuje, že průtoková kyveta je na svém místě. Při správném vložení vyčnívá šedé ouško z kazety.



5. Zatáhněte za šedé ouško a vysuňte průtokovou kyvetu. Ouško zrecyklujte.



## Vložení knihoven

1. Novým hrotem pipety P1000 propíchněte zásobník knihovny a odtáhněte fólii k okrajům, aby se otvor zvětšil.
2. Zlikvidujte hrot pipety, aby nedošlo ke kontaminaci.

3. Přidejte 20 µl zředěné knihovny na *dno* zásobníku tak, že pomalu přiblížíte hrot pipety ke dnu zásobníku a následně obsah vypustíte. Nedotýkejte se fólie.



## Spuštění běhu sekvenování

Tento krok spustí běh sekvenování v jednom ze čtyřech režimů:

- **Cloud mode** (Cloudový režim). Běh je vybrán ze seznamu naplánovaných běhů v řídicím softwaru NextSeq 1000/2000. Během sekvenování jsou data cBCL nahrána do prostředí BaseSpace Sequence Hub. Po sekvenování se automaticky spustí software DRAGEN v prostředí BaseSpace Sequence Hub.
- **Hybrid mode** (Hybridní režim). Běh je vybrán ze seznamu naplánovaných běhů v řídicím softwaru NextSeq 1000/2000. Po sekvenování se automaticky spustí analýza v přístroji. Data cBCL a výstupní soubory sekundární analýzy DRAGEN jsou uloženy ve vybrané výstupní složce.
- **Local mode** (Místní režim). Seznam vzorků ve formátu souboru verze 2 je ručně importován do řídicího softwaru NextSeq 1000/2000. Po sekvenování se automaticky spustí analýza v přístroji. Data cBCL a výstupní soubory sekundární analýzy DRAGEN jsou uloženy ve vybrané výstupní složce. Pokud je vybrána možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu), lze analýzu spustit také prostřednictvím aplikací BaseSpace Sequence Hub po dokončení sekvenování.
- **Standalone mode** (Samostatný režim). Umožňuje nastavit běh a podle pokynů v řídicím softwaru NextSeq 1000/2000 vygenerovat data cBCL.

⚠ | Otevření štítu při kontrole před spuštěním běhu nebo při běhu může způsobit chybu běhu.

⚠ | Během otevírání a zavírání štítu mějte ruce dál od přístroje, abyste se vyhnuli poranění.

## Spuštění cloudového nebo hybridního běhu

1. Nakonfigurujte režim běhu podle popisu v části [Konfigurace režimu běhu na straně 20](#).
  2. Vyberte možnost **Start** (Spustit).
  3. Zadejte své přihlašovací údaje do prostředí BaseSpace Sequence Hub a vyberte možnost **Sign In** (Přihlásit).
  4. Pokud jste vybrali možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu), vyberte pracovní skupinu BaseSpace Sequence Hub, která obsahuje požadovaný běh vytvořený v nastavení Instrument Run Setup (Nastavení běhu přístroje) v prostředí BaseSpace Sequence Hub.
- !** Aby se předešlo chybám, je nutné vybrat pracovní skupinu. Před pokračováním vyberte pracovní skupinu.
5. Vyberte možnost **Next** (Další).
  6. Vyberte běh.
  7. Zkontrolujte, že analýza, délka běhu a verze sekundární analýzy souhlasí se správným během. V názvu analýzy se zobrazuje text „Cloud\_“, který označuje, že analýza probíhá v prostředí BaseSpace Sequence Hub.
  8. Vyberte možnost **Review** (Kontrola).
  9. **[Volitelný postup]** Zadejte umístění vlastních primerů pro čtení a vlastních indexačních primerů. Další informace o přípravě a přidávání vlastních primerů naleznete v *Příručce pro vlastní primery systémů NextSeq 1000 a 2000 (dokument č. 1000000139569)*. Navštivte stránku Compatible Products (Kompatibilní produkty) použité sady pro přípravu knihoven a zkontrolujte, zda je nutné použít vlastní primery Illumina.
  10. **[Volitelný postup]** Vyberte vlastní návod. Další informace naleznete v části [Sekvenování v režimu tmy na straně 100](#).  
Pokud používáte řídicí software NextSeq 1000/2000 verze 1.3 se sadou Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus nebo Illumina Stranded mRNA Prep, je vlastní návod vybrán automaticky.
  11. **[Volitelný postup]** Pokud chcete knihovny denaturovat a zředit ručně, zrušte zaškrtnutí políčka **Denaturovat a zředit v přístroji**. Viz *Příručka pro denaturaci a ředění knihoven systémů NextSeq 1000 a 2000 (dokument č. 1000000139235)*.  
Výchozí výběr se konfiguruje v nastavení řídicího softwaru NextSeq 1000/2000.
  12. **[Volitelný postup]** Pokud chcete změnit výstupní složku, vyberte pole Output Folder (Výstupní složka) a zadejte nové umístění.  
Pole Output Folder (Výstupní složka) je automaticky vyplněno podle výchozích nastavení a jeho vyplnění je povinné, pokud není vybrána možnost **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu).


Pokud jste vybrali možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu), zobrazí se v poli Save to BaseSpace Sequence Hub (Uložit do prostředí BaseSpace Sequence Hub) hodnota Enabled (Povoleno).

Pokud jste vybrali možnost Proactive and Run Monitoring (Proaktivní podpora a sledování běhu), zobrazí se v poli Save to BaseSpace Sequence Hub (Uložit do prostředí BaseSpace Sequence Hub) hodnota Disabled (Zakázáno).

13. Zkontrolujte informace o běhu a poté vyberte možnost **Prep** (Příprava).

## Spuštění místního běhu

1. Nakonfigurujte režim běhu podle popisu v části [Konfigurace režimu běhu na straně 20](#).
2. Vyberte možnost **Start** (Spustit).
3. Pokud jste vybrali možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu) nebo Proactive and Run Monitoring (Proaktivní podpora a sledování běhu), zadejte své přihlašovací údaje k účtu BaseSpace Sequence Hub a poté vyberte možnost **Sign In** (Přihlásit).
4. Pokud jste vybrali možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu), vyberte pracovní skupinu BaseSpace Sequence Hub, do které chcete uložit běh, a poté vyberte možnost **Next** (Další).

 Aby se předešlo chybám, je nutné vybrat pracovní skupinu. Před pokračováním vyberte pracovní skupinu.

5. Vyberte možnost **Choose...** (Zvolit) v části Start With Sample Sheet (Začít se seznamem vzorků) a přejděte k seznamu vzorků s formátováním verze 2 v přístroji NextSeq 1000/2000, na přenosném disku nebo na připojeném síťovém disku. Názvy souborů seznamu vzorků nesmí obsahovat zvláštní znaky.

Řídící software NextSeq 1000/2000 verze 1.3 automaticky zjistí verzi softwaru DRAGEN ze seznamu vzorků a v případě potřeby vás požádá o přepnutí verzí. Příslušná verze softwaru DRAGEN musí být nainstalována v systému. Další informace o instalaci naleznete v části [Aktualizace softwaru na straně 74](#).

- **Instrument Run Setup Used** (Nastavení běhu přístroje použito). Vyberte soubor se složkou .zip obsahující seznam vzorků verze 2 a případné podpůrné soubory. V opačném případě vyberte seznam vzorků verze 2.
- **Instrument Run Setup Not Used** (Nastavení běhu přístroje nepoužito). Ujistěte se, že se podpůrný soubor se sekundární analýzou nachází ve stejném adresáři jako seznam vzorků verze 2.



- i** | Vybraný seznam vzorků musí mít formát verze 2. Pokud chcete vytvořit seznam vzorků verze 2, stáhněte si vygenerovaný seznam vzorků z nabídky Instrument Run Setup (Nastavení běhu přístroje) v prostředí BaseSpace Sequence Hub nebo upravte šablonu seznamu vzorků verze 2 poskytnutou na stránce podpory systému NextSeq 1000/2000. Další informace o formátování seznamu vzorků verze 2 a požadavcích na něj naleznete v části [Nastavení seznamu vzorků verze 2 na straně 86](#). Ujistěte se, že případné soubory odkazované v seznamu vzorků se nacházejí ve stejné složce jako seznam vzorků.
6. Vyberte možnost **Review** (Kontrola).
  7. **[Volitelný postup]** Zadejte umístění vlastních prumerů pro čtení a vlastních indexačních prumerů. Další informace o přípravě a přidávání vlastních prumerů naleznete v *Příručce pro vlastní primery systémů NextSeq 1000 a 2000 (dokument č. 1000000139569)*. Navštivte stránku Compatible Products (Kompatibilní produkty) použité sady pro přípravu knihoven a zkontrolujte, zda je nutné použít vlastní primery Illumina.
  8. **[Volitelný postup]** Vyberte vlastní návod. Další informace naleznete v části [Sekvenování v režimu tmy na straně 100](#).  
Pokud používáte řídicí software NextSeq 1000/2000 verze 1.3 se sadou Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus nebo Illumina Stranded mRNA Prep, je vlastní návod vybrán automaticky.
  9. **[Volitelný postup]** Pokud chcete knihovny denaturovat a zředit ručně, zrušte zaškrtnutí políčka **Denaturovat a zředit v přístroji**. Viz *Příručka pro denaturaci a ředění knihoven systémů NextSeq 1000 a 2000 (dokument č. 1000000139235)*.  
Výchozí výběr se konfiguruje v nastavení řídicího softwaru NextSeq 1000/2000.
  10. **[Volitelný postup]** Pokud chcete změnit výstupní složku, vyberte pole Output Folder (Výstupní složka) a zadejte nové umístění.  
Pole Output Folder (Výstupní složka) je automaticky vyplněno podle výchozích nastavení a jeho vyplnění je povinné, pokud není vybrána možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu).  
Pokud jste vybrali možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu), zobrazí se v poli Save to BaseSpace Sequence Hub (Uložit do prostředí BaseSpace Sequence Hub) hodnota Enabled (Povoleno).  
Pokud jste vybrali možnost Proactive and Run Monitoring (Proaktivní podpora a sledování běhu), zobrazí se v poli Save to BaseSpace Sequence Hub (Uložit do prostředí BaseSpace Sequence Hub) hodnota Disabled (Zakázáno).
  11. Zkontrolujte informace o běhu a poté vyberte možnost **Prep** (Příprava).

## Spuštění samostatného běhu

1. Nakonfigurujte režim běhu podle popisu v části [Konfigurace režimu běhu na straně 20](#).
2. Vyberte možnost **Start** (Spustit).

3. Pokud jste vybrali možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu) nebo Proactive and Run Monitoring (Proaktivní podpora a sledování běhu), zadejte své přihlašovací údaje k účtu BaseSpace Sequence Hub a poté vyberte možnost **Sign In** (Přihlásit).
4. Pokud jste vybrali možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu), vyberte pracovní skupinu BaseSpace Sequence Hub, do které chcete uložit běh, a poté vyberte možnost **Next** (Další).
5. Vyberte možnost **Set Up New Run** (Nastavit nový běh).
6. V poli Run Name (Název běhu) zadejte preferovaný jedinečný název k identifikaci aktuálního běhu. Název běhu může obsahovat alfanumerické znaky, pomlčky a podtržítka.
7. V poli Read Type (Typ čtení) vyberte počet čtení sekvenování, který má být proveden:
  - **Single Read** (Jedno čtení): Provede jedno čtení, což je jednodušší a rychlejší možnost.
  - **Paired End** (S párovými konci): Provede dvě čtení, která přinesou data vyšší kvality a přesnější zarovnání.
8. Zadejte počet cyklů provedených v každém čtení:  
Neexistuje žádný maximální počet indexovacích cyklů, avšak součet cyklů čtení a indexovacích cyklů musí být menší než počet cyklů označených na štítku kazety zvýšený o 27.

**Read 1** (Čtení 1). Zadejte hodnotu **1–151** cyklů.

**Index 1.** Zadejte počet cyklů potřebných pro primer Index 1 (i7). Při běhu pouze PhiX zadejte do obou indexových polí hodnotu **0**.

**Index 2.** Zadejte počet cyklů potřebných pro primer Index 2 (i5).

**Read 2** (Čtení 2). Zadejte až **151** cyklů. Tato hodnota je obvykle stejná jako hodnota Read 1 (Čtení 1).

9. Pokud jste vybrali možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu), vyberte možnost **Choose...** (Zvolit) a importujte seznam vzorků.

Řídicí software NextSeq 1000/2000 verze 1.3 automaticky zjistí verzi softwaru DRAGEN ze seznamu vzorků a v případě potřeby vás požádá o přepnutí verzí. Příslušná verze softwaru DRAGEN musí být nainstalována v systému. Další informace o instalaci naleznete v části [Aktualizace softwaru na straně 74](#).

- i** | Vybraný seznam vzorků musí mít formát verze 2. Pokud chcete vytvořit seznam vzorků verze 2, stáhněte si vygenerovaný seznam vzorků z nabídky Instrument Run Setup (Nastavení běhu přístroje) v prostředí BaseSpace Sequence Hub nebo upravte šablonu seznamu vzorků verze 2 poskytnutou na stránce podpory systému NextSeq 1000/2000. Další informace o formátování seznamu vzorků verze 2 a požadavcích na něj naleznete v části [Nastavení seznamu vzorků verze 2 na straně 86](#). Ujistěte se, že případné soubory odkazované v seznamu vzorků se nacházejí ve stejné složce jako seznam vzorků.

10. **[Volitelný postup]** Zadejte umístění vlastních primerů pro čtení a vlastních indexačních primerů. Další informace o přípravě a přidávání vlastních primerů naleznete v *Příručce pro vlastní primery systémů NextSeq 1000 a 2000 (dokument č. 1000000139569)*. Navštivte stránku [Compatible Products](#) (Kompatibilní produkty) použité sady pro přípravu knihoven a zkontrolujte, zda je nutné použít vlastní primery Illumina.
11. **[Volitelný postup]** Vyberte vlastní návod. Další informace naleznete v části [Sekvenování v režimu tmy na straně 100](#)
12. **[Volitelný postup]** Pokud chcete knihovny denaturovat a zředit ručně, zrušte zaškrtnutí políčka **Denaturovat a zředit v přístroji**. Viz *Příručka pro denaturaci a ředění knihoven systémů NextSeq 1000 a 2000 (dokument č. 1000000139235)*.  
Výchozí výběr se konfiguruje v nastavení řídicího softwaru NextSeq 1000/2000.
13. **[Volitelný postup]** Pokud chcete změnit výstupní složku, vyberte pole Output Folder (Výstupní složka) a zadejte nové umístění.  
Pole Output Folder (Výstupní složka) je automaticky vyplněno podle výchozích nastavení a jeho vyplnění je povinné, pokud není vybrána možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu).
14. Vyberte možnost **Prep** (Příprava).

## Vložení spotřebního materiálu do přístroje

1. Ujistěte se, že před vložením do průtokové kvyety (s vyjmutým šedým ouškem) a zředěné knihovny byla kazeta nejprve rozmrazena a 10krát převrácena.
2. Vyberte možnost **Load** (Vložit).  
Řídicí software NextSeq 1000/2000 otevře štít a vysune přihrádku.
3. Umístěte kazetu do přihrádky tak, aby okénko směřovalo vzhůru a průtoková kvjeta byla uvnitř přístroje. Zatlačte kazetu, dokud nezacvakne na místo.



4. Vyberte možnost **Close** (Zavřít), aby se kazeta zasunula a štít zavřel.  
Přibližně po 3 minutách zobrazí řídicí software 1000/2000 informace o naskenovaném spotřebním materiálu.

5. [Volitelný postup] Výběrem možnosti **Eject Cartridge** (Vysunout kazetu) vyjměte kazetu. Štít se po 1 minutě otevře a vysune kazetu.
6. Vyberte možnost **Sequence** (Sekvenovat).

## Kontroly před spuštěním běhu

Kontroly před spuštěním běhu zahrnují kontrolu přístroje a kontrolu průtočných součástí. Při kontrole průtočných součástí dojde k perforaci pečeti kazety, v důsledku čehož přístroj vydá 3 až 4 praskavé zvuky. Toto chování je očekávané. Reagencie nyní projdou skrz průtokovou kvyetu.

**!** | Po spuštění kontroly průtočných součástí není možné znovu použít spotřební materiál.

1. Počkejte přibližně 15 minut, než skončí kontroly před spuštěním běhu. Běh se spustí automaticky po úspěšném dokončení.
2. Pokud při kontrole přístroje dojde k chybě, zopakujte kontrolu výběrem možnosti **Retry** (Opakovat). Když probíhá kontrola, zobrazuje se na animovaný kroužek označující průběh kontroly.
3. Informace k řešení problémů naleznete v části [Řešení chybových zpráv na straně 80](#).

## Sledování postupu běhu

1. Sledujte postup a metriky běhu, které se zobrazují na obrazovce sekvenování.
  - **Estimated run completion** (Odhadované dokončení běhu) – přibližné datum a čas dokončení. Metrika odhadovaného dokončení běhu vyžaduje 10 předchozích běhů, aby bylo možno vypočítat přesný čas dokončení běhu.
  - **Average %Q30** (Průměrné procento s Q30) – průměrná procentuální hodnota přiřazení báze se skóre kvality  $\geq 30$ .
  - **Projected Yield** (Předpokládaná výtěžnost) – očekávaný počet přiřazení báze pro běh.
  - **Total Reads PF** (Celkový počet čtení vyhovujících filtru úspěšnosti) — počet klastrů s párovými konci (pokud jsou relevantní), které vyhovují filtru úspěšností (v milionech).
  - **Real Time Demux** (Demultiplexování v reálném čase) – stav demultiplexování, když je zahájen na počátku čtení 2 po dokončení cyklů čtení 1, indexu 1 a indexu 2. V poli Status (Stav) se zobrazí Complete (Dokončeno), i když nejsou indexovací cykly provedeny. Není k dispozici pro běhy v cloudovém režimu.
  - **Real Time Demux** (Demultiplexování v reálném čase) – stav demultiplexování, když je zahájen na počátku čtení 2 po dokončení cyklů čtení 1, indexu 1 a indexu 2. Není k dispozici pro běhy v cloudovém režimu.

Metrika Q30 a metrika výtěžnosti se zobrazí po skončení cyklu 26 (přibližně 6 hodin po spuštění běhu).

2. Pokud chcete sledovat zpracování běhů, vyberte nabídku řídicího softwaru a pak vyberte možnost **Process Management** (Správa procesů).

3. Pokud chcete zrušit běh, vyberte možnost **End Run** (Ukončit běh). Další informace o rušení běhů naleznete v části [Zrušení běhu na straně 81](#).
4. Vyjměte spotřební materiál z přístroje. Během 3 dnů vyjměte z přístroje kazetu.

## Vyjmutí spotřebního materiálu

1. Po dokončení sekvenování vyberte možnost **Eject Cartridge** (Vysunout kazetu). Software vysune použitou kazetu z přístroje.
2. Vyjměte kazetu z přihrádky.
3. Vyjměte průtokovou kyvetu z kazety.
4. Zlikvidujte průtokovou kyvetu, která má elektronické součásti, v souladu s předpisy platnými ve vaší zemi.
5. [Volitelný postup] Vyjměte výpustnou zátku pod logem Illumina na boční straně kazety nad příslušnou oblastí (tj. výlevkou nebo výpustí pro kapalný nebezpečný odpad). Při vyjímání držte zátku vodorovně nebo dolů od svého obličeje. Vypusťte použité reagenty v souladu s platnými předpisy. Pokud není povoleno automatické čištění reagentů, závisí doba vypouštění na velikosti kazety.

**!** Tato sada reagentů obsahuje potenciálně nebezpečné chemické látky. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagenty nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi. Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete na bezpečnostních listech (SDS) na stránce [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

6. Zlikvidujte kazetu s reagenty.  
Omytí po běhu není třeba, protože průtočné součásti jsou zlikvidovány společně s kazetou.
7. Pokud chcete přihrádku vložit zpět a vrátit se na domovskou obrazovku, vyberte možnost **Close Door** (Zavřít dvířka).  
Software automaticky zasune přihrádku a senzory potvrdí vyjmutí kazety.

## Čištění přihrádky na kazetu

Čištění přihrádky na kazetu je nutné pouze tehdy, pokud se na ni vylije reagenty.

1. Vyjměte kazetu z přístroje.
2. Nasadte si nové nepudrované rukavice a případné další ochranné prostředky.
3. Nastříkejte 10% bělicí roztok na hadřík.
4. Vytřete přihrádku na kazetu hadříkem a poté pevnými utěrkami ihned odstraňte bělicí roztok. Pokud bělicí přípravek není odstraněn ihned, způsobí odbarvení přihrádky na kazetu.

5. Nastříkejte 70% roztok etanolu na přihrádku na kazetu a ihned jej setřete pevnou utěrkou.
6. Vraťte přihrádku na kazetu zpět do polohy pro vložení.

# Výstupní data sekvenování

V této části je popsán software Real-Time Analysis. Tento software provádí přiřazení báze, přiřazuje skóre kvality a zajišťuje výstup dat. Dozvíte se, jaké jsou různé typy výstupních souborů a kde je po dokončení běhu hledat.

## Přehled softwaru Real-Time Analysis

Sekvenační systémy NextSeq 1000 a NextSeq 2000 využívají software RTA3, který je implementací softwaru Real-Time Analysis na výpočetním modulu (CE) přístroje. Software RTA3 extrahuje intenzity z obrazů získaných z kamery, přiřazuje báze, přiřazuje skóre kvality k přiřazením bází, provádí zarovnání s kontrolou PhiX a vykazuje data v souborech InterOp pro účely zobrazení v řídicím softwaru přístroje.

Za účelem optimalizace doby zpracování ukládá software RTA3 informace do paměti. Dojde-li k ukončení softwaru RTA3, zpracování nepokračuje a případná zpracovávaná data běhu jsou z paměti ztracena.

### Vstupy softwaru RTA3

Software RTA3 vyžaduje, aby byly v místní paměti systému obrazy dlaždic za účelem zpracování. Software RTA3 přijímá informace o běhu a příkazy z řídicího softwaru.

### Výstupy softwaru RTA3

Obrazy pro každý kanál jsou v paměti předávány do softwaru RTA3 jako dlaždice. Z těchto obrazů vytváří software RTA3 jako výstup sadu souborů přiřazení báze a souborů filtrů se skóre kvality. Všechny ostatní výstupy jsou podpůrné výstupní soubory.

Typ souboru	Popis
Soubory přiřazení báze	Každá analyzovaná dlaždice je uvedena v souboru zřetězeného přiřazení báze (*.cbcl). Dlaždice ze stejné cesty a povrchu jsou agregovány do jednoho souboru *.cbcl pro každou cestu a povrch.
Soubory filtrů	Každá dlaždice produkuje soubor filtru (*.filter). Ten určuje, zda klastr prochází filtry.
Soubory umístění klastrů	Soubory umístění klastrů (*.locs) obsahují koordináty X a Y pro každý klastr v dlaždici. Soubor umístění klastrů se vytváří pro každý běh.

Výstupní soubory slouží k následné analýze v systému DRAGEN a prostředí BaseSpace Sequence Hub.

## Řešení chyb

Software RTA3 vytváří soubory protokolů a zapisuje je do složky Logs (protokoly). Chyby jsou zaznamenávány do textového souboru ve formátu \*.log.

Následující soubory protokolu jsou na konci zpracování přesunuty do finální výstupní složky:

Soubor `info_00000.log` shrnuje důležité události běhu.

Soubor `error_00000.log` obsahuje chyby, ke kterým došlo během běhu.

Soubor `warning_00000.log` obsahuje varování, ke kterým došlo během běhu.

## Dlaždice průtokové kyvety

Dlaždice jsou malé zobrazovací oblasti na průtokové kyvetě. Kamera pořizuje jeden obraz na každou dlaždici.

Průtoková kyveta NextSeq 1000/2000 P2 má celkem 132 dlaždic. Průtoková kyveta NextSeq 1000/2000 P3 má celkem 264 dlaždic.

Tabulka 5 Dlaždice průtokové kyvety

Komponenta průtokové kyvety	Průtoková kyveta NextSeq 1000/2000 P2	Průtoková kyveta NextSeq 1000/2000 P3	Popis
Cesty	1	2	Cesty jsou opticky rozlišitelné, nejsou to však průtočně oddělené kanály.
Povrchy	2	2	Průtokové kyvety P2 a P3 jsou snímány na dvou površích – na horním a dolním. Horní povrch dlaždice je nasnímán jako první.
Záběry na cestu	6	6	Záběr představuje sloupec v cestě průtokové kyvety.
Dlaždice na záběr	11	11	Dlaždice je část záběru, která znázorňuje zobrazovanou oblast na průtokové kyvetě.
Celkový počet vygenerovaných dlaždic	132	264	Celkový počet dlaždic se rovná součinu cesty × povrchy × záběry × dlaždice na záběr.



## Pojmenování dlaždic

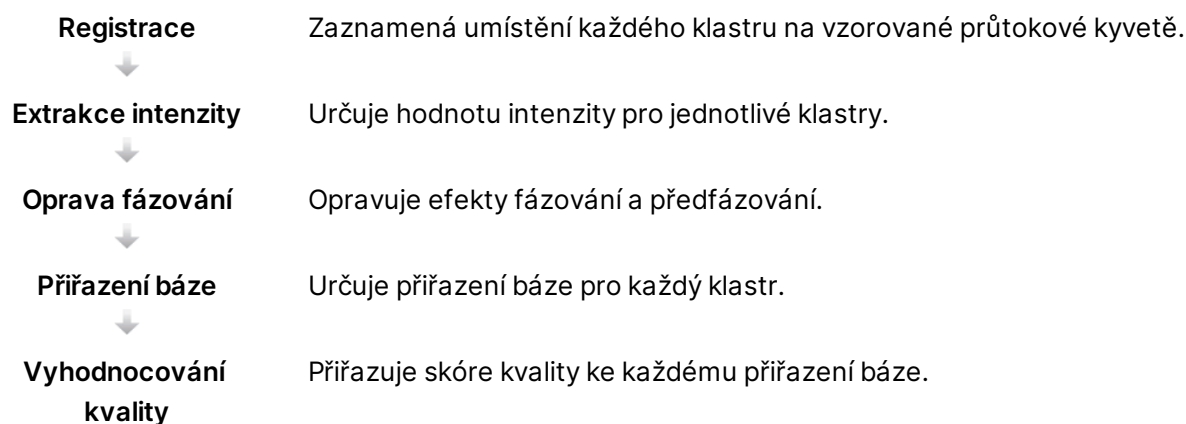
Název dlaždice je čtyřmístné číslo, které představuje polohu dlaždice na průtokové kyvetě. Například název dlaždice 1205 označuje horní povrch, záběr 2, dlaždici 05.

První číslice představuje povrch: 1 znamená horní povrch, 2 spodní.

Druhá číslice představuje číslo záběru: 1, 2, 3, 4, 5 nebo 6.

Poslední dvě číslice představují číslo dlaždice. Pro čísla záběrů 1–4 začíná číslování číslem 01 na výstupním konci průtokové kyvety a končí číslem 11 na vstupním konci. Pro čísla záběrů 5–6 začíná číslování číslem 01 na vstupním konci a končí číslem 11 na výstupním konci.

## Pracovní postup softwaru Real-Time Analysis



### Registrace

Registrace zarovná obraz k otočené čtvercové oblasti nanoprvků na vzorované průtokové kyvetě. Z důvodu seřazeného uspořádání nanoprvků jsou souřadnice X a Y pro každý klastr v dlaždici předem určeny. Polohy klastrů jsou zapsány pro každý běh v souboru umístění klastrů (.locs).

Pokud se u některých obrazů v cyklu registrace nezdaří, pro dotyčnou dlaždici v cyklu se nevytvoří žádná přiřazení databáze. Pomocí prohlížeče Sequencing Analysis Viewer můžete určit, které obrazy se nepodařilo registrovat.

### Extrakce intenzity

Extrakce intenzity vypočítá po registraci hodnotu intenzity pro každý nanoprvěk v daném obraze. Pokud se registrace nezdaří, nelze intenzitu dané dlaždice extrahovat.

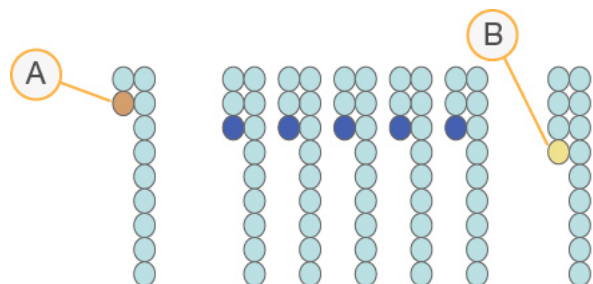
### Oprava fázování

Během sekvenační reakce se jednotlivá vlákna DNA v klastru prodlouží o jednu bázi na cyklus. K fázování a předfázování dochází, když se vlákno dostane mimo fázi s aktuálním cyklem začleňování.

K fázování dochází, když se báze zpozdí.

K předfázování dochází, když báze poskočí dopředu.

Obrázek 5 Fázování a předfázování



A. Čtení s bází, která fázuje.

B. Čtení s bází, která předfázuje.

Modul RTA3 opravuje účinky fázování a předfázování, což maximalizuje kvalitu dat v každém cyklu během běhu.

## Přiřazení báze

Přiřazení báze určuje bázi (A, C, G nebo T) pro každý klastr dané dlaždice v konkrétním cyklu.

Sekvenační systémy NextSeq 1000 a NextSeq 2000 využívají dvoukanálové sekvenování. Toto sekvenování vyžaduje pouze dva obrazy k zakódování dat pro čtyři báze DNA, jednu ze zeleného kanálu a jednu z modrého kanálu.

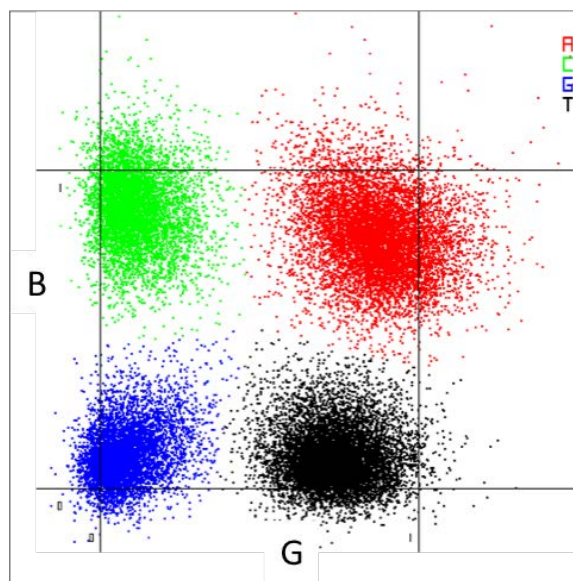
Pokud nedojde k přiřazení, je to označeno jako N. K nepřičazení dochází, když klastr nevyhoví filtru, když se nezdaří registrace nebo když se klastr posune mimo obraz.

Intenzity jednotlivých klastrů jsou extrahovány ze zelených a modrých obrazů a vzájemně porovnány. Výsledkem jsou čtyři samostatné populace. Každá populace odpovídá bázi. Proces přiřazení báze určuje, do které populace jednotlivé klastry patří.

Tabulka 6 Přiřazení báze při dvoukanálovém sekvenování

Báze	Zelený kanál	Modrý kanál	Výsledek
A	1 (přítomno)	1 (přítomno)	Klastry, které vykazují intenzitu v zelených i modrých kanálech.
C	0 (nepřítomno)	1 (přítomno)	Klastry, které vykazují intenzitu pouze v modrém kanále.
G	0 (nepřítomno)	0 (nepřítomno)	Klastry, které nevykazují intenzitu v žádném známém umístění klastrů.
T	1 (přítomno)	0 (nepřítomno)	Klastry, které vykazují intenzitu pouze v zeleném kanále.

Obrázek 6 Vizualizace intenzit klastrů



**i** Barva každého klastru koresponduje s grafy %Base v prohlížeči Sequence Analysis Viewer (SAV) a daty běhu podle cyklu v prostředí BaseSpace Sequence Hub. Není smyslem, aby barvy korespondovaly se zeleným a modrým kanálem.

### Klastry vyhovující filtru úspěšnosti

Během běhu model RTA3 filtruje nezpracovaná data, aby odebral čtení, která nedosahují prahové hodnoty kvality dat. Klastry, které se překrývají nebo mají nízkou kvalitu, budou odebrány.

V případě dvoukanalové analýzy využívá software RTA3 systém založený na populacích, aby určil ryzost (míru intenzity čistoty) přiřazení báze. Klastry projdou filtrem (PF), když v prvních 25 cyklech maximálně jedno přiřazení báze nedosáhne pevné prahové hodnoty ryzosti. Pokud je součástí zarovnání PhiX, provede se ve 26. cyklu na podskupině dlaždic u klastrů, které vyhověly filtru. Na klastry, které filtrem neprojdou, se nepoužije přiřazení báze a nebudou zarovnány.

### Skóre kvality

Skóre kvality představuje předpověď pravděpodobnosti nesprávného přiřazení báze. Vyšší skóre kvality naznačuje, že přiřazení báze má vyšší kvalitu a s větší pravděpodobností bude správné. Po stanovení skóre kvality se výsledky zaznamenají do souborů přiřazení báze (\*.cbcl).

Skóre kvality stručnou formou informuje o pravděpodobnosti malých chyb. Skóre kvality je uváděno ve formě  $Q(X)$ , kde  $X$  je příslušné skóre. Následující tabulka ukazuje vztah mezi skórem kvality a pravděpodobností chyby.

Skóre kvality Q(X)	Pravděpodobnost chyby
Q40	0,0001 (1 z 10 000)
Q30	0,001 (1 z 1 000)
Q20	0,01 (1 ze 100)
Q10	0,1 (1 z 10)

## Vyhodnocování a vykazování kvality

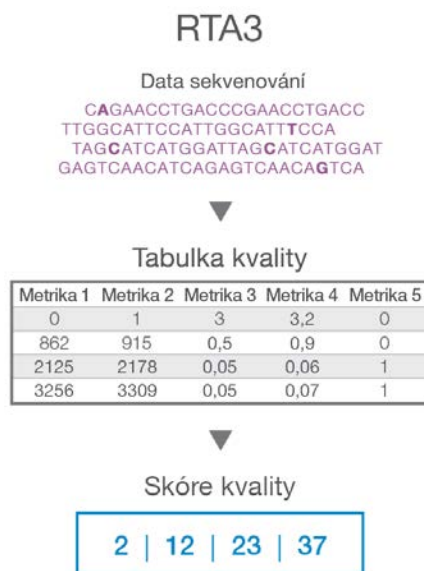
Vyhodnocování kvality vypočítá sadu předpovědí pro jednotlivá přiřazení báze a potom hodnoty indicií použije k vyhledání skóre kvality v tabulce kvality. Tabulky kvality jsou vytvořeny tak, aby poskytovaly optimálně přesné předpovědi kvality pro běhy generované prostřednictvím specifické konfigurace platformy pro sekvenování a verze chemického složení.



Vyhodnocování kvality je založeno na upravené verzi algoritmu programu Phred.

Za účelem vytvoření tabulky kvality pro sekvenační systémy NextSeq 1000 a NextSeq 2000 byly určeny tři skupiny přiřazení báze založené na klastrování těchto specifických prediktivních funkcí. Po seskupení přiřazení báze byla empiricky vypočtena střední hodnota chyby pro každou ze třech skupin a příslušná skóre kvality byla zaznamenána v tabulce kvality společně s prediktivními funkcemi vztaženými k dané skupině. Z tohoto důvodu jsou v softwaru RTA3 možná pouze tři skóre kvality. Tato skóre kvality představují průměrnou hodnotu chyby skupiny ([Zjednodušené vyhodnocení kvality pomocí softwaru RTA3 na straně 61](#)). Výsledkem je zjednodušené, přesto velmi přesné vyhodnocení kvality. Tyto tři skupiny v tabulce kvality odpovídají meznímu (Q15), střednímu (~Q20) a kvalitnímu (> Q30) přiřazení báze a jsou jim přiřazena konkrétní skóre kvality 12, 23 a 37. Případům bez přiřazení báze je přiřazeno „nulové“ skóre 2. Tento model vykazování skóre kvality snižuje požadavky na velikost úložiště a šířku pásma, aniž by to mělo vliv na přesnost nebo výkon.

Obrázek 7 Zjednodušené vyhodnocení kvality pomocí softwaru RTA3



## Výstupní soubory sekvenování

Typ souboru	Popis souboru, umístění a název
Soubory zřetěženého přiřazení báze	<p>Každý analyzovaný klastr je zahrnut v souboru zřetěženého přiřazení báze, v němž jsou data agregovaná do jednoho souboru pro každý cyklus, cestu a povrch. Agregovaný soubor obsahuje zřetěžené přiřazení báze a kódované skóre kvality pro každý klastr. Soubory zřetěženého přiřazení báze jsou používány prostředím BaseSpace Sequence Hub nebo softwarem bcl2fastq2.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1 L[cesta]_[povrch].cbcl, například L001_1.cbcl</p>
Soubory umístění klastrů	<p>Pro každou průtokovou kyvetu existuje binární soubor umístění klastrů, který obsahuje souřadnice XY klastrů v dlaždici. Souřadnice jsou předem určeny šestihranným uspořádáním, které odpovídá uspořádání nanoprvků průtokové kyvety.</p> <p>Data/Intenzity s_[cesta].locs</p>
Soubory filtrů	<p>Soubor filtru vymezuje, zda klastr projde filtry. Soubory filtrů jsou vytvářeny ve 26. cyklu a využívají data z předchozích 25 cyklů. Pro každou dlaždici je vytvořen jeden soubor filtru.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001 s_[cesta]_[dlaždice].filter</p>

Typ souboru	Popis souboru, umístění a název
Soubory InterOp	Binární soubory vykazování lze zobrazit v přístroji pomocí řídicího softwaru přístroje nebo mimo přístroj v prohlížeči SAV nebo prostředí BaseSpace Sequence Hub. Soubory InterOp jsou aktualizovány v průběhu běhu. Složka InterOp
Soubor s informacemi o běhu	Uvádí název běhu, počet cyklů v každém čtení, informaci o tom, zda je toto čtení čtením indexů, a počet záběrů a dlaždic na průtokové kyvetě. Soubor s informacemi o běhu se vytváří na začátku běhu. [Kořenová složka], RunInfo.xml

## Výstupní soubory sekundární analýzy DRAGEN

Platforma DRAGEN Bio-IT podrobněji analyzuje výstup sekvenování v přístroji pomocí jednoho z následujících plánů analýzy.

- BCL Convert
- Germline
- RNA
- Enrichment
- Single Cell RNA
- DNA Amplicon

V této části jsou uvedeny informace o každém plánu DRAGEN včetně informací o výstupních souborech. Kromě toho, že software DRAGEN generuje soubory specifické pro každý plán, poskytuje metriky z analýzy v souboru `<název_vzorku>.metrics.json` a výkazy popsané v části [Plán DRAGEN BCL Convert na straně 67](#). Další informace o softwaru DRAGEN naleznete na [stránce podpory platformy DRAGEN Bio-IT](#).

Všechny plány DRAGEN podporují dekomprimování vstupních souborů BCL a komprimování výstupních souborů BAM/CRAM.

Informace o výstupních souborech:

- Pokud jsou v rámci analýzy v přístroji prováděny plány Germline, RNA, Enrichment a DNA Amplicon, nebudou soubory BAM nahrány do prostředí BaseSpace Sequence Hub, je-li vybrána možnost Proactive, Run Monitoring and Storage (Proaktivní podpora, sledování a ukládání běhu).

### Plán DRAGEN Enrichment

Plán DRAGEN Enrichment podporuje následující funkce: Pokud používáte software DRAGEN 3.7 nebo novější, je podporován germinální i somatický režim (jen nádor).

- Demultiplexování vzorku
- Přiřazení a zarovnání včetně seřazení a označení duplikátů

- Přiřazení malých variant
- Přiřazení strukturních variant

Aby bylo možno provést přiřazení varianty, musí být soubor \*.bed součástí seznamu vzorků nebo musí být zadán v nastavení Instrument Run Setup (Nastavení běhu přístroje) v prostředí BaseSpace Sequence Hub. Přiřazení strukturních variant se generuje pouze pro čtení párových konců a germinální režim.

Pokud používáte software DRAGEN Enrichment verze 3.8 nebo novější, můžete zadáním souboru s definicí základní úrovně šumu vylepšit výkonnost v somatickém režimu. Viz část [Import souborů s definicí základní úrovně šumu na straně 18](#).

Plán generuje následující výstupní soubory.

Komponenta	Typ	Název výstupního souboru
Přiřazení/zarovnání	BAM nebo CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.bam nebo</li> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.cram</li> </ul>
Přiřazení malých variant	VCF a gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>
Přiřazení strukturních variant	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.sv.vcf.gz</li> </ul>

\* Výstupní soubory gVCF jsou k dispozici pouze pro germinální režim.

## Plán DRAGEN Germline

Plán DRAGEN Germline podporuje následující funkce:

- Demultiplexování vzorku
- Přiřazení a zarovnání včetně seřazení a označení duplikátů
- Přiřazení malých variant
- Přiřazení strukturních variant pro čtení párových konců
- Přiřazení variant počtu kopií u lidských genomů
- Expanze repetice u lidských genomů
- Oblasti homozygoty u lidských genomů
- **[DRAGEN verze 3.8 nebo novější]** Detekce cytochromu CYP2D6

Přiřazení strukturních variant se generuje pouze pro čtení párových konců.

Plán generuje následující výstupní soubory.

Komponenta	Typ	Název výstupního souboru
Přiřazení/zarovnání	BAM nebo CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>&lt;název_vzorku&gt;.bam nebo</li> <li>&lt;název_vzorku&gt;.cram</li> </ul>
Přiřazení malých variant	VCF a gVCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>&lt;název_vzorku&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>&lt;název_vzorku&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>
Detekční program pro strukturní varianty	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>&lt;název_vzorku&gt;.sv.vcf.gz</li> </ul>
Variety počtu kopií	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>&lt;název_vzorku&gt;.cnv.vcf.gz</li> </ul>
Expanze repetice	VCF	<ul style="list-style-type: none"> <li>&lt;název_vzorku&gt;.repeats.vcf.gz</li> </ul>
Oblasti homozygosity	CSV a BED	<ul style="list-style-type: none"> <li>&lt;název_vzorku&gt;.roh_metrics.csv</li> <li>&lt;název_vzorku&gt;.roh.bed</li> </ul>
Detekce cytochromu CYP2D6	TSV	<ul style="list-style-type: none"> <li>&lt;název_vzorku&gt;.cyp2d6.tsv</li> </ul>

## Plán DRAGEN DNA Amplicon

Plán DRAGEN podporuje následující funkce:

- Demultiplexování vzorku
- Přiřazení a zarovnání včetně seřazení a označení duplikátů
- Přiřazení malých variant v germinálním nebo somatickém režimu.

Aby bylo možno provést přiřazení varianty, musí být soubor \*.bed součástí seznamu vzorků nebo musí být zadán v nastavení Instrument Run Setup (Nastavení běhu přístroje) v prostředí BaseSpace Sequence Hub.

Plán generuje následující výstupní soubory.

Komponenta	Typ	Název výstupního souboru
Přiřazení/zarovnání	BAM nebo CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>&lt;název_vzorku&gt;.bam nebo</li> <li>&lt;název_vzorku&gt;.cram</li> </ul>
Přiřazení malých variant	VCF a gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> <li>&lt;název_vzorku&gt;.hard-filtered.gvcf.gz</li> <li>&lt;název_vzorku&gt;.hard-filtered.vcf.gz</li> </ul>

\* Výstupní soubory gVCF jsou k dispozici pouze v germinálním režimu.



## Plán DRAGEN RNA

Plán DRAGEN RNA podporuje následující funkce:

- Demultiplexování vzorku
- Přiřazení a zarovnání včetně seřazení a označení duplikátů
- Detekce fúze genu
- Kvantifikace přepisu
- **[DRAGEN verze 3.8 nebo novější]** Diferenciální exprese genů

Pokud chcete vygenerovat výstupní soubory, zadejte v seznamu vzorků soubor GTF nebo se ujistěte, že je s referenčním genomem k dispozici výchozí soubor `genes.gtf.gz`.

Plán generuje následující výstupní soubory.

Komponenta	Typ	Název výstupního souboru	Popis
Přiřazení/zarovnání	BAM nebo CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.bam nebo</li> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.cram</li> </ul>	Výstup zarovnání splňující specifikace SAM.
Detekce fúze genu	Běžný text	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.fusion_candidates.preliminary</li> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.fusion_candidates.final</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kandidáti na fúzi před použitím filtrů.</li> <li>• Kandidáti na fúzi po použití filtrů.</li> </ul>
Kvantifikace přepisu	Běžný text	<ul style="list-style-type: none"> <li>• název_vzorku.quant.genes.sf</li> <li>• název_vzorku.quant.sf</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Výsledky kvantifikace přepisu na úrovni genu.</li> <li>• Všechny výsledky kvantifikace přepisu.</li> </ul>
Diferenciální exprese	PNG	Viz následující tabulka výstupních souborů diferenciální exprese.	Aby bylo možné generovat výstupní soubory, musí být v seznamu vzorků nastaveno porovnání.

Následující soubory se generují, když je povolena diferenciální exprese.

Název souboru	Popis
Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv	Obsahuje metriky analýzy diferenciální exprese.
Control_vs_Comparison.genes.counts.csv	Popisuje počet čtení přiřazených ke každému genu pro každý vzorek v kontrolní a porovnávací skupině.
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Tepelná mapa exprese diferenciálně vyjádřených genů pro vzorky v kontrolní a porovnávací skupině. Tepelná mapa znázorňuje pouze diferenciálně vyjádřené geny s upravenou P-hodnotou $\leq 0,05$ . Pokud existuje více než 30 diferenciálně vyjádřených genů, použije se pouze prvních 30 diferenciálně vyjádřených genů. Pokud se programu DESeq1 nepodaří zkonvergovat nebo neexistují žádné diferenciálně vyjádřené geny, soubor se nevytvorí.
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Obsahuje variaci poměrů exprese genů jako funkci průměrné intenzity signálu. Aby se znázornily rozdíly mezi měřeními na dvou vzorcích, transformuje graf data na stupnici M (logaritmický poměr) a stupnici A (střední hodnota) a poté vykreslí hodnoty. Graf MA znázorňuje relativní míry exprese (fold change) na stupnici $\log_2$ , které lze přisoudit dané proměnné přes střední hodnotu normalizovaných počtů všech vzorků. Pokud je upravená P-hodnota menší než 0,1, jsou body červené. Body, které spadají mimo okno, jsou vykresleny jako trojúhelníky bez výplně. Trojúhelníky s vrcholem nahoru představují kladnou relativní logaritmickou míru exprese (fold change). Trojúhelníky s vrcholem dolů představují zápornou relativní logaritmickou míru exprese (fold change).
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	Graf znázorňuje první dvě hlavní komponenty, které vysvětlují nejvýznamnější varianci.
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Obsahuje výsledky analýzy DESeq2, která popisuje střední expresi, $\log_2$ (relativní míra exprese – „fold change“), standardní chyba $\log_2$ , P-hodnota, upravená P-hodnota a stav exprese každého genu.

Název souboru	Popis
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Obsahuje regularizované počty transformované na logaritmickou stupnici a vypočtené programem DESeq2.

## Plán DRAGEN Single Cell RNA

Plán DRAGEN podporuje následující funkce:

- Demultiplexování vzorku
- Přiřazení a zarovnání včetně seřazení a označení duplikátů
- Klasifikace buněk a genů

Pokud chcete vygenerovat výstupní soubory, zadejte v seznamu vzorků soubor GTF nebo se ujistěte, že je s referenčním genomem k dispozici výchozí soubor `genes.gtf.gz`.

Plán generuje následující výstupní soubory.

Komponenta	Typ	Název výstupního souboru
Přiřazení/zarovnání	BAM nebo CRAM	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.bam nebo</li> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.cram</li> </ul>
Klasifikace buněk/genů	TSV, CSV a MTX	<ul style="list-style-type: none"> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.scRNA.barcodeSummary.tsv</li> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.scRNA.genes.tsv</li> <li>• &lt;název_vzorku&gt;.scRNA.matrix.mtx</li> </ul>
Výkazy analýzy	HTML	<název_vzorku>.dragen.scrna-report.*.html

## Plán DRAGEN BCL Convert

Plán DRAGEN BCL Convert využívá data BCL generovaná z běhu sekvenování a informací v seznamu vzorků k vytvoření výstupního souboru FASTQ pro každý vzorek. Název souboru FASTQ je <název\_vzorku>.fastq.gz.

Plán generuje následující výkazy.

Komponenta	Typ	Název výstupního souboru
Demultiplexování	CSV	• Demultiplex_Stats.csv
Metriky adaptéru	CSV	• Adapter_Metrics.csv
Přeskakování indexů	CSV	• Index_Hopping_Counts.csv
Nejpočetnější neznámé čárové kódy	CSV	• Top_Unknown_Barcodes.csv

## Statistický výkaz demultiplexování

Statistický výkaz demultiplexování obsahuje informace o počtu čtení vyhovujících filtru úspěšnosti, která jsou přiřazena jednotlivým vzorkům v seznamu vzorků. Případná čtení, která nejsou jednoznačně přiřazena ke vzorku, jsou klasifikována jako neurčená. Výkaz obsahuje také informace o skóre kvality bází ve čteních vyhovujících filtru úspěšnosti přiřazených jednotlivým vzorkům.

Uvedeny jsou následující informace.

Metrika	Popis
Lane	Cesta na průtokové kyvetě, na které byl sekvenován vzorek.
SampleID	ID vzorku ze seznamu vzorků. Pokud čtení neodpovídá vzorku, zobrazuje se v poli hodnota <code>undetermined</code> (neurčeno).
Index	Spojení čtení indexů 1 a čtení indexů 2 ze seznamu vzorků oddělených pomlčkou. Pokud čtení neodpovídá vzorku, zobrazuje se v poli hodnota <code>undetermined</code> (neurčeno).
# Reads	Počet čtení, které vyhověly filtru úspěšnosti, demultiplexované pro vzorek v zadané cestě.
# Perfect Index Reads	Počet čtení s dokonalou shodou s kombinovanými sekvencemi indexů uvedenými v seznamu vzorků.
# One Mismatch Index Reads	Počet čtení s jednou chybou v kombinovaných sekvencích indexů uvedených v seznamu vzorků.
# of $\geq$ Q30 Bases (PF)	Počet bází včetně adaptérů, které odpovídají čtením, která vyhověla prahové hodnotě kvality Q30.
Mean Quality Score (PF)	Střední hodnota skóre kvality pro čtení, která odpovídají vzorku v zadané cestě. Hodnota zahrnuje báze adaptérů.

## Výkazy metrik adaptéru

Soubor metrik adaptéru obsahuje číslo adaptéru a báze vzorku přidružené k jednotlivým čtením.

Uvedeny jsou následující informace.

Metrika	Popis
Lane	Cesta na průtokové kyvetě, na které byl sekvenován vzorek.
Sample_ID	ID vzorku ze seznamu vzorků. Pokud čtení neodpovídá vzorku, zobrazuje se v poli hodnota <code>undetermined</code> (neurčeno).
index	Sekvence indexu 1 ze seznamu vzorků. Pole je prázdné, pokud index nebyl zadán v seznamu vzorků nebo pokud je hodnota ID vzorku <code>undetermined</code> (neurčeno).

Metrika	Popis
index2	Sekvence indexu 2 ze seznamu vzorků. Pole je prázdné, pokud index 2 nebyl zadán v seznamu vzorků nebo pokud je hodnota ID vzorku <code>undetermined</code> (neurčeno).
R1_ AdapterBases	Počet bází odpovídající hodnotě AdapterRead1 v seznamu vzorků.
R1_ SampleBases	Počet oříznutých nebo zamaskovaných bází ze čtení 1 pro příslušnou cestu a vzorek.
R2_ AdapterBases	Počet bází odpovídající hodnotě AdapterRead2 v seznamu vzorků.
R2_ SampleBases	Počet oříznutých nebo zamaskovaných bází ze čtení 2 pro příslušnou cestu a vzorek.
# Reads	Počet čtení vzorku v zadané cestě.

### Výkaz počtů přeskoků indexů

Výkaz počtů přeskoků indexů obsahuje počet čtení pro každý očekávaný a přeskočený index v případě běhů s dvojitým indexováním. Výkaz obsahuje pouze jedinečné dvojité indexy na cestu, u nichž není pro žádný z indexů detekována kolize čárového kódu. Aby bylo možné generovat metriky přeskokování indexů pro určitou cestu, musí mít každý pár záznamů v rámci každého indexu Hammingovu vzdálenost nejméně  $2N + 1$ , kde  $N$  představuje toleranci neshody čárového kódu stanovenou pro index.

Uvedeny jsou následující informace.

V případě běhů bez indexu, běhů s jedním indexem nebo cest, které neobsahují jedinečné dvojité indexy, obsahuje soubor pouze hlavičky.

Metrika	Popis
Lane	Cesta na průtokové kyvetě, na které byl sekvenován vzorek.
# Reads	Počet čtení vzorku v zadané cestě.
SampleID	ID vzorku ze seznamu vzorků. Pokud čtení neodpovídá vzorku, zobrazuje se v poli hodnota <code>undetermined</code> (neurčeno).
index	Sekvence indexu 1 ze seznamu vzorků. Pole je prázdné, pokud je čtení prováděno z jednoho konce nebo pokud má ID vzorku hodnotu <code>undetermined</code> (neurčeno).
index2	Sekvence indexu 2 ze seznamu vzorků. Pole je prázdné, pokud je čtení prováděno z jednoho konce nebo pokud má ID vzorku hodnotu <code>undetermined</code> (neurčeno).

## Výkaz nejpočetnějších neznámých čárových kódů

Výkaz nejpočetnějších neznámých čárových kódů obsahuje 100 nejčastějších indexů nebo párů indexů na cestu, které nebyly identifikovány v seznamu vzorků, podle počtu povolených neshod. Pokud existuje více hodnot indexu umístěných jako 100. nejvyšší záznam počtu indexů, budou všechny hodnoty indexu se stejným počtem uvedeny ve výstupu jako 100. záznam.

Uvedeny jsou následující informace:

Metrika	Popis
Lane	Cesta na průtokové kyvetě, na které byl sekvenován vzorek.
index	Sekvence pro každý neznámý index ve čtení indexů 1. Pole je prázdné, pokud nejsou nalezeny žádné neznámé indexy.
index2	Sekvence pro každý neznámý index ve čtení indexů 2. Pokud byl běh založen na jednom čtení nebo nebyly nalezeny žádné neznámé indexy, je pole prázdné.
# Reads	Počet čtení vzorku v zadané cestě.

## Výkazy kontroly kvality Illumina DRAGEN

Ve výchozím nastavení generuje software DRAGEN FastQC pro všechny plány grafy kontroly kvality. Agregované výsledky kontroly kvality jsou uloženy ve složce `AggregatedFastqcMetrics` a výsledky podle jednotlivých vzorků jsou uloženy ve složce `<název_vzorku>`.

Výkazy kontroly kvality se nevytvářejí, pokud je počet vzorků vyšší než 512.

K dispozici jsou následující grafy kontroly kvality.

Graf kontroly kvality	Popis
adapter_content	Procentuální poměr sekvencí pro každý bázeový pár.
positional_mean_quality	Průměrné skóre kvality báze na stupnici Phred pro každou pozici čtení.
gc_content	Procentuální poměr obsahu GC pro každé čtení sekvenování.
positional_quality.read_1	Průměrná hodnota kvality na stupnici Phred pro báze s konkrétním nukleotidem a na dané pozici ve čtení 1.
gc_quality	
positional_quality.read_2	Průměrná hodnota kvality na stupnici Phred pro báze s konkrétním nukleotidem a na dané pozici ve čtení 2.
n_content	
read_length	Délka sekvence pro každé čtení.

Graf kontroly kvality	Popis
positional_base_content.read_1	Počet bází každého konkrétního nukleotidu na daných pozicích ve čtení 1.
read_quality	Průměrné skóre kvality báze na stupnici Phred pro každou pozici čtení.
positional_base_content.read_2	Počet bází každého konkrétního nukleotidu na daných pozicích ve čtení 2.

## Struktura výstupní složky sekundární analýzy DRAGEN

Ve výchozím nastavení software DRAGEN generuje výstupní soubory ve výstupní složce vybrané na kartě Settings (Nastavení). Pro každý pracovní postup generuje software DRAGEN souhrnný výkaz v souboru `report.html`.

### 📁 Data

📄 `report.html`

📄 `report_files`

### 📁 AggregateFastQCPlots

📄 `*.png`

📄 `*stderr.txt`

📄 `*stdout.txt`

📄 `dragen_prev_48_hrs.log`

📄 `dln_prev_48_hrs.log`

📄 `SampleSheet.csv`

📄 Vstupní soubory běhu (např. soubory BED, GTF)

### 📁 název\_vzorku

📁 `enrich_caller , germline_seq, dna_amplicon_seq, rna_seq` nebo `scrna_seq`

#### 📁 název\_vzorku

📄 `*.png`

📄 `dragen_*.log`

📄 `název_vzorku.*.metrics.csv`

📄 `[DNA] název_vzorku.*.vcf.gz`

📄 `[DNA] název_vzorku.*.gvcf.gz`: **Není k dispozici pro plán Amplicon (somatický) platformy DRAGEN Bio-IT.**

📄 `název_vzorku.*.bam` nebo `název_vzorku.*.cram`

- 📄 Protokoly
- 📄 [RNA] název\_vzorku.fusion\_candidates.filter\_info
- 📄 [RNA] název\_vzorku.fusion\_candidates.final
- 📄 [RNA] název\_vzorku.quant.genes.sf
- 📄 [RNA] název\_vzorku.quant.sf
- 📄 název\_vzorku.metrics.json
- 📄 [scRNA] sample\_dragen-scRNA-report.\*.html
- 📄 [scRNA] název\_vzorku.scRNA.barcodeSummary.tsv
- 📄 [Germline] název\_vzorku.roh\_metrics.csv
- 📄 [Germline] název\_vzorku.roh.bed
- 📄 [Germline] název\_vzorku.cyp2d6.tsv
- 📄 název\_vzorku.fastqc\_metrics.csv
- 📄 název\_vzorku.trimmer\_metrics.csv

#### 📁 [RNA] DifferentialExpression

##### 📁 Comparison1

- 📄 Control\_vs\_Comparison.differential\_expression\_metrics.csv
- 📄 Control\_vs\_Comparison.genes.counts.csv
- 📄 Control\_vs\_Comparison.genes.disp.pdf
- 📄 Control\_vs\_Comparison.genes.heatmap.pdf
- 📄 Control\_vs\_Comparison.genes.ma.pdf
- 📄 Control\_vs\_Comparison.genes.pca.pdf
- 📄 Control\_vs\_Comparison.genes.res.csv
- 📄 Control\_vs\_Comparison.genes.rlog.csv

##### 📁 ComparisonN

##### 📁 protokoly

- 📄 \*.txt
- 📄 \*.csv

📁 **fastq**: K dispozici pouze tehdy, pokud je parametr KeepFastq nastaven na hodnotu pravda.

- 📄 \*.fastq.gz

📁 **ora\_fastq**: K dispozici pouze tehdy, pokud je parametr FastqCompressionFormat nastaven na hodnotu dragen.



📄 \*.fastq.ora

📁 **RunInstrumentAnalyticsMetrics**

📁 **0001**

📄 dataset.json

📄 fastqc\_metrics.csv

📁 **0002**

📄 dataset.json

📄 fastqc\_metrics.csv

📄 Adapter\_Metrics.csv

📄 Demultiplex\_Stats.csv

📄 Index\_Hopping\_Counts.csv

📁 **Reports**

📄 Demultiplex\_Stats.csv

📄 RunInfo.xml

📄 Trim\_Metrics.csv

📄 fastq\_list.csv

📄 SampleSheet.csv

📄 Index\_Hopping\_Counts.csv

📄 Top\_Unknown\_Barcodes.csv

📁 **Read1InstrumentAnalyticsMetrics: Pouze pro čtení párových konců.**

📁 **0001**

📄 dataset.json

📁 **0002**

📄 dataset.json

📄 Adapter\_Metrics.csv

📄 Demultiplex\_Stats.csv

📄 Index\_Hopping\_Counts.csv

📁 **Read1Metrics: Pouze pro čtení párových konců.**

📄 Adapter\_Metrics.csv


📄 Index\_Hopping\_Counts.csv

# Údržba

V této části jsou popsány postupy potřebné k udržení systému v dobrém stavu. Naučíte se instalovat aktualizace softwaru, vyměnit vzduchový filtr a provádět další postupy pravidelné údržby. Aktualizací řídicího softwaru zajistíte nejnovější opravy chyb a instalaci funkcí k dosažení optimálního výkonu.

## Uvolnění místa na pevném disku

Běh sekvenování vyžaduje přibližně 200 GB místa na místním disku. Když je na disku málo místa, zobrazí se varování. K uvolnění místa použijte následující postup, který spočívá v odstranění dokončených běhů a nainstalovaných referenčních genomů z dočasné složky běhů.

 Běhy odstraňujte pouze pomocí řídicího softwaru NextSeq 1000/2000. Nepoužívejte ruční odstraňování v operačním systému. Ruční odstranění běhů může mít nepříznivý vliv na řídicí software.

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Disk Management** (Správa disku). Zobrazí se obrazovka Disk Management (Správa disku) se seznamem běhů a referenčních genomů uložených na místním pevném disku.
2. U běhu, který chcete odstranit, vyberte možnost **Delete Run** (Odstranit běh). Odstranění běhu odstraní místní složku běhu. Výstupní složka, která je kopií složky běhu, zůstane zachována.
3. Výběrem možnosti **Yes, Delete Run** (Ano, odstranit běh) v dialogovém okně potvrďte odstranění běhu.
4. U každého běhu, který chcete odstranit, opakujte kroky 2 a 3.
5. U genomu, který chcete odstranit, vyberte možnost **Delete Genome** (Odstranit genom).
6. V dialogovém okně vyberte možnost **Yes, Delete Genome** (Ano, odstranit genom).
7. U každého genomu, který chcete odstranit, opakujte kroky 5 a 6.
8. Po skončení zavřete obrazovku Disk Management (Správa disku) a vraťte se na domovskou obrazovku.

## Aktualizace softwaru

Aktualizace softwaru zajišťuje, že váš systém bude mít nejnovější funkce a opravy. Aktualizace softwaru jsou začleněny do systémové sady, která obsahuje následující software:

- Řídicí software NextSeq 1000/2000
- Návody NextSeq 1000/2000

- Universal Copy Service
- Real-Time Analysis

**i** | Moduly DRAGEN nejsou součástí systémové sady. Nainstalujte je samostatně podle potřeby. K softwaru modulu DRAGEN lze přistupovat ze stránek podpory.

Systém je nakonfigurován tak, aby stahoval aktualizace softwaru automaticky nebo ručně:

- **Automatic updates** (Automatické aktualizace) – aktualizace k instalaci jsou stahovány automaticky z prostředí BaseSpace Sequence Hub. Tato možnost vyžaduje připojení k internetu, ale není nutný účet BaseSpace Sequence Hub.
- **Manual updates** (Ruční aktualizace) – aktualizace se stahují ručně z webu, ukládají se místně nebo na přenosný disk a instalují se z místa uložení. Tato možnost nevyžaduje, aby byl přístroj připojen k internetu.

### Automatická instalace aktualizace softwaru


1. Ujistěte se, že neprobíhají žádné běhy sekvenování ani sekundární analýza v přístroji.
2. Přihlaste se k účtu ilmnadmin.
3. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Software Update** (Aktualizace softwaru). Systémy nastavené na automatické aktualizace zobrazují upozornění, pokud je k dispozici aktualizace softwaru.
4. Pokud chcete zkontrolovat dostupnost aktualizace, vyberte možnost **Check Online for Software Update** (Zkontrolovat aktualizaci softwaru online).
5. Výběrem možnosti **Update** (Aktualizovat) stáhněte novou verzi softwaru. Po dokončení stahování se řídicí software ukončí a zobrazí se průvodce instalací. Řídicí software se automaticky restartuje. Veškeré aktualizace firmwaru proběhnou automaticky po restartování.

**i** | Po zahájení instalace nelze aktualizaci zrušit. Aktualizaci lze zrušit pouze během stahování.

### Ruční instalace aktualizace softwaru

1. Přihlaste se k účtu ilmnadmin.
2. Ujistěte se, že neprobíhají žádné běhy sekvenování ani sekundární analýza v přístroji.
3. Pokud je k dispozici aktualizace softwaru, stáhněte instalační program sady (\*.tar.gz) ze [stránky podpory sekvenačního systému NextSeq 1000 a NextSeq 2000](#). Uložte instalační program na místní nebo přenosný disk.
4. Pokud jste instalační program uložili na přenosný disk, připojte disk k portu USB 3.0, který se nachází na boční a zadní straně přístroje.
5. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Software Update** (Aktualizace softwaru).

6. Výběrem možnosti **Browse** (Procházet) vyhledejte instalační program.
7. Výběrem možnosti **Update Now** (Aktualizovat) spusťte instalaci.  
Řídicí software zobrazuje během instalace ukazatel zaneprázdnění.  
Řídicí software se automaticky restartuje. Veškeré aktualizace firmwaru proběhnou automaticky po restartování.

 Po zahájení instalace nelze aktualizaci zrušit. Aktualizaci lze zrušit pouze během stahování.

## Aktualizace pracovních postupů a licence DRAGEN

Oprávnění instalovat pracovní postupy DRAGEN a obnovovat licence DRAGEN mají pouze správci systému.

### Obnovení licence DRAGEN online

Pokud je systém NextSeq 1000/2000 připojený k internetu, aktualizujte licenci k platformě DRAGEN Bio-IT následujícím postupem.

1. Požádejte technickou podporu společnosti Illumina o nový licenční klíč.
2. Vyčkejte 24 hodin na automatickou aktualizaci licence nebo aktualizujte licenci okamžitě postupem níže.
  - a. Vyberte nabídku řídicího softwaru a pak vyberte možnost **DRAGEN**.
  - b. Pokud chcete zkontrolovat dostupnost nového licenčního klíče DRAGEN, vyberte možnost **Check Online** (Zkontrolovat online).
  - c. Je-li dostupný, vyberte možnost **Update** (Aktualizovat).

### Obnovení licence DRAGEN offline

Pokud je systém NextSeq 1000/2000 připojený k internetu, aktualizujte licenci k platformě DRAGEN Bio-IT následujícím postupem.

1. Požádejte technickou podporu společnosti Illumina o nový licenční klíč. Uložte soubor `license.zip` na místní nebo přenosný disk.
2. Pokud jste soubor `*.zip` uložili na přenosný disk, připojte disk k portu USB 3.0, který se nachází na boční a zadní straně přístroje. Podle potřeby jemně posuňte přístroj tak, abyste dosáhli na zadní stěnu.
3. Vyberte nabídku řídicího softwaru a pak vyberte možnost **DRAGEN**.
4. Vyberte možnost **Choose** (Zvolit) a přejděte k souboru `*.zip`. Potom vyberte možnost **Open** (Otevřít).

## Instalace pracovních postupů DRAGEN online

Pokud je systém NextSeq 1000/2000 připojený k internetu, můžete instalovat pracovní postupy DRAGEN přímo v řídicím softwaru NextSeq 1000/2000. Instalace pracovních postupů DRAGEN je dostupná pouze v řídicím softwaru NextSeq 1000/2000 verze 1.3.

1. Vyberte nabídku řídicího softwaru a pak vyberte možnost **Process Management** (Řízení procesu).
2. Ujistěte se, že neprobíhají žádné běhy sekvenování ani sekundární analýza v přístroji.
3. Vyberte nabídku řídicího softwaru a pak vyberte možnost **DRAGEN**.  
V oblasti Version (Verze), části Available Workflows (Dostupné pracovní postupy), je uveden seznam pracovních postupů, které jsou aktuálně instalované v systému.
4. Pokud chcete instalovat pracovní postupy DRAGEN v řídicím softwaru NextSeq 1000/2000, vyberte možnost **Check Online** (Zkontrolovat online).  
S instalací online nejsou kompatibilní všechny verze a pracovní postupy softwaru DRAGEN. Pro další pracovní postupy použijte instalaci offline.
5. Zaškrtněte políčka u pracovních postupů, které chcete instalovat. Pokud nemáte nainstalovaný plán BCL Convert, nejprve nainstalujte jeho poslední verzi.  
Informace o nejnovější verzi pracovního postupu naleznete v poznámkách k vydání.
6. Výběrem možnosti **Install** (Instalovat) spusťte instalaci.
7. Zadejte ilmnadmin, abyste mohli zadat systémové heslo, a poté vyberte možnost **Authenticate** (Ověřit).

## Instalace pracovních postupů DRAGEN offline

1. Když je k dispozici aktualizace pracovního postupu DRAGEN, stáhněte si instalační program (\*.tar.gz) ze [stránky podpory softwaru DRAGEN](#). Uložte instalační program na místní nebo přenosný disk.
2. Pokud jste instalační program uložili na přenosný disk, připojte disk k portu USB 3.0, který se nachází na boční a zadní straně přístroje. Podle potřeby jemně posuňte přístroj tak, abyste dosáhli na zadní stěnu.
3. Vyberte nabídku řídicího softwaru a pak vyberte možnost **Process Management** (Řízení procesu).
4. Ujistěte se, že neprobíhají žádné běhy sekvenování ani sekundární analýza v přístroji.
5. Vyberte nabídku řídicího softwaru a pak vyberte možnost **DRAGEN**.
6. V části Version (Verze) vyberte možnost **Browse for New Version** (Vyhledat novou verzi) a přejděte k instalačnímu programu.
7. Výběrem možnosti **Install** (Instalovat) spusťte instalaci.
8. Zadejte ilmnadmin, abyste mohli zadat systémové heslo, a poté vyberte možnost **Authenticate** (Ověřit).

## Výměna vzduchového filtru

Při výměně vzduchového filtru s prošlým datem použitelnosti, která se provádí každých 6 měsíců, postupujte podle níže uvedených pokynů.

Vzduchový filtr je jednorázová obdélníková kazeta, která zakrývá ventilátor na pravé straně přístroje. Zajišťuje správné chlazení a brání vniku nečistot do systému. Přístroj je dodáván s nainstalovaným vzduchovým filtrem a s jedním náhradním filtrem. Další náhradní díly jsou dodány v případě platné smlouvy na servis přístroje nebo je lze zakoupit samostatně od společnosti Illumina.

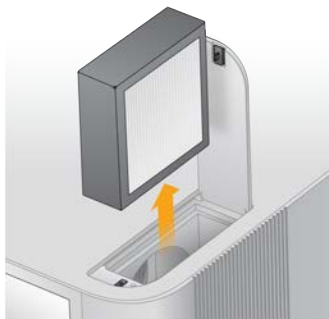
1. Na horní straně přístroje stiskněte pravou stranu horního panelu, který se tím uvolní (jak je znázorněno na následujícím obrázku).



2. Otevřete panel.



3. Zatlačením uvolněte kazetu vzduchového filtru. Vyjměte ji ze středu panelu a vyhoďte ji.



4. Vložte do zásuvky nový vzduchový filtr a stisknutím ho zajistěte.

5. Zavřete horní panel a zatlačte jej na místo.



6. Vraťte přístroj na původní místo.

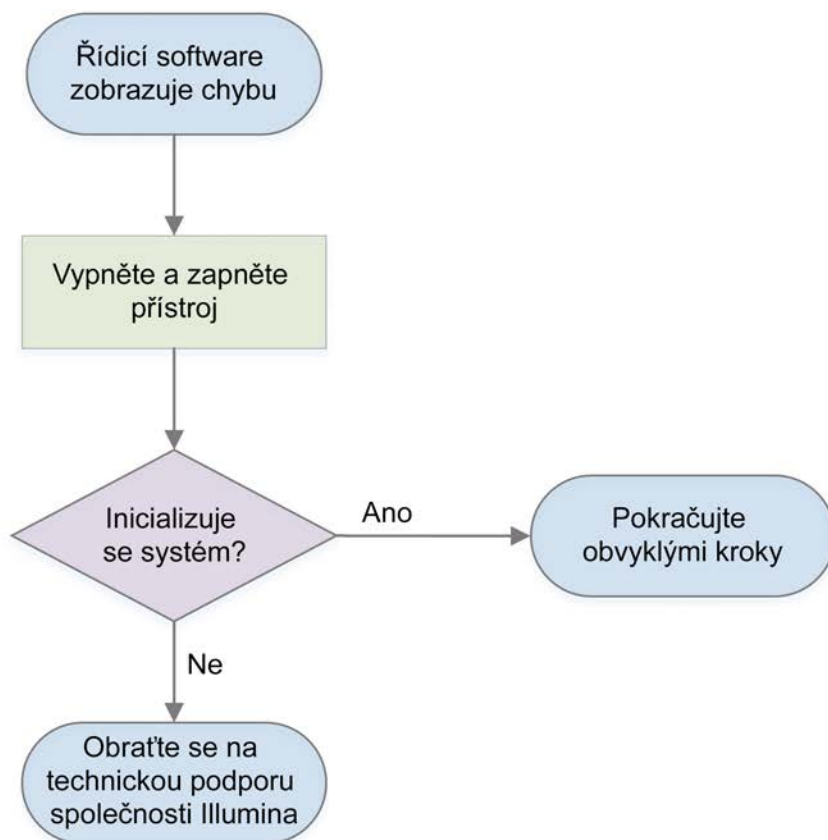
# Řešení problémů

V této části jsou uvedeny podrobné pokyny ke zrušení běhu, vypnutí a zapnutí přístroje a další postupy řešení problémů.

## Řešení chybových zpráv

Tato příloha obsahuje podrobné pokyny k různým krokům při řešení problémů. Následující vývojový diagram poskytuje přehled řešení problémů při zobrazení chybových zpráv, které se zobrazují během inicializace, při nastavování běhu nebo sekvenování a které se nepodaří opravit opakovaním pokusu.

Mnoho chyb lze vyřešit vypnutím a zapnutím přístroje. Další informace o vypnutí a zapnutí přístroje naleznete v části [Vypnutí a zapnutí přístroje na straně 82](#).





## Vrácení spotřebního materiálu do skladovacího prostoru

Pokud dojde k chybě přístroje během kontroly přístroje před během před kontrolou průtokových součástí, řiďte se při ukládání rozmrazené kazety a průtokové kyvetu následujícími pokyny.

1. Oddělte průtokovou kyvetu od kazety.
2. Vyjměte zředěnou knihovnu ze zásobníku (až přibližně 18 µl) a vyhod'te ji.

**!** Připravte čerstvé zředění stejné knihovny pro následující běh, abyste se vyhnuli křížové kontaminaci způsobené zbytkem knihovny v zásobníku.

3. Vložte kazetu do chladničky s teplotou 2 až 8 °C štítkem vzhůru tak, aby mohl vzduch cirkulovat po všech stranách.  
Nepřekračujte dobu 72 hodin. Pokud byla kazeta rozmrazována v chladničce přes noc po dobu 12 hodin, nepřekračujte dobu 60 hodin.
4. Vraťte průtokovou kyvetu do původního obalu ze stříbrné fólie s desikantem.
5. Uzavřete balení páskou a vložte ji do skladovacího prostoru o teplotě 2 až 8 °C.  
Nepřekračujte dobu 72 hodin.

## Zrušení běhu

1. Vyberte možnost **End Run** (Ukončit běh).
2. Pokud chcete automaticky vyčistit kazetu s reagensy, zaškrtněte políčko **Purge Reagent Cartridge** (Vyčistit kazetu s reagensy).  
Výchozí výběr se konfiguruje v nastavení řídicího softwaru NextSeq 1000/2000.
3. Vyberte možnost **Yes, end the sequencing run** (Ano, ukončit běh sekvenování).  
Zrušení běhu je konečné. Software již nemůže v běhu pokračovat a spotřební materiál nelze po kontrole přístrojů před během opětovně použít.
4. Výběrem možnosti **Eject Cartridge** (Vysunout kazetu) otevřete dvířka a vysuňte přihrádku.
5. Vyjměte kazetu z přihrádky.
6. Kazetu uskladněte nebo zlikvidujte v závislosti na tom, kdy ke zrušení došlo:

Situace	Postup
Ke zrušení došlo před kontrolou před spuštěním běhu v přístroji nebo během něj a chcete znovu použít spotřební materiál.	Viz část <a href="#">Vrácení spotřebního materiálu do skladovacího prostoru na straně 81</a> .
Všechny ostatní situace.	Viz část <a href="#">Vyjmutí spotřebního materiálu na straně 53</a> .

7. Pokud chcete přihrádku vložit zpět a vrátit se na domovskou obrazovku, vyberte možnost **Close Door** (Zavřít dvířka).  
Snímače potvrdí vyjmutí kazety.

## Opětovné zařazení běhu

Pokud se v části Status of Secondary Analysis (Stav sekundární analýzy) v nastavení Process Management (Správa procesu) zobrazí chyba, můžete běh znovu zařadit do fronty, abyste mohli znovu provést analýzu DRAGEN v přístroji pomocí vygenerovaných souborů cBCL. Původní složka běhu musí být stále v přístroji dostupná, aby bylo možno využít funkci opětovného zařazení běhu. Pokud je použita tato funkce opětovného zařazení běhu, nejsou běhy znovu zařazeny v prostředí BaseSpace Sequence Hub. Pokud chcete běhy znovu zařadit v prostředí BaseSpace Sequence Hub, postupujte podle tématu Fix Sample Sheet (Oprava seznamu vzorků) v centru nápovědy BaseSpace Sequence Hub.

1. Aktualizujte seznam vzorků verze 2 a poté jej uložte na přenosný nebo připojený síťový disk.
2. Pokud jste seznam vzorků uložili na přenosný disk, připojte disk k portu USB 3.0, který se nachází na boční a zadní straně přístroje. Podle potřeby jemně posuňte přístroj tak, abyste dosáhli na zadní stěnu.
3. Vyberte nabídku řídicího softwaru a pak vyberte možnost **Process Management** (Řízení procesu).
4. Ujistěte se, že neprobíhají žádné běhy sekvenování ani sekundární analýzy v přístroji.
5. Vyberte možnost **Requeue** (Znovu zařadit) vedle dokončeného běhu, který chcete znovu zařadit do fronty.
6. Vyberte možnost **Choose** (Zvolit) a přejděte k aktualizovanému seznamu vzorků. Potom vyberte možnost **Open** (Otevřít).
7. Vyberte možnost **Start Requeue** (Spustit opětovné zařazení).

## Vypnutí a zapnutí přístroje

Proces vypnutí a zapnutí přístroje bezpečně vypne a znovu spustí systém, čímž obnoví ztracené připojení, zarovná specifikaci nebo vyřeší chybu inicializace. Softwarové zprávy upozorní na nutnost vypnutí a zapnutí přístroje, když je potřeba vyřešit chybu nebo varování.

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **Shut Down Instrument** (Vypnout přístroj).
2. Pokud se systém nevypne, přidržte stisknutý vypínač na pravé straně přístroje, dokud nezhasnou kontrolky.
3. Když vypínač bliká, stiskněte na přepínači na zadním panelu stranu umožňující vypnutí (**O**).  
Vypínač může dále blikat i po vypnutí napájení.

Obrázek 8 Umístění přepínače



4. Počkejte 30 sekund.
5. Stiskněte na přepínači stranu umožňující zapnutí (I).
6. Když začne vypínač blikat, počkejte 30 sekund a stiskněte ho.

Obrázek 9 Umístění vypínače



7. Počkejte přibližně 5 minut na zavedení operačního systému. Po zavedení operačního systému se přihlaste do systému.  
Spustí se řídicí software a provede inicializaci systému. Počkejte přibližně 5 minut na inicializaci systému. Po dokončení inicializace se zobrazí domovská obrazovka.

## Provedení kontroly systému

Při běžném provozu nebo údržbě přístroje není kontrola systému zapotřebí. V případě problému vás však může o provedení kontroly systému požádat zástupce technické podpory společnosti Illumina.

Čtyři kontroly subsystémů trvají přibližně 58 minut a zjišťují se během nich chyby kontroly před během a další problémy. Tyto testy ověřují, zda jsou komponenty řádně zarovnané a funkční.

Výsledky testů jsou uloženy do výstupní složky `system-check` v cestě `/usr/local/illumina/system-check`.

Před spuštěním kontrol systému musíte vyjmout kazetu.

## Spuštění kontroly systému

1. V nabídce řídicího softwaru vyberte možnost **System Checks** (Kontroly systému).
2. Zaškrtněte políčka u následujících kontrol systému, které chcete provést.
  - **Network Connectivity** (Připojení k síti). Zkontroluje stav a výkon připojení k síti.
  - **Enclosure** (Kryt). Zkontroluje účinnost tepelného systému a mechanismu zvedání štítu.
  - **Motion** (Pohyb). Zkontroluje limity pohyblivosti a výkonu úseku Z a úseku XY.
  - **Optics** (Optika). Zkontroluje výkon zobrazovacího modulu.
3. Vyberte možnost **Start** (Spustit).

## Obnovení do továrního nastavení


Pokud chcete přejít na nižší verzi softwaru nebo chcete provést obnovení z nevyhovující konfigurace, proveďte obnovení do továrního nastavení. Tuto funkci smí použít pouze zástupce společnosti Illumina.

## Vytvoření bitové kopie instalace

Vytvořením bitové kopie systému získáte zálohu úspěšné funkční instalace softwaru. Tuto bitovou kopii systému lze později obnovit. Doporučuje se vytvořit bitovou kopii systému ve spolupráci se zástupcem společnosti Illumina ihned po dokončení počáteční instalace a změně hesla.

1. Restartujte systém Linux.
2. Když se zobrazí výzva k volbě operačního systému, vyberte možnost **Capture Installed Image** (Vytvořit bitovou kopii instalace).

Před automatickým spuštěním řídicího softwaru NextSeq 1000/2000 se krátce zobrazí možnosti operačního systému.

 Protože v paměti se uchová pouze jedna bitová kopie, tato akce přepíše dříve vytvořenou bitovou kopii.
3. Počkejte přibližně 30 sekund, než systém vytvoří bitovou kopii aktuální instalace.

Během vytváření se může počítač několikrát restartovat. Po dokončení se systém restartuje a v paměti bude uložena bitová kopie aktuální instalace.

## Obnovení uložené bitové kopie

Obnovením systému na dříve uloženou bitovou kopii lze systém zotavit z nežádoucí konfigurace.

1. Restartujte systém Linux.
2. Když se zobrazí výzva k volbě operačního systému, vyberte možnost **Capture Installed Image** (Vytvořit bitovou kopii instalace).

Před automatickým spuštěním řídicího softwaru NextSeq 1000/2000 se krátce zobrazí možnosti operačního systému.

- i** | Hesla jsou svázána s bitovou kopií systému. Po obnovení použijte k přihlášení do systému heslo z obnovené bitové kopie.
3. Počkejte přibližně 30 minut, než se dokončí obnovení.  
Součástí obnovení může být několik restartování. Po dokončení se systém restartuje ve stavu odpovídajícímu obnovené bitové kopii.

# Literatura

## Nastavení seznamu vzorků verze 2

V následujícím místním režimu můžete pomocí souboru se seznamem vzorků s formátováním verze 2 nakonfigurovat nastavení běhu. Seznam vzorků vytvořte v nabídce Instrument Run Setup (Nastavení běhu přístroje) nebo úpravou *šablony seznamu vzorků verze 2 pro sekvenační systémy NextSeq 1000 a NextSeq 2000*. Při úpravě seznamu vzorků se ujistěte, že jsou v něm uvedeny následující části a pole v uvedeném pořadí a že splňují požadavky. Po dokončení úprav přesuňte seznam vzorků do sekvenačního systému NextSeq 1000 nebo NextSeq 2000 pomocí přenosného disku nebo připojeného síťového disku. Když v řídicím softwaru vyhledáte seznam vzorků, je zkopírován do složky pro soubory před během v přístroji, aby bylo možno odpojit přenosný disk.

Dbejte na to, aby nastavení seznamu vzorků verze 2 splňovalo následující požadavky:

- Sekvence indexu uvedené v seznamu vzorků v části BCLConvert\_Data musí odpovídat indexační sadě vybrané v systému NextSeq 1000/2000.
- Pokud používáte řídicí software NextSeq 1000/2000 verze 1.2, musí být nainstalována verze softwaru DRAGEN uvedená v seznamu vzorků a tato verze musí být v systému aktivní. Další informace o instalaci naleznete v části [Aktualizace softwaru na straně 74](#).
- Pokud používáte řídicí software NextSeq 1000/2000 verze 1.3, musí být nainstalována verze softwaru DRAGEN uvedená v seznamu vzorků. Řídicí software automaticky zjistí verzi softwaru DRAGEN ze seznamu vzorků a v případě potřeby vás požádá o přepnutí verzí. Další informace o instalaci naleznete v části [Aktualizace softwaru na straně 74](#).

Pokud používáte software DRAGEN, musíte nakonfigurovat další nastavení. Další informace naleznete v části [Nastavení seznamu vzorků DRAGEN na straně 90](#)

Stáhněte si šablonu seznamu vzorků verze 2 v části Product Files (Produktové soubory) na stránce podpory pro sekvenační systémy NextSeq 1000 a NextSeq 2000. Pokud jste vytvořili seznam vzorků pomocí nabídky Instrument Run Setup (Nastavení běhu přístroje), může vést změna seznamu vzorků po jeho prvním stažení k selhání analýzy.

Názvy souborů nesmí obsahovat zvláštní znaky.

### Požadavky na část [Header]

Část [Header] obsahuje celkové informace o běhu. Níže jsou uvedena pole dostupná v části [Header] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
FileFormatVersion	Ano	Verze seznamu vzorků. Zadejte hodnotu 2.
RunName	Ne	Zadejte jedinečný název běhu. Pole RunName může obsahovat pouze alfanumerické znaky, pomlčky, podtržítka a tečky. Pokud pole RunName obsahuje mezery nebo zvláštní znaky, analýza se nezdaří.
RunDescription	Ne	Popis běhu.
InstrumentPlatform	Ne	NextSeq 1000/2000
InstrumentType	Ne	NextSeq 1000/2000

### Požadavky na část [Reads]

Část [Reads] popisuje počet cyklů sekvenování použitých pro genomické čtení a čtení indexů 1 a 2. Níže jsou uvedena dostupná pole [Reads] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
Read1Cycles	Ano	Počet cyklů v prvním čtení. Hodnota musí být celé číslo větší než nula.
Read2Cycles	Ne	Počet cyklů ve druhém čtení.
Index1Cycles	Ne	Počet cyklů v prvním čtení indexů. Hodnota je požadována, pokud je sekvenován více než jeden vzorek. Maximální hodnota je 10 cyklů.
Index2Cycles	Ne	Počet cyklů ve druhém čtení indexů. Maximální hodnota je 10 cyklů.

## Požadavky na část [Sequencing\_Settings]

Pomocí části [Sequencing\_Settings] můžete zadat sadu pro přípravu knihoven, kterou používáte.

Pole	Povinné	Popis
LibraryPrepKits	Ne	<p>Použitá sada pro přípravu knihoven. Povolena je pouze jedna sada pro přípravu knihoven.</p> <p>V řídicím softwaru NextSeq 1000/2000 verze 1.3 je požadovaný vlastní návod vybrán automaticky, pokud je jako sada pro přípravu knihoven zadána sada Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus nebo sada Illumina Stranded mRNA Prep.</p> <p>Zadejte jednu z následujících hodnot.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• V případě sady Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus: <code>ILMNStrandedTotalRNA</code></li> <li>• V případě sady Illumina Stranded mRNA Prep: <code>ILMNStrandedmRNA</code></li> </ul>

## Požadavky na plán BCL Convert

Části týkající se plánu BCL convert obsahují informace o převodu dat z formátu BCL na FASTQ. Možnosti plánu BCL convert zahrnují dvě samostatné části: [BCLConvert\_Settings] a [BCLConvert\_Data]. Části BCL convert vyžadují informace o sekvencích indexového adaptéru. Pokud chcete identifikovat kompatibilní sekvence adaptéru pro každé čtení a index, řiďte se dokumentem *Sekvence adaptéru Illumina (dokument č. 1000000002694)*.

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [BCLConvert\_Settings] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
SoftwareVersion	Ano	Verze softwaru DRAGEN aktuálně nainstalovaného v systému. Použijte všechna tři celá čísla uvedená v názvu verze. Například 3.5.7.
BarcodeMismatchesIndex1	Ne	Počet povolených nesouladů mezi prvním čtením indexů a sekvencí indexů. Možné hodnoty jsou 0, 1 a 2. Výchozí hodnota je 1.



Pole	Povinné	Popis
BarcodeMismatchesIndex2	Ne	Počet povolených nesouladů mezi druhým čtením indexů a sekvencí indexů. Možné hodnoty jsou 0, 1 a 2. Výchozí hodnota je 1.
FastqCompressionFormat	Ne	Pokud chcete uložit soubory FASTQ jako soubor *.gz, zadejte <code>gzip</code> . Pokud chcete uložit soubory FASTQ jako soubor *.ora a použít je s dekomprimací DRAGEN, zadejte <code>dragen</code> .
AdapterRead1	Ne	Sekvence pro oříznutí nebo zamaskování od konce čtení 1. Sekvence adaptéru čtení 1 obsahující A, C, G nebo T. Možnost AdapterRead1 ve výchozím nastavení ořízne cykly.
AdapterRead2	Ne	Sekvence pro oříznutí nebo zamaskování od konce čtení 2. Sekvence adaptéru čtení 2 obsahující A, C, G nebo T. Možnost AdapterRead2 ve výchozím nastavení ořízne cykly.
OverrideCycles	Ne	Řetězec sloužící k zadání počtu cyklů UMI a zamaskování cyklů čtení. Povoleny jsou následující hodnoty: <ul style="list-style-type: none"> <li>N: Určuje počet cyklů, které budou ignorovány.</li> <li>Y: Určuje počet cyklů sekvenování.</li> <li>I: Určuje počet indexovacích cyklů.</li> <li>U: Určuje počet cyklů UMI, které mají být oříznuty.</li> </ul> Jednotlivé prvky jsou odděleny středníky. Následují příklady zadání nastavení OverrideCycles. U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [BCLConvert\_Data] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
Sample_ID	Ano	ID vzorku. ID vzorku může obsahovat až 20 alfanumerických znaků, pomlček a podtržítok. V ID se rozlišují malá a velká písmena. Jednotlivé identifikátory oddělte pomlčkami nebo podtržítky. Například Vzorek1-DQB1-022515.
Index	Ne	Sekvence indexů přidružená ke vzorku. Povoleny jsou pouze hodnoty A, C, T, G. Hodnota je požadována, pokud je sekvenován více než jeden vzorek.
Index2	Ne	Druhá sekvence indexů přidružená ke vzorku. Povoleny jsou pouze hodnoty A, C, T, G. Ujistěte se, že jsou sekvence adaptéru druhého indexu (i5) orientovány dopředně. Software DRAGEN během sekundární analýzy automaticky zpětně doplňuje indexy i5.
Lane	Ne	Cesta průtokové kyvety. Cesty jsou reprezentovány jednou celočíselnou hodnotou.

## Nastavení seznamu vzorků DRAGEN

V této části jsou popsány požadavky na seznam vzorků pro každý plán DRAGEN. Přidejte nastavení plánu DRAGEN jako poslední část seznamu vzorků. Můžete použít pouze jeden plán DRAGEN.

Každý plán DRAGEN obsahuje samostatné části pro nastavení a data.

### Požadavky na plán DRAGEN Germline

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [DragenGermline\_Settings] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
SoftwareVersion	Ano	Verze softwaru DRAGEN aktuálně nainstalovaného v systému. Použijte všechna tři celá čísla uvedená v názvu verze. Například 3.5.7. Verze softwaru musí odpovídat verzi uvedené v části BCLConvert_Settings.

Pole	Povinné	Popis
ReferenceGenomeDir	Ano	Název referenčního genomu. Například hg19_alt_aware. Použijte název referenčního genomu umístěného ve složce <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Pokud chcete použít vlastní referenční genom, postupujte podle <i>online nápovědy k aplikaci Reference Builder for Illumina Instruments verze 1.0.0</i> .
MapAlignOutFormat	Ne	Formátování výstupního souboru. Povolené hodnoty jsou bam a cram. Pokud není zadána žádná hodnota, výchozí je žádná.
KeepFastq	Ne	Pokud chcete uložit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>true</code> (pravda). Pokud chcete odstranit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>false</code> (nepravda).

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [DragenGermline\_Data] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
Sample_ID	Ano	ID vzorku. ID vzorku může obsahovat až 20 alfanumerických znaků. V ID se rozlišují malá a velká písmena. Jednotlivé identifikátory oddělte pomlčkami. Například Vzorek1-DQB1-022515. ID vzorků musí odpovídat ID zadaným v části BCLConvert_Data.

## Požadavky na plán DRAGEN RNA

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [DragenGermline\_Settings] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
SoftwareVersion	Ano	Verze softwaru DRAGEN aktuálně nainstalovaného v systému. Použijte všechna tři celá čísla uvedená v názvu verze. Například 3.5.7. Verze softwaru musí odpovídat verzi uvedené v části BCLConvert_Settings.

Pole	Povinné	Popis
ReferenceGenomeDir	Ano	Název referenčního genomu. Například hg38_noalt_with_decoy. Použijte název referenčního genomu umístěného ve složce <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Pokud chcete použít vlastní referenční genom, postupujte podle <i>online nápovědy k aplikaci Reference Builder for Illumina Instruments verze 1.0.0</i> .
RnaGeneAnnotationFile	Ne	Soubor obsahující poznámky ke genu RNA. Povoleny jsou pouze alfanumerické znaky. Pokud soubor není poskytnut, použije se výchozí soubor poznámek, který je součástí zadaného referenčního genomu.
MapAlignOutFormat	Ne	Formátování výstupního souboru. Povolené hodnoty jsou bam a cram. Pokud není zadána žádná hodnota, výchozí je žádná.
KeepFastq	Ne	Pokud chcete uložit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>true</code> (pravda). Pokud chcete odstranit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>false</code> (nepravda).
DifferentialExpressionEnable	Ne	Pokud chcete povolit diferenciální expresi genu, zadejte <code>true</code> (pravda). Zadejte <code>false</code> (nepravda), pokud chcete z analýzy vyloučit diferenciální expresi genů.

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [DragenRna\_Data] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
Sample_ID	Ano	ID vzorku. ID vzorku může obsahovat až 20 alfanumerických znaků. V ID se rozlišují malá a velká písmena. Jednotlivé identifikátory oddělte pomlčkami. Například Vzorek1-DQB1-022515. ID vzorků musí odpovídat ID zadaným v části BCLConvert_Data.

Pole	Povinné	Popis
Comparison<N>	Ne	Hodnoty kontroly nebo porovnání pro každý vzorek. Pokud u vzorku není hodnota kontroly nebo porovnání, je vzorku přiřazena hodnota <code>na</code> (není k dispozici). Všechny vzorky označené jako vzorky s kontrolou jsou porovnány se všemi vzorky označenými jako vzorky s porovnáním. Hodnota <code>N</code> odráží porovnávací skupinu vzorků.

## Požadavky na plán DRAGEN Enrichment

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [DragenEnrichment\_Settings] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
SoftwareVersion	Ano	Verze softwaru DRAGEN aktuálně nainstalovaného v systému. Použijte všechna tři celá čísla uvedená v názvu verze. Například 3.5.7. Verze softwaru musí odpovídat verzi uvedené v části BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Ano	Název referenčního genomu. Například hg38_alt_aware. Referenční genomy jsou uloženy ve složce <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Pokud chcete použít vlastní referenční genom, postupujte podle <i>online nápovědy k aplikaci Reference Builder for Illumina Instruments verze 1.0.0</i> .
BedFile	Ano	Soubor BED obsahující oblasti k zacílení.
GermlineOrSomatic	Ano	Pokud chcete provést germinální analýzu Enrichment, zadejte <code>germline</code> . Pokud chcete provést somatickou analýzu Enrichment, zadejte <code>somatic</code> .
KeepFastq	Ne	Pokud chcete uložit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>true</code> (pravda). Pokud chcete odstranit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>false</code> (nepravda).

Pole	Povinné	Popis
MapAlignOutFormat	Ne	Formátování výstupního souboru. Povolené hodnoty jsou bam a cram. Pokud není zadána žádná hodnota, výchozí je žádná.
AuxNoiseBaselineFile	Ne	Název souboru s definicí základní úrovně šumu. Můžete použít soubor ve formátu *.txt nebo *.gz. Soubory s definicí základní úrovně šumu jsou k dispozici pouze v případě použití somatického režimu. Další informace naleznete v části <a href="#">Import souborů s definicí základní úrovně šumu na straně 18</a> .

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [DragenEnrichment\_Data] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
Sample_ID	Ano	ID vzorku. ID vzorku může obsahovat až 20 alfanumerických znaků. V ID se rozlišují malá a velká písmena. Jednotlivé identifikátory oddělte pomlčkami. Například Vzorek1-DQB1-022515. ID vzorků musí odpovídat ID zadaným v části BCLConvert_Data.

## Požadavky na plán DRAGEN DNA Amplicon

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [DragenAmplicon\_Settings] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
SoftwareVersion	Ano	Verze softwaru DRAGEN aktuálně nainstalovaného v systému. Použijte všechna tři celá čísla uvedená v názvu verze. Například 3.5.7. Verze softwaru musí odpovídat verzi uvedené v části BCLConvert_Settings.

Pole	Povinné	Popis
ReferenceGenomeDir	Ano	Název referenčního genomu. Například hg38_alt_aware. Referenční genomy jsou uloženy ve složce <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Pokud chcete použít vlastní referenční genom, postupujte podle <i>online nápovědy k aplikaci Reference Builder for Illumina Instruments verze 1.0.0</i> .
DnaBedFile	Ano	Soubor BED obsahující oblasti k zacílení. Soubor BED lze zadat ve formátu <code>*.txt</code> nebo <code>*.gz</code> .
DnaGermlineOrSomatic	Ano	Pokud chcete provést germinální analýzu DNA Amplicon, zadejte <code>germline</code> . Pokud chcete provést somatickou analýzu DNA Amplicon, zadejte <code>somatic</code> .
KeepFastq	Ne	Pokud chcete uložit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>true</code> (pravda). Pokud chcete odstranit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>false</code> (nepravda).
MapAlignOutFormat	Ne	Formátování výstupního souboru. Povolené hodnoty jsou <code>bam</code> a <code>cram</code> . Pokud není zadána žádná hodnota, výchozí je žádná.

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [DragenAmplicon\_Data] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
Sample_ID	Ano	ID vzorku. ID vzorku může obsahovat až 20 alfanumerických znaků. V ID se rozlišují malá a velká písmena. Jednotlivé identifikátory oddělte pomlčkami. Například Vzorek1-DQB1-022515. ID vzorků musí odpovídat ID zadaným v části BCLConvert_Data.
DnaOrRna	Ano	Typ prováděné analýzy Amplicon. V případě softwaru DRAGEN verze 3.8 je podporována pouze analýza DNA. Zadejte <code>dna</code> .

## Požadavky na plán DRAGEN Single Cell RNA

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [DragenGermline\_Settings] a jejich popisy. Informace o kompatibilitě se sadami od nezávislých výrobců naleznete na stránce podpory DRAGEN Bio-IT Platform Product Compatibility (Kompatibilita produktů s platformou DRAGEN Bio-IT).

## Single Cell Library Kit 1–5

Následující nastavení seznamu vzorků se týkají sad pro přípravu knihoven se stejnou genetickou strukturou, jako mají sady DRAGEN Single Cell Library Kit 1–5. K ověření genetické struktury použité sady použijte stránku podpory DRAGEN Bio-IT Platform Product Compatibility (Kompatibilita produktů s platformou DRAGEN Bio-IT).

Pole	Povinné	Popis
SoftwareVersion	Ano	Verze softwaru DRAGEN aktuálně nainstalovaného v systému. Použijte všechna tři celá čísla uvedená v názvu verze. Například 3.5.7. Verze softwaru musí odpovídat verzi uvedené v části BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Ano	Název referenčního genomu. Například hg38_alt_aware. Referenční genomy jsou uloženy ve složce /usr/local/illumina/genomes. Pokud chcete použít vlastní referenční genom, postupujte podle <i>online nápovědy k aplikaci Reference Builder for Illumina Instruments verze 1.0.0</i> .
RnaLibraryType	Ne	Zadejte jednu z následujících hodnot: <ul style="list-style-type: none"> <li>SF: Dopředná vlákna. SF je výchozí hodnota.</li> <li>SR: Reverzní vlákna.</li> <li>U: Bez vláken.</li> </ul>
RnaGeneAnnotationFile	Ne	Soubor obsahující poznámky ke genu RNA. Povoleny jsou pouze alfanumerické znaky. Pokud soubor není poskytnut, použije se výchozí soubor poznámek, který je součástí zadaného referenčního genomu.
BarcodeRead	Ne	Umístění přečteného čárového kódu v rámci běhu sekvenování, které obsahuje čárový kód i UMI. Hodnoty mohou být Read1 (Čtení 1) nebo Read2 (Čtení 2). Výchozí hodnota je Read1 (Čtení 1).



Pole	Povinné	Popis
BarcodePosition	Ano	Umístění bází odpovídající čárovému kódu v rámci hodnoty zadané v poli BarcodeRead. Pozice bází jsou indexovány počínaje nulovou pozicí. Zadejte hodnotu BarcodePosition v následujícím formátu: 0_<koncová pozice čárového kódu> Pokud čárový kód obsahuje například 16 bází, je hodnota 0_15.
UmiPosition	Ano	Umístění bází odpovídající identifikátoru UMI v rámci hodnoty zadané v poli BarcodeRead. Zadejte hodnotu UmiPosition v následujícím formátu: <počáteční pozice UMI>_<koncová pozice UMI> Pokud UMI obsahuje například 10 bází a čárový kód 16, je hodnota 16_25.
BarcodeSequenceWhitelist	Ne	Název souboru obsahující sekvence čárového kódu, které mají být zahrnuty. Název běhu může obsahovat pouze alfanumerické znaky, pomlčky, podtržítka a tečky.
KeepFastq	Ne	Pokud chcete uložit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>true</code> (pravda). Pokud chcete odstranit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>false</code> (nepravda).
MapAlignOutFormat	Ne	Formátování výstupního souboru. Povolené hodnoty jsou <code>bam</code> a <code>cram</code> . Pokud není zadána žádná hodnota, výchozí je žádná.

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [DrogenSingleCellRNA\_Data] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
Sample_ID	Ano	ID vzorku. ID vzorku může obsahovat až 20 alfanumerických znaků. V ID se rozlišují malá a velká písmena. Jednotlivé identifikátory oddělte pomlčkami. Například Vzorek1-DQB1-022515. ID vzorků musí odpovídat ID zadaným v části BCLConvert_Data.

## Single Cell Library Kit 6

Následující nastavení seznamu vzorků se týkají sad pro přípravu knihoven, které mají stejnou genetickou strukturu jako sada DRAGEN Single Cell Library Kit 6. K ověření genetické struktury použité soupravy použijte stránku podpory DRAGEN Bio-IT Platform Product Compatibility (Kompatibilita produktů s platformou DRAGEN Bio-IT).

Pole	Povinné	Popis
SoftwareVersion	Ano	Verze softwaru DRAGEN aktuálně nainstalovaného v systému. Použijte všechna tři celá čísla uvedená v názvu verze. Například 3.5.7. Verze softwaru musí odpovídat verzi uvedené v části BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Ano	Název referenčního genomu. Například hg38_alt_aware. Referenční genomy jsou uloženy ve složce /usr/local/illumina/genomes. Pokud chcete použít vlastní referenční genom, postupujte podle <i>online nápovědy k aplikaci Reference Builder for Illumina Instruments verze 1.0.0</i> .
RnaLibraryType	Ne	Zadejte jednu z následujících hodnot: <ul style="list-style-type: none"> <li>SF: Dopředná vlákna.</li> <li>SR: Reverzní vlákna.</li> <li>U: Bez vláken.</li> </ul>
RnaGeneAnnotationFile	Ne	Soubor obsahující poznámky ke genu RNA. Povoleny jsou pouze alfanumerické znaky. Pokud soubor není poskytnut, použije se výchozí soubor poznámek, který je součástí zadaného referenčního genomu.
BarcodeRead	Ne	Umístění přečteného čárového kódu v rámci běhu sekvenování, které obsahuje čárový kód i UMI. Hodnoty mohou být Read1 (Čtení 1) nebo Read2 (Čtení 2). Výchozí hodnota je Read1 (Čtení 1).

Pole	Povinné	Popis
BarcodePosition	Ano	<p>Umístění bází odpovídající čárovému kódu v rámci hodnoty zadané v poli BarcodeRead. Pozice bází jsou indexovány počínaje nulovou pozicí. Zadejte hodnotu BarcodePosition v následujícím formátu:</p> <p>0_&lt;koncová pozice prvního čárového kódu&gt;+&lt;počáteční pozice druhého čárového kódu&gt;_&lt;koncová pozice druhého čárového kódu&gt;+&lt;počáteční pozice třetího čárového kódu&gt;_&lt;koncová pozice třetího čárového kódu&gt;</p> <p>Například následující struktura povede k hodnotě 0_8+21_29+43_51:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 9 bází v prvním čárovém kódu (0_8).</li> <li>• 12 bází mezi prvním a druhým čárovým kódem.</li> <li>• 9 bází ve druhém čárovém kódu (21_29).</li> <li>• 13 bází mezi druhým a třetím čárovým kódem.</li> <li>• 9 bází ve třetím čárovém kódu (43_51).</li> </ul>
UmiPosition	Ano	<p>Umístění bází odpovídající identifikátoru UMI v rámci zadaného pole BarCodeRead. Zadejte řetězec v následujícím formátu:</p> <p>&lt;počáteční pozice UMI&gt;_&lt;koncová pozice UMI&gt;</p> <p>Pokud UMI obsahuje například 8 bází a počet bází před UMI je celkem 51, je hodnota 52_59.</p>
BarcodeSequenceWhitelist	Ne	Název souboru obsahující sekvenci čárového kódu, která má být vložena na seznam povolených položek. Název běhu může obsahovat pouze alfanumerické znaky, pomlčky, podtržítka a tečky.
KeepFastq	Ne	Pokud chcete uložit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>true</code> (pravda). Pokud chcete odstranit výstupní soubory FASTQ, zadejte <code>false</code> (nepravda).
MapAlignOutFormat	Ne	Formátování výstupního souboru. Povolené hodnoty jsou <code>bam</code> a <code>cram</code> . Pokud není zadána žádná hodnota, výchozí je žádná.

Níže jsou uvedena pole dostupná v části [DragenSingleCellRNA\_Data] a jejich popisy.

Pole	Povinné	Popis
Sample_ID	Ano	ID vzorku. ID vzorku může obsahovat až 20 alfanumerických znaků. V ID se rozlišují malá a velká písmena. Jednotlivé identifikátory oddělte pomlčkami. Například Vzorek1-DQB1-022515. ID vzorků musí odpovídat ID zadaným v části BCLConvert_Data.

## Sekvenování v režimu tmy

V této části je popsáno použití sekvenování v režimu tmy v návodu.

Sekvenování v režimu tmy slouží k provedení všech kroků chemických postupů cyklu sekvenování. Pokud chcete zjistit, zda je požadováno sekvenování v režimu tmy, zkontrolujte informace na stránce Compatible Products (Kompatibilní produkty) použité sady pro přípravu knihoven na [webu podpory společnosti Illumina](#).

Při sekvenování v režimu tmy postupujte podle následujících kroků.

### Úprava souboru s návodem

1. Stáhněte si soubor s návodem ve formátu XML z [webu podpory společnosti Illumina](#).
2. Upravte soubor s návodem ve formátu XML.
  - a. Určete příslušnou část protokolu na základě konfigurace čtení a indexovaného sekvenování. Na každý vlastní návod připadá šest různých možných protokolů, které je možné upravit. Například protokol pro jedno čtení 1 bez konfigurace indexovaného sekvenování bude `<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >`.
  - b. Před `<ReadRef ReadName="Read 1"/>` a `<ReadRef ReadName="Read 2"/>` zadejte na nový řádek následující krok režimu tmy. `<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />`.
  - c. Zadejte krok režimu tmy na nový řádek pro každý požadovaný režim tmy.
3. Uložte soubor s návodem ve formátu XML.

Následující příklad ukazuje návod s režimem tmy:

```
<Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="BIX Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Transfer" />
  <ChemistryRef ChemistryName="ExAmp Mixing" />
  <ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
```

```
<Obdd ChemistryName="Library Denaturation and Dilution" />
<ChemistryRef ChemistryName="Prime Cartridge" />
<Obcg ChemistryName="Cluster Generation" />
<ChemistryRef ChemistryName="SBS Prime" />
<ChemistryRef ChemistryName="Read Prep" />
<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />
<ReadRef ReadName="Read 1" />
<SetThermalZoneTemp Enable="false" Zone="FlowCellHeater" />
</Protocol>
<Protocol Name="1 Read 1 Index" ProtocolType="1Read1Index" >
  <ChemistryRef ChemistryName="Start" />
  <ChemistryRef ChemistryName="2min 60C Vacuum Hold" />
  ...
```

## Připojení návodu k běhu

1. V části Run Setup (Nastavení běhu) řídicího softwaru vyberte možnost **Choose** (Zvolit) v části Custom Recipe (Vlastní návod).
2. Přejděte k aktualizovanému souboru s návodem ve formátu XML.
3. Vyberte možnost **Open** (Otevřít).
4. Vraťte se k části [Spuštění běhu sekvenování na straně 46](#).

# Rejstřík

## %

%PF 59

## A

adresa IP 6

algoritmus Phred 60

amplifikace 8

analýza

metody 5, 9

analýza obrazů 5

analýza v cloudu 1

automatické aktualizace 74

## B

BaseSpace Sequence Hub 1

dokumentace 14

nastavení 14

bcl2fastq2 55

běhy

metriky 55

bez přiřazení 57-58

bílé knihy 60

## C

CE 55

cesty 56

Cesty UNC 50

cykly čtení 31

## Č

červený kanál 58

číslování dlaždic 57

číslování povrchů 57

čisticí ubrousky 28

## D

data použitelnosti 78

délky čtení 31

denaturace 8

dezinfekční ubrousky 28

disk D 74

dlaždice 55

dokumentace 106

domény 14

dvířka

zavření 51

dvoukanálové sekvenování 58

## E

ethernetový kabel 4

ethernetový port 4

## F

fázování a předfázování 57

filtr ryzosti 59

filtr úspěšnosti (PF) 59

filtrování klastrů 59

fragmenty návodů 6

## H

hodnoty intenzity 57

## C

chyby 6, 82

pravděpodobnost 59-60

zprávy 80

## C

chyby registrace 57

## I

- ikony 6
- Illumina Proactive Support 14
- index
  - cykly 31
- inicializace 83
  - chyba 82
- instalace softwaru 74
- intenzity klastrů 57

## J

- jednoduché čtení 50

## K

- kamery 56
- katalogová čísla 27
- kazeta
  - směr vložení 51
- klávesnice 4
- knihovny
  - denaturace 8
- kontroly systému 80
- kvalita dat 59

## L

- Local Run Manager 5

## M

- mimořádné cykly 31
- miniatury 61
- místní analýza 1
- místo na disku 6, 74
- monitor 3
- myš 4

## N

- náhrada za RSB 27

- náhradní díly 78
- nanoprvky 57
- napájecí kabel 4
- nastavení audio 21
- nastavení běhu
  - příklady 31
- nastavení zvuku 21
- návody 74
- název počítače 6
- nukleotidy 58

## O

- obrazy 55
- odkapávací miska
  - podložky 28
- odstranění běhů 6, 74
- operační systém 83

## P

- parametry běhu
  - úpravy 50
- pevný disk 6, 74
- PhiX 28
  - zarovnání 55
- PhiX Control v3 27
- počet běhů 6
- počty cyklů 31
- podložky 28
- pojmenování
  - název počítače 6
  - název přístroje 21
- pomoc 106
- porty USB 4
- Process Management 74
- protokoly chyb 56
- provozní údaje 14
- provozní údaje přístroje 14
- průvodce instalací systémové sady 74
- první instalace 78
- první nastavení 84
- přechod na nižší verzi softwaru 84

přepínač 4, 82  
přesunutí 4  
převod souborů FASTQ 55  
přezdívka 21  
přihlášení Enterprise 14  
příhrádka na spotřební materiál 3  
připojené jednotky 50  
připojení k internetu 14  
přiřazení báze 5

## R

Reagencie NextSeq 1000/2000 27  
restart 84  
resuspenzační pufr 27  
ruční aktualizace softwaru 74  
RunInfo.xml 61

## Ř

ředění knihoven 8  
řídící software 1

## S

s párovými konci 50  
sada softwaru 5  
sady 27  
    katalogová čísla 28  
Sequencing Analysis Viewer 55, 57  
sériové číslo 6  
skóre kvality 59-60  
sledování spotřebního materiálu 1  
složka běhu 74  
software  
    instalace 74  
    přechod na nižší verzi 84  
    upozornění na aktualizace 22  
soubory BCL 6  
soubory CBCL 59  
soubory filtrů 55, 61  
soubory InterOp 55, 61  
soubory protokolů 56

soubory přiřazení báze 9, 55, 61  
soukromá doména 14  
specifikace chladničky 28  
specifikace mrazničky 28  
spotřební materiál  
    skenování 51  
    sledování 1  
správné přiřazení specifikace 82  
stav běhu 6  
stavový proužek 3  
stránky podpory 74  
střídavé napájení  
    zásuvka 4  
světelný proužek 3

## T

tabulky kvality 60  
technická 106  
technická pomoc 106  
testovací sada 28  
tovární nastavení 84

## U

umístění hostitele 14  
umístění klastrů 55, 61  
umístění serveru 14  
Universal Copy Service 5, 74  
úprava parametrů běhu 50

## V

varování 6, 82  
velikost běhu 74  
ventilátory 78  
výchozí výstupní složka 50  
vypínač 3, 82  
vypnutí 82  
vypnutí a zapnutí 80  
výpočetní modul 55  
výstrahy 74  
výstupní složka 50, 74



vytváření šablon 57  
vzduchové filtry  
    náhradní 28  
    umístění 78

## **W**

Windows  
    přihlášení 83

## **Z**

záběry 56-57  
zákaznická podpora 106  
záruka 28  
zelený kanál 58  
zobrazování 55-56  
ztráta připojení 82

# Technická pomoc

Pokud potřebujete technickou pomoc, obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.

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

## Telefonní čísla na technickou podporu společnosti Illumina

Oblast	Bezplatná linka	Mezinárodní
Austrálie	+61 1800 775 688	
Belgie	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
Čína		+86 400 066 5835
Dánsko	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
Filipíny	+63 180016510798	
Finsko	+358 800 918 363	+358 974 790 110
Francie	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Hongkong, Čína	+852 800 960 230	
Indie	+91 8006500375	
Indonésie		0078036510048
Irsko	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Itálie	+39 800 985513	+39 236 003 759
Japonsko	+81 0800 111 5011	
Jižní Korea	+82 80 234 5300	
Kanada	+1 800 809 4566	
Malajsie	+60 1800 80 6789	
Německo	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Nizozemsko	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Norsko	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Nový Zéland	+64 800 451 650	
Rakousko	+43 800 006249	+43 1 9286540
Singapur	1 800 5792 745	

Oblast	Bezplatná linka	Mezinárodní
Spojené království	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
Španělsko	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Švédsko	+46 2 00883979	+46 8 50619671
Švýcarsko	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Taiwan, Čína	+886 8 06651752	
Thajsko	+66 1800 011 304	
USA	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Vietnam	+84 1206 5263	

**Bezpečnostní listy (SDS)** – k dispozici na webu společnosti Illumina na adrese [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

**Dokumentace k produktu** – je k dispozici ke stažení z webu [support.illumina.com](http://support.illumina.com).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Kalifornie 92122 U.S.A.

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)

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

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

**Pouze pro výzkumné účely. Není určeno pro diagnostické postupy.**

© 2021 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

**illumina®**