

NextSeq 1000 i 2000

Instrukcja obsługi sekwenatora

ZASTRZEŻONE MATERIAŁY FIRMY ILLUMINA

Nr dokumentu: 1000000109376 wer. 04 POL

Kwiecień 2021 r.

Tylko do celów badawczych. Nieprzeznaczone do procedur diagnostycznych.

Niniejszy dokument oraz jego treść stanowią własność firmy Illumina, Inc. oraz jej podmiotów zależnych („Illumina”) i są przeznaczone wyłącznie do użytku zgodnego z umową przez klienta firmy w związku z użytkowaniem produktów opisanych w niniejszym dokumencie, z wyłączeniem innych celów. Niniejszy dokument oraz jego treść nie będą wykorzystywane ani rozpowszechniane do innych celów i/lub publikowane w inny sposób, ujawniane ani kopiowane bez pisemnej zgody firmy Illumina. Firma Illumina na podstawie niniejszego dokumentu nie przenosi żadnych licencji podlegających przepisom w zakresie patentów, znaków towarowych czy praw autorskich ani prawu powszechnemu lub prawom pokrewnym osób trzecich.

W celu zapewnienia właściwego i bezpiecznego użytkowania produktów opisanych w niniejszym dokumencie podane instrukcje powinny być ściśle przestrzegane przez wykwalifikowany i właściwie przeszkolony personel. Przed rozpoczęciem użytkowania tych produktów należy zapoznać się z całą treścią niniejszego dokumentu.

NIEZAPOZNANIE SIĘ LUB NIEDOKŁADNE PRZESTRZEGANIE WSZYSTKICH INSTRUKCJI PODANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE MOŻE SPOWODOWAĆ USZKODZENIE PRODUKTÓW LUB OBRAŻENIA CIAŁA UŻYTKOWNIKÓW LUB INNYCH OSÓB ORAZ USZKODZENIE INNEGO MIENIA, A TAKŻE SPOWODUJE UNIEWAŻNIENIE WSZELKICH GWARANCJI DOTYCZĄCYCH PRODUKTÓW.

FIRMA ILLUMINA NIE PONOSI ODPOWIEDZIALNOŚCI ZA NIEWŁAŚCIWE UŻYTKOWANIE PRODUKTÓW (W TYM ICH CZĘŚCI I OPROGRAMOWANIA) OPISANYCH W NINIEJSZYM DOKUMENCIE.

© 2021 Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

Wszystkie znaki towarowe są własnością firmy Illumina, Inc. lub ich odpowiednich właścicieli. Szczegółowe informacje na temat znaków towarowych można znaleźć na stronie www.illumina.com/company/legal.html.

Historia wersji

Nr dokumentu	Data	Opis zmiany
1000000109376 wer. 04	Kwiecień 2021	<p>Dodano instrukcje dotyczące importowania plików bazowych.</p> <p>Dodano procedurę DRAGEN DNA Amplicon.</p> <p>Dodano opis funkcji oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000 w wersji 1.3.</p> <p>Dodano informacje o wyborze serwera proxy.</p> <p>Zaktualizowano temperatury transportu i przechowywania buforu RSB z Tween 20.</p> <p>Zaktualizowano procedurę DRAGEN RNA w celu uwzględnienia ekspresji różnicowej genów.</p> <p>Zaktualizowano strukturę folderu wyjściowego danych sekwencjonowania.</p> <p>Zaktualizowano zalecenia dotyczące formatowania v2 arkusza próbek.</p>
1000000109376 wer. 03	Listopad 2020	<p>Poprawiono numery katalogowe.</p> <p>Dodano informacje na temat dodawania nowych użytkowników.</p>

Nr dokumentu	Data	Opis zmiany
1000000109376 wer. 02	Październik 2020	<p>Dodano zestaw odczynników NextSeq 1000/2000 P3.</p> <p>Dodano procedurę DRAGEN Single Cell RNA.</p> <p>Dodano procedurę DRAGEN Enrichment.</p> <p>Dodano opcje kompresji plików FASTQ.</p> <p>Dodano instrukcje dotyczące instalacji procedury DRAGEN oraz aktualizacji licencji.</p> <p>Dodano instrukcje importowania niestandardowych genomów referencyjnych.</p> <p>Zaktualizowano objętość i stężenia ładowania dla typów bibliotek.</p> <p>Zaktualizowano instrukcje rozcieńczania bibliotek.</p> <p>Dodano instrukcje dotyczące automatycznego czyszczenia kasety odczynników.</p> <p>Zaktualizowano informacje dotyczące obsługiwanej liczby cykli.</p> <p>Zaktualizowano opcje dostosowywania aparatu.</p> <p>Zaktualizowano instrukcje dotyczące konfiguracji przebiegu w aparacie.</p> <p>Dodano strukturę danych wyjściowych sekwencjonowania DRAGEN.</p> <p>Dodano informacje o raportach kontroli jakości DRAGEN.</p> <p>Dodano informacje o usuwaniu niestandardowych genomów referencyjnych z dysku twardego.</p> <p>Dodano informacje o wykonywaniu kontroli systemu.</p> <p>Zaktualizowano ustawienia arkusza próbek v2.</p>

Nr dokumentu	Data	Opis zmiany
1000000109376 wer. 01	Czerwiec 2020	<p>Zaktualizowano opisy oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000.</p> <p>W całym przewodniku wprowadzono wyraźne rozróżnienie między trybem w chmurze, hybrydowym, lokalnym i autonomicznym.</p> <p>Zaktualizowano instrukcje przechowywania i rozmrażania kasety.</p> <p>Zaktualizowano informacje dotyczące obsługiwanej liczby cykli.</p> <p>Zaktualizowano instrukcje konfigurowania analizy wtórnej.</p> <p>Zaktualizowano numery katalogowe zestawów odczytników.</p> <p>Zaktualizowano schemat protokołu sekwencjonowania.</p> <p>Zaktualizowano instrukcje określania dysku sieciowego jako domyślnego folderu wyjściowego.</p> <p>Zaktualizowano tabelę obsługiwanych typów bibliotek.</p> <p>Dodano instrukcje importowania niestandardowego genomu referencyjnego.</p> <p>Dodano instrukcje konfigurowania przebiegu przy użyciu niestandardowego zestawu indeksu i zestawu do przygotowania biblioteki niestandardowej.</p> <p>Zaktualizowano wymagania dotyczące konta użytkownika i hasła.</p> <p>Dodano informacje szczegółowe dotyczące struktury folderu wyjściowego DRAGEN.</p> <p>Doprecyzowano instrukcje dotyczące odprowadzania zużytych odczytników z kasety.</p> <p>Dodano informacje pomocnicze dotyczące tabeli jakości.</p>

Nr dokumentu	Data	Opis zmiany
1000000109376 wer. 01	Czerwiec 2020	Zaktualizowano instrukcje instalowania aktualizacji oprogramowania sterującego. Dodano instrukcje dotyczące ponownego umieszczania przebiegu w kolejce. Dodano instrukcje aktualizowania procedur i licencji rozwiązania DRAGEN. Dodano instrukcje dostosowywania aparatu. Zaktualizowano ilustracje w celu uwzględnienia nowych etykiet. W całym przewodniku zmieniono drzwiczki na osłonę. Dodano opis dwóch portów Ethernet.
1000000109376 wer. 00	Marzec 2020	Pierwsze wydanie.

Spis treści

Przegląd informacji o systemie	1
Materiały dodatkowe	2
Elementy sprzętowe aparatu	3
Zintegrowane oprogramowanie	5
Zarządzanie procesem	6
Schemat protokołu sekwencjonowania	8
Jak działa sekwencjonowanie	8
Konfiguracja systemu	11
Wymagania dotyczące konta użytkownika	11
Konfigurowanie platformy BaseSpace Sequence Hub i usługi Proactive Support	13
Określanie domyślnej lokalizacji folderu wyjściowego	15
Importowanie niestandardowych genomów referencyjnych	18
Importowanie plików szumu bazowego	19
Konfiguracja trybu przebiegu	20
Dostosowywanie aparatu	21
Materiały eksploatacyjne i sprzęt	24
Materiały eksploatacyjne do sekwencjonowania	24
Pomocnicze materiały eksploatacyjne	28
Sprzęt pomocniczy	30
Protokół	31
Zagadnienia dotyczące sekwencjonowania	31
Planowanie sekwencjonowania na platformie BaseSpace Sequence Hub	33
Rozmrażanie zapakowanej w torebkę kasety i komory przepływowej	41
Rozcieńczanie bibliotek	44
Ładowanie materiałów eksploatacyjnych do kasety	46
Inicjowanie sekwencjonowania	49
Dane wyjściowe sekwencjonowania	58
Oprogramowanie Real-Time Analysis – omówienie	58
Oprogramowanie Real-Time Analysis – procedura	61
Pliki wyjściowe sekwencjonowania	65
Pliki wyjściowe analizy wtórnej DRAGEN	66
Struktura folderu wyjściowego analizy wtórnej DRAGEN	76
Konserwacja	80
Zwalnianie miejsca na dysku twardym	80
Aktualizacje oprogramowania	81
Aktualizacje procedur i licencji DRAGEN	82

Wymiana filtra powietrza	84
Rozwiązywanie problemów	86
Usuwanie komunikatów o błędach	86
Ponowne umieszczanie materiałów eksploatacyjnych w miejscu przechowywania ..	87
Anulowanie przebiegu	87
Ponowne umieszczanie przebiegu w kolejce	88
Wyłączenie i ponowne włączenie aparatu	89
Przeprowadzanie kontroli systemu	90
Przywracanie ustawień fabrycznych	90
Przechwytywanie obrazu instalacji	91
Przywracanie przechwyconego obrazu	91
Źródła i referencje	92
Ustawienia arkusza próbek v2	92
Sekwencjonowanie w cyklu ciemnym	108
Indeks	110
Pomoc techniczna	114

Przegląd informacji o systemie

Sekwenator Illumina® NextSeq™ 1000 oraz sekwenator Illumina® NextSeq™ 2000 zapewniają ukierunkowane podejście do sekwencjonowania nowej generacji (NGS¹). Ten opracowany pod kątem współpracy z aplikacjami system to technologia sekwencjonowania firmy Illumina zintegrowana w ekonomicznym urządzeniu stacjonarnym, które oferuje następujące funkcje:

- **Przystępność i niezawodność** – system NextSeq 1000/2000 oferuje lokalne analizy DRAGEN oraz opcje denaturacji i rozcieńczania w aparacie. Moduł obrazowania jest wbudowany w system, a elementy układu przepływowego są wbudowane w materiały eksploatacyjne, co upraszcza konserwację aparatu.
- **Jednoetapowe ładowanie materiałów eksploatacyjnych** – kasetę jednorazowego użytku jest wstępnie wypełniona wszystkimi odczynnikami wymaganymi do przebiegu. Bibliotekę i komorę przepływową można załadować bezpośrednio do kasety, która jest następnie ładowana do aparatu. Zintegrowana identyfikacja pozwala na dokładne śledzenie.
- **Oprogramowanie NextSeq 1000/2000** – pakiet zintegrowanego oprogramowania służy do sterowania działaniem aparatu, przetwarzania obrazów i generowania rozpoznań nukleotydów.
 - **Tryb w chmurze** – przebieg można zaplanować, używając narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie) na platformie BaseSpace Sequence Hub. Wybrana procedura analizy jest inicjowana automatycznie w chmurze. Dane przebiegu i wyniki analizy również są udostępniane w chmurze.
 - **Tryb hybrydowy** – przebieg można zaplanować, używając narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie) na platformie BaseSpace Sequence Hub. Wybrana procedura analizy jest inicjowana za pośrednictwem aplikacji DRAGEN w aparacie.
 - **Tryb lokalny** – przebieg można zaplanować lokalnie, korzystając z formatu pliku arkusza próbek v2. Wybrana procedura analizy jest inicjowana automatycznie za pośrednictwem aplikacji DRAGEN w aparacie.
 - **Tryb autonomiczny** – przebieg jest planowany bez arkusza próbek.

Ten rozdział zawiera przegląd systemu, w tym informacje o sprzęcie, oprogramowaniu i analizie danych. Zawiera również omówienie kluczowych pojęć i terminów, które występują w całej dokumentacji. Szczegóły dotyczące specyfikacji, arkuszy danych, aplikacji i powiązanych produktów zawiera [strona sekwenatora NextSeq 1000 i NextSeq 2000](#) w witrynie internetowej firmy Illumina.

¹sekwencer nowej generacji

Materiały dodatkowe

Materiały dodatkowe dotyczące sekwenatorów znajdują się na [stronach pomocy technicznej sekwenatorów NextSeq 1000 i NextSeq 2000](#) w witrynie internetowej firmy Illumina. Materiały te obejmują oprogramowanie, szkolenie, zgodne produkty i poniższą dokumentację. Zawsze należy sprawdzać, czy na stronach pomocy technicznej nie ma najnowszych wersji.

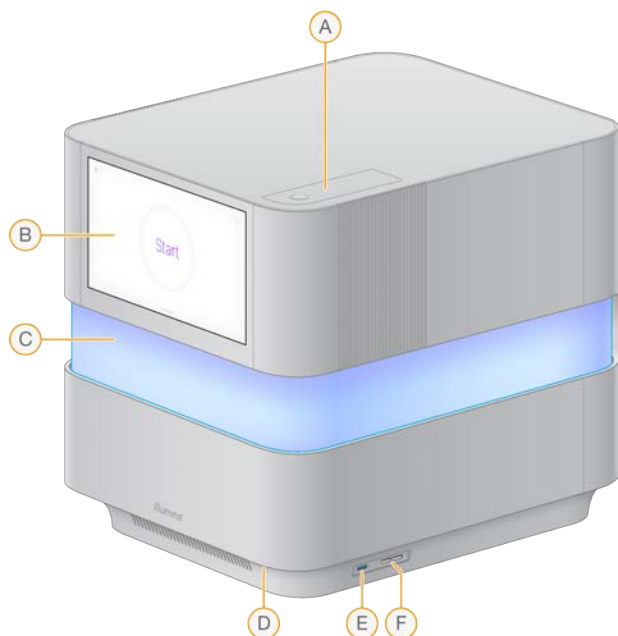
Źródło	Opis
Narzędzie do tworzenia protokołów niestandardowych	Narzędzie do generowania kompleksowych instrukcji dostosowanych do metody przygotowywania biblioteki, parametrów przebiegu oraz metody analizy z możliwością zwiększenia poziomu szczegółowości.
<i>Przewodnik dotyczący bezpieczeństwa i zgodności sekwenatorów NextSeq 1000 i NextSeq 2000 z przepisami (nr dokumentu: 1000000111928)</i>	Zawiera informacje dotyczące kwestii bezpieczeństwa działania, oświadczeń dotyczących zgodności z przepisami i etykiet aparatu.
<i>Przewodnik dotyczący zgodności modułu czytnika RFID z przepisami (nr dokumentu: 1000000002699)</i>	Zawiera informacje dotyczące czytnika RFID w aparacie, certyfikatów zgodności z przepisami i kwestii dotyczących bezpieczeństwa.
<i>Przewodnik dotyczący denaturacji i rozcieńczania bibliotek w sekwenatorach NextSeq 1000 i 2000 (nr dokumentu: 1000000139235)</i>	Zawiera instrukcje dotyczące ręcznej denaturacji i rozcieńczania przygotowanych bibliotek do sekwencjonowania, a także instrukcje przygotowywania opcjonalnej kontroli PhiX.
<i>Przewodnik dotyczący starterów niestandardowych NextSeq 1000 i 2000 (nr dokumentu: 1000000139569)</i>	Zawiera informacje dotyczące wymiany starterów sekwencji firmy Illumina na niestandardowe startery sekwencji.
<i>Przewodnik dotyczący przygotowania miejsca instalacji sekwenatora NextSeq 2000 (nr dokumentu: 1000000109378)</i>	Zawiera specyfikacje dotyczące miejsca w laboratorium, wymagań w zakresie instalacji elektrycznej oraz kwestii związanych ze środowiskiem i siecią.

Źródło	Opis
<i>Pomoc systemu BaseSpace</i> (help.basespace.illumina.com)	Zawiera informacje dotyczące korzystania z platformy BaseSpace™ Sequence Hub oraz dostępnych opcji analizy.
<i>Przewodnik dotyczący tworzenia puli adapterów indeksów</i> (nr dokumentu: 1000000041074)	Zawiera wytyczne dotyczące tworzenia puli oraz strategie podwójnego indeksowania.
<i>Sekwencje adaptera firmy Illumina</i> (nr dokumentu: 1000000002694)	Zawiera listy sekwencji adaptera do zestawów do przygotowania biblioteki Illumina.

Elementy sprzętowe aparatu

Sekwenatory NextSeq 1000 i NextSeq 2000 są wyposażone w przycisk zasilania, monitor, pasek stanu, przedział materiałów eksploatacyjnych i porty USB.

Rysunek 1 Elementy zewnętrzne systemu



- A. **Przedział filtra powietrza** – umożliwia dostęp do wymiennego filtra powietrza.
- B. **Monitor z ekranem dotykowym** – umożliwia konfigurację aparatu za pomocą interfejsu oprogramowania sterującego.
- C. **Pasek stanu** – kolor podświetlenia zmienia się w miarę, jak system realizuje konkretną procedurę. Kolory niebieski i fioletowy wskazują interaktywność (np. kontrole poprzedzające przebieg), a podświetlenie wielokolorowe wskazuje istotne momenty oraz dane (np. zakończenie sekwencjonowania). O błędach krytycznych informuje czerwone światło.

- D. **Przycisk zasilania** – służy do kontrolowania zasilania systemu oraz wskazuje, czy zasilanie systemu jest włączone (przycisk podświetlony), wyłączone (przycisk ciemny) lub wyłączone, ale aparat jest podłączony do źródła prądu przemiennego (miga).
- E. **Port USB 3.0** – umożliwia podłączenie zewnętrznego, przenośnego dysku na potrzeby przesyłania danych.
- F. **Porty USB 2.0** – służy do podłączania myszy i klawiatury.

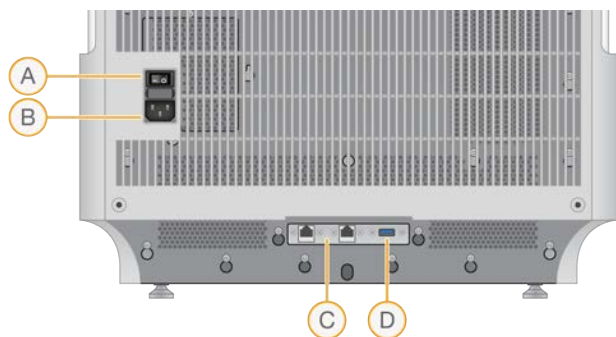
Przełącznik zasilania i złącza pomocnicze

Aparat można delikatnie przesunąć, aby uzyskać dostęp do przełącznika zasilania, portu USB i innych złączy pomocniczych na tylnej ścianie aparatu.

Na tylnej ścianie aparatu znajduje się przełącznik i wejście, które służą do sterowania zasilaniem aparatu, a także dwa porty Ethernet na potrzeby opcjonalnego połączenia Ethernet. Port USB 3.0 umożliwia podłączenie zewnętrznego dysku przenośnego w celu przenoszenia danych (system plików exFAT nie jest obsługiwany na tej platformie opartej na systemie Linux).

Sekwenatory NextSeq 1000 i NextSeq 2000 są wyposażone w dwa porty Ethernet umożliwiające zwiększenie funkcjonalności i elastyczności systemu. Na przykład jeden port Ethernet może być dedykowany komunikacji z wewnętrznym dyskiem sieciowym, a drugi port – komunikacji zewnętrznej z platformą BaseSpace Sequence Hub lub usługą Proactive Support.

Rysunek 2 Elementy panelu tylnego

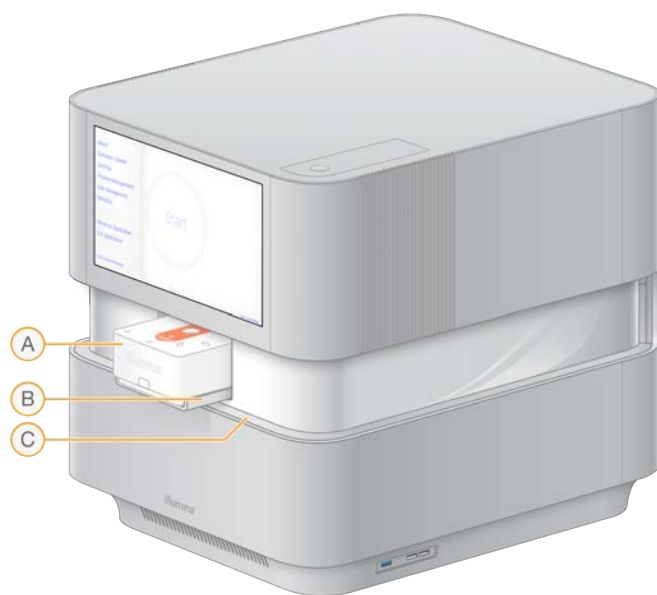


- A. **Przełącznik** – służy do włączania i wyłączania zasilania urządzenia.
- B. **Wejście zasilania** – złącze kabla zasilającego.
- C. **Porty Ethernet (2)** – umożliwiają opcjonalne podłączenie kabla Ethernet.
- D. **Port USB 3.0** – umożliwia podłączenie zewnętrznego dysku twardego na potrzeby przesyłania danych.

Przedział materiałów eksploatacyjnych

Przedział materiałów eksploatacyjnych zawiera kasetę do przebiegu sekwencjonowania, w której znajduje się komora przepływowa i rozcieńczona biblioteka.

Rysunek 3 Załadowany przedział materiałów eksploatacyjnych



- A. **Kaseta** – zawiera komorę przepływową, bibliotekę i odczynniki; służy do zbierania zużytych odczynników podczas przebiegu.
- B. **Taca** – w niej znajduje się kaseta podczas sekwencjonowania.
- C. **Ostona** – można ją otworzyć, aby uzyskać dostęp do przedziału materiałów eksploatacyjnych.

Zintegrowane oprogramowanie

Pakiet oprogramowania systemu obejmuje zintegrowane aplikacje odpowiedzialne za przeprowadzanie przebiegów sekwencjonowania oraz analizy danych.

- **Oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000** – steruje operacjami przeprowadzanymi w aparacie oraz zapewnia interfejs umożliwiający konfigurację systemu, skonfigurowanie przebiegu sekwencjonowania oraz monitorowanie statystyk dotyczących przebiegu w miarę postępu procesu sekwencjonowania.
- **Real-Time Analysis (RTA3)** – służy do przeprowadzania analizy obrazu i rozpoznawania nukleotydów podczas przebiegu. Więcej informacji na ten temat znajduje się w części [Dane wyjściowe sekwencjonowania na stronie 58](#).
- **Universal Copy Service** – służy do kopiowania plików wyjściowych sekwencjonowania z folderu przebiegu na platformę BaseSpace Sequence Hub (jeśli dotyczy) oraz do folderu wyjściowego, w którym są one dostępne dla użytkownika.

Oprogramowanie sterujące jest interaktywne i wykonuje zautomatyzowane procesy w tle. Praca aplikacji Real-Time Analysis i Universal Copy Service przebiega wyłącznie w tle.

Informacje dotyczące systemu

Należy wybrać menu oprogramowania sterującego w lewym górnym rogu, aby otworzyć sekcję About (Informacje). Sekcja About (Informacje) zawiera dane kontaktowe firmy Illumina oraz następujące informacje dotyczące systemu:

- Instrument Serial Number (Numer seryjny aparatu)
- Computer Name (Nazwa komputera)
- System Suite Version (Wersja pakietu oprogramowania)
- Image OS Version (Wersja obrazu systemu operacyjnego)
- Total Run Count (Łączna liczba przebiegów)

Powiadomienia i ostrzeżenia

Ikona powiadomienia znajduje się w prawym górnym rogu. W przypadku wystąpienia ostrzeżenia albo błędu wysuwa się prawy panel, w którym widoczne są powiadomienia. W dowolnym momencie można wybrać ikonę, aby wyświetlić listę bieżących lub przeszłych powiadomień dotyczących ostrzeżeń i błędów.

- Ostrzeżenia wymagają uwagi, ale nie powodują zatrzymania przebiegu ani nie wymagają czynności innej niż zatwierdzenie.
- Błędy wymagają wykonania czynności przed rozpoczęciem lub kontynuowaniem przebiegu.

Minimalizowanie oprogramowania sterującego

Zminimalizowanie oprogramowania sterującego umożliwia uzyskanie dostępu do innych aplikacji, przykładowo w celu przejścia do folderu wyjściowego w eksploratorze plików lub wyszukania arkusza próbek.

1. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Minimize Application** (Minimalizuj aplikację). Oprogramowanie sterujące zostanie zminimalizowane.
2. Aby zmaksymalizować oprogramowanie sterujące, wybrać z paska narzędzi opcję **NextSeq 1000/2000 Control Software** (Oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000).

Zarządzanie procesem

Na ekranie Process Management (Zarządzanie procesem) wyświetlane są tymczasowe przebiegi zapisane w lokalizacji `/usr/local/illumina/runs`. Każdy przebieg można zidentyfikować na podstawie jego daty, nazwy i identyfikatora. W odniesieniu do każdego przebiegu wyświetlane są także informacje, takie jak status przebiegu, analizy wtórnej, folderu wyjściowego oraz chmury. W celu wyświetlenia dodatkowych informacji, takich jak Workflow (Procedura), Average % Q30 (Średni % Q30), Total Reads PF (Łączna liczba przebiegów PF) i Total Yield (Uzysk całkowity). Instrukcje dotyczące

usuwania przebiegów w celu zwolnienia miejsca na dysku zawiera część [Zwalnianie miejsca na dysku twardym na stronie 80](#). Informacje o ponownym umieszczaniu w kolejce analizy w aparacie zawiera część [Ponowne umieszczanie przebiegu w kolejce na stronie 88](#).

Status of Run (Status przebiegu)

W tej sekcji wyświetlany jest status przebiegu sekwencjonowania:

- **In Progress** (W toku) – sekwencjonowanie w toku.
- **Complete** (Zakończono) – sekwencjonowanie zostało zakończone.
- **Stopped** (Zatrzymano) – sekwencjonowanie zostało zatrzymane.
- **Errored** (Z błędem) – podczas sekwencjonowania wystąpił błąd.

Status of Secondary Analysis (Status analizy wtórnej)

W tej sekcji wyświetlany jest status analizy wtórnej DRAGEN w aparacie. Jeśli analiza odbywa się na platformie BaseSpace Sequence Hub, wyświetlana będzie wartość N/A (nd.).

- **Not Started** (Nie rozpoczęto) – analiza DRAGEN nie została jeszcze rozpoczęta.
- **In Progress** (W toku) – analiza DRAGEN w toku.
- **Stopped** (Zatrzymano) – analiza DRAGEN została zatrzymana.
- **Errored** (Z błędem) – w analizie DRAGEN wystąpił błąd.
- **Complete** (Zakończono) – analiza DRAGEN została zakończona.

Status of Output Folder (Status folderu wyjściowego)

W tej sekcji wyświetlany jest status plików kopiowanych do folderu wyjściowego:

- **In Progress** (W toku) – pliki są kopiowane do folderu wyjściowego.
- **Complete** (Zakończono) – pliki zostały pomyślnie skopiowane do folderu wyjściowego.

Status of Cloud (Status chmury) (platforma BaseSpace Sequence Hub)

W tej sekcji wyświetlany jest status plików przekazywanych do platformy BaseSpace Sequence Hub za pośrednictwem chmury:

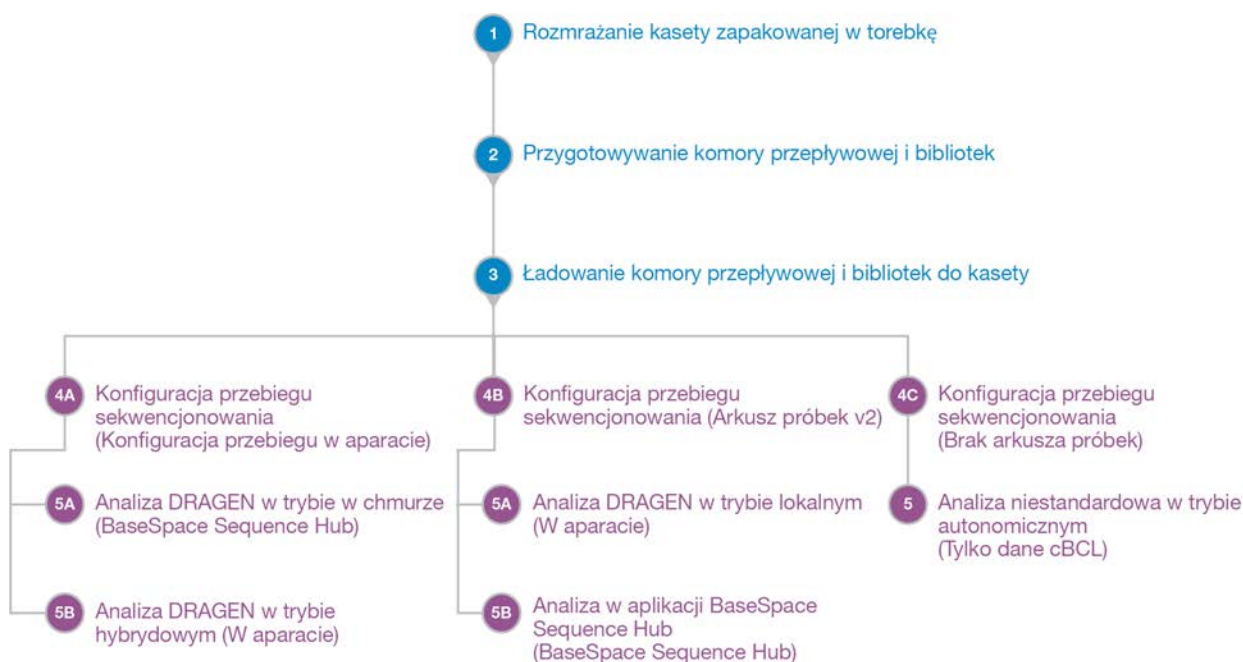
- **In Progress** (W toku) – oprogramowanie sterujące wczytuje pliki na platformę BaseSpace Sequence Hub.
- **Complete** (Zakończono) – pliki zostały pomyślnie przekazane do platformy BaseSpace Sequence Hub.

Rozwiązywanie problemu ze statusem

- Jeśli przebieg jest w toku, zamknąć ekran Process Management (Zarządzanie procesem), odczekać około pięciu minut, a następnie ponownie otworzyć ekran.
- Jeśli przebieg nie jest w toku, wyłączyć i ponownie włączyć aparat, a następnie ponownie otworzyć ekran Process Management (Zarządzanie procesem). Patrz: [Wyłączenie i ponowne włączenie aparatu na stronie 89](#).

Schemat protokołu sekwencjonowania

Poniższy schemat ilustruje protokół sekwencjonowania przy użyciu oprogramowania NextSeq 1000/2000.



Jak działa sekwencjonowanie

Tworzenie klastrów, sekwencjonowanie i analiza stanowią etapy procesu sekwencjonowania w sekwenatorach NextSeq 1000 i NextSeq 2000. Podczas przebiegu sekwencjonowania każda czynność jest realizowana automatycznie. W zależności od konfiguracji systemu dalsza analiza jest przeprowadzana poza aparatem po zakończeniu przebiegu.

Tworzenie klastrów

Biblioteka¹ jest automatycznie denaturowana do pojedynczych nici i dodatkowo rozcieńczana w aparacie. Podczas tworzenia klastrów pojedyncze cząsteczki DNA wiążą się z powierzchnią w komorze przepływowej i ulegają amplifikacji, tworząc klastry². Generacja klastra trwa około 4 godzin.

Sekwencjonowanie

Klastry są obrazowane przy użyciu dwukanałowego oznaczenia – jednego kanału zielonego i jednego kanału niebieskiego – w celu zakodowania danych dla czterech nukleotydów. Po ukończeniu obrazowania jednej płytki w komorze przepływowej obrazowana jest kolejna płytka. Proces ten jest powtarzany dla każdego cyklu sekwencjonowania (około 5 minut na cykl). Po analizie obrazów oprogramowanie Real-Time Analysis przeprowadza rozpoznawanie nukleotydów³, filtrowanie i ocenę jakościową⁴.

Analiza pierwotna

W miarę postępu przebiegu oprogramowanie sterujące automatycznie przesyła pliki rozpoznania nukleotydów⁵ (*.cbcl) do wskazanego folderu wyjściowego do analizy danych. Podczas przebiegu sekwencjonowania oprogramowanie do analizy w czasie rzeczywistym (RTA3) przeprowadza analizę obrazu, rozpoznawanie nukleotydów oraz demultipleksowanie⁶. Po zakończeniu sekwencjonowania rozpoczyna się analiza wtórna. Metoda wtórnej analizy danych zależy od aplikacji oraz konfiguracji systemu.

Analiza wtórna

Platforma BaseSpace Sequence Hub jest środowiskiem przetwarzania w chmurze firmy Illumina służącym do monitorowania przebiegów, analizy i zapisu danych oraz współpracy. Hostuje aplikacje DRAGEN i aplikacje platformy BaseSpace Sequence Hub, które obsługują typowe metody analizy na potrzeby sekwencjonowania.

¹Próbka DNA lub RNA z dołączonymi adapterami na potrzeby sekwencjonowania. Metody przygotowania mogą być różne.

²Grupa klonalna nici DNA w komorze przepływowej, która generuje pojedynczy odczyt sekwencjonowania. Każda nić DNA w komorze przepływowej stanowi punkt startowy dla szablonu, który podlega amplifikacji, aż klastery będzie zawierał setki lub tysiące kopii. Na przykład komora przepływowa z 10 000 klastrów pozwala wygenerować 10 000 pojedynczych odczytów lub 20 000 odczytów w trybie sparowanych końców.

³Określenie nukleotydu (A, C, G lub T) w każdym klastrze bloku w danym cyklu.

⁴Określa zbiór predyktorów jakościowych przy każdym rozpoznawaniu nukleotydów, a następnie używa wartości predyktorów do obliczenia wyniku jakościowego.

⁵Obejmuje rozpoznawanie nukleotydów i powiązany wynik jakościowy dla poszczególnych klastrów w każdym cyklu sekwencjonowania.

⁶Proces analityczny polegający na różnicowaniu odczytów z poszczególnych bibliotek w puli.

Po zakończeniu wstępnej analizy w ramach sekwencjonowania aplikacja DRAGEN przeprowadza analizę wtórną z wykorzystaniem jednej z dostępnych procedur analizy.

Gdy używany jest tryb w chmurze lub hybrydowy, aplikacja DRAGEN pobiera arkusz próbek, genom referencyjny oraz pliki wejściowe przebiegu z obszaru Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie) na platformie BaseSpace Sequence Hub. W przypadku trybu w chmurze dane cBCL są przekazywane automatycznie do platformy BaseSpace Sequence Hub, a platforma BaseSpace Sequence Hub inicjuje analizę wtórną DRAGEN. W przypadku trybu hybrydowego analiza wtórna DRAGEN jest przeprowadzana w aparacie, a pliki wyjściowe mogą być zapisywane w wybranym folderze lub w chmurze.

Jeśli używany jest tryb lokalny, aplikacja DRAGEN pobiera udostępniony arkusz próbek, genom referencyjny oraz pliki wejściowe przebiegu z sekwenatorów NextSeq 1000 i NextSeq 2000. Analiza wtórna DRAGEN jest przeprowadzana w aparacie, a pliki wyjściowe są zapisywane w wybranym folderze wyjściowym. Jeśli wybrano opcję Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie), analiza może być również inicjowana za pośrednictwem aplikacji platformy BaseSpace Sequence Hub po zakończeniu sekwencjonowania.

Jeśli używany jest tryb autonomiczny, należy skonfigurować przebieg bez arkusza próbek. Ta procedura jest zalecana w przypadku niestandardowych procedur analizy, które zaczynają się od danych cBCL.

- Więcej informacji o platformie BaseSpace Sequence Hub zawiera [Pomoc online platformy BaseSpace Sequence Hub](#).
- Więcej informacji o aplikacji DRAGEN można znaleźć na [stronie pomocy technicznej platformy DRAGEN Bio-IT](#).
- Przegląd wszystkich aplikacji można znaleźć na stronie [BaseSpace Apps](#) (Aplikacje BaseSpace).

Konfiguracja systemu

Niniejszy rozdział zawiera instrukcje dotyczące konfigurowania systemu, w tym opisy ustawień oprogramowania.

Instrukcje te opisują przede wszystkim oprogramowanie sterujące i zawierają określone informacje dotyczące konfigurowania sieci i systemu operacyjnego.

i | Jeśli w aparacie używana jest przeglądarka Google Chrome, pojawi się monit z prośbą o odblokowanie klucza logowania. Ten monit można bezpiecznie zignorować i anulować.

Wymagania dotyczące konta użytkownika

W systemie operacyjnym Linux są dostępne trzy konta:

- root (superadministrator)
- ilmnadmin (administrator)
- ilmnuser (użytkownik)

Konto administratora jest przeznaczone wyłącznie do stosowania aktualizacji systemu, na przykład do aktualizowania oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000, albo do użytku przez personel IT w celu zainstalowania stałego dysku sieciowego.

Wszystkie inne czynności, w tym sekwencjonowanie, należy wykonywać, korzystając z konta użytkownika.

Wymogi dotyczące hasła

Terenowy pracownik serwisu inicjuje zmianę hasła dla wszystkich trzech kont po zakończeniu instalacji aparatu. Każde hasło należy aktualizować co 180 dni (po wyświetleniu monitu).

Tabela 1 Domyślne zasady dotyczące haseł

Zasada	Ustawienie
Wymuszone tworzenie historii haseł	Zapamiętywanie pięciu haseł
Próg blokady	Dziesięć nieudanych prób logowania
Minimalna długość hasła	Dziesięć znaków
Minimalna różnorodność znaków	Trzy znaki z każdej kategorii znaków: cyfra, wielka litera, mała litera i symbol

Zasada	Ustawienie
Maksymalna liczba powtarzających się znaków	Trzy znaki
Hasło musi spełniać wymogi dotyczące złożoności	Wyłączone
Przechowywanie haseł z użyciem odwracalnego szyfrowania	Wyłączone

Dodawanie nowego użytkownika

- Zalogować się do konta ilmnadmin.
- Wybrać przycisk zasilania, a następnie otworzyć listę rozwijaną konta ilmnadmin.
- Wybrać opcję **Account Settings** (Ustawienia konta).
- Wybrać opcję **Unlock** (Odblokuj), a następnie wprowadzić hasło dostępu do konta ilmnadmin.
- Wybrać opcję **Add User** (Dodaj użytkownika).
- Wybrać typ konta Standard, a następnie wprowadzić nową nazwę użytkownika.
- Wybrać opcję **Set password now** (Ustaw hasło teraz), a następnie wprowadzić hasło.
- Wybrać opcję **Add** (Dodaj).
Nowy użytkownik zostanie dodany do listy Users (Użytkownicy).
- Nadać użytkownikowi uprawnienia dostępu do oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000, wykonując poniższe czynności.
 - Otworzyć terminal.
 - Wprowadzić poniższe polecenie:

```
$ sudo usermod -a -G ilmnusers <nowa nazwa użytkownika>
```
 - Jeśli pojawi się monit, wprowadzić hasło konta ilmnadmin.
- Aby potwierdzić, że uprawnienia użytkownika zostały poprawnie skonfigurowane, wykonać poniższe czynności.
 - Zalogować się do konta nowego użytkownika.
 - Przejsć do oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000.
 - Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).
 - W obszarze Default Output Folder (Domyślny folder wyjściowy) sprawdzić, czy można wybrać i zapisać ścieżkę folderu wyjściowego.
Jeśli można wybrać i zapisać ścieżkę folderu wyjściowego bez żadnych błędów, oznacza to, że uprawnienia zostały poprawnie skonfigurowane.

Resetowanie hasła

W niniejszej części omówiono szczegóły dotyczące sposobu resetowania hasła do konta ilmuser, ilmadmin lub root. Funkcja odzyskiwania hasła jest niedostępna. Zresetowanie hasła nie powoduje obejścia blokady konta po zbyt wielu próbach wprowadzenia błędnego hasła. Przed zresetowaniem hasła lub próbą zalogowania się należy odczekać 10 minut.

Resetowanie hasła konta ilmuser

Hasło konta ilmuser może zresetować użytkownik, który zna hasło konta ilmadmin lub root.

1. Zalogować się do konta ilmadmin.
2. Otworzyć terminal.
3. Wprowadzić polecenie `sudo passwd ilmuser`.
4. W oknie monitu wprowadzić hasło konta ilmadmin.
5. W oknie monitu wprowadzić nowe hasło konta ilmuser.
6. W oknie monitu ponownie wpisać hasło konta ilmuser, aby potwierdzić nowe hasło.

Resetowanie hasła konta ilmadmin

Hasło konta ilmadmin może zresetować użytkownik, który zna hasło konta root.

1. Zalogować się do konta root.
2. Otworzyć terminal.
3. Wprowadzić polecenie `passwd ilmadmin` w celu zmiany hasła konta ilmadmin albo polecenie `passwd ilmuser` w celu zmiany hasła konta ilmuser.
4. W oknie monitu wprowadzić nowe hasło.
5. W oknie monitu ponownie wpisać nowe hasło, aby je potwierdzić.

Resetowanie hasła konta root

W celu zresetowania hasła konta root należy użyć jednej z poniższych opcji:

- Jeśli znane jest hasło ustalone podczas ostatniego przechwytywania obrazu systemu operacyjnego, należy przywrócić ten zapisany obraz.
- Jeśli to hasło nie jest znane, należy się skontaktować z pomocą techniczną firmy Illumina.

Konfigurowanie platformy BaseSpace Sequence Hub i usługi Proactive Support

Poniższe instrukcje umożliwiają skonfigurowanie platformy BaseSpace Sequence Hub i usługi Proactive Support w posiadanym systemie. Aby skonfigurować konto na platformie BaseSpace Sequence Hub, należy się zapoznać z [Pomocą online platformy BaseSpace Sequence Hub](#).

1. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).

2. Na potrzeby ustawień platformy BaseSpace Sequence Hub i usługi Proactive Support wybrać jedną z poniższych opcji:

Opcja	Opis i wymagania
Proactive Support Only* (Tylko usługa Proactive Support)	Powoduje wysyłanie danych dotyczących działania aparatu do firmy Illumina w celu szybszego rozwiązywania problemów. Wymaga połączenia internetowego.
Proactive and Run Monitoring (Usługa Proactive i monitorowanie przebiegu)	Powoduje wysyłanie plików InterOp i plików dziennika do platformy BaseSpace Sequence Hub na potrzeby zdalnego monitorowania przebiegu. Ta opcja jest opcją domyślną. Wymaga konta na platformie BaseSpace Sequence Hub oraz połączenia internetowego.
Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie)	Powoduje wysyłanie plików InterOp, plików dziennika i danych przebiegu na platformę BaseSpace Sequence Hub w celu zdalnego monitorowania i analizy. Wymaga konta na platformie BaseSpace Sequence Hub, połączenia internetowego oraz arkusza próbek.
None (Brak)	Powoduje odłączenie przebiegów od kont na platformie BaseSpace Sequence Hub, a dane dotyczące działania aparatu nie są wysyłane na potrzeby usługi Illumina Proactive Support.

* W zależności od wersji oprogramowania sterującego nazwa tego ustawienia w interfejsie oprogramowania może się różnić od nazwy w niniejszym przewodniku.

W przypadku wybrania jakiegokolwiek opcji innej niż None (Brak) usługa Proactive Support zostaje włączona. Jest to bezpłatna usługa, która umożliwia wyświetlanie danych dotyczących działania aparatu w panelu klienta MyIllumina, a zespołom serwisowym firmy Illumina pozwala szybciej rozwiązywać problemy.

- i** | Domyślnie włączona jest opcja Proactive and Run Monitoring (Usługa Proactive i monitorowanie przebiegu). Aby zrezygnować z tej usługi, należy wybrać opcję **None** (Brak).
- W przypadku wybrania opcji None (Brak) w kroku 2 należy wybrać opcję **Save** (Zapisz) w celu zakończenia. W przeciwnym razie kontynuować, przechodząc do kroku 6.
 - Z listy Hosting Location (Lokalizacja hostingowa) wybrać lokalizację na serwerze platformy BaseSpace Sequence Hub, do którego przekazywane są dane.
Upewnić się, że używana lokalizacja hostingowa mieści się w regionie lub jak najbliżej regionu, w którym znajduje się konkretny system.
 - W przypadku posiadania subskrypcji Enterprise wprowadzić nazwę domeny (URL), która jest używana na potrzeby konta na platformie BaseSpace Sequence Hub.

Na przykład: <https://nazwalaboratorium.basespace.illumina.com>.

6. Wybrać opcję **Save** (Zapisz).

Określanie domyślnej lokalizacji folderu wyjściowego

Instrukcje zawarte w niniejszej części umożliwiają wybór domyślnej lokalizacji folderu wyjściowego. Folder wyjściowy można zmienić dla każdego przebiegu podczas konfiguracji przebiegu. Oprogramowanie zapisuje w folderze wyjściowym pliki cBCL¹ oraz inne dane przebiegu.

Folder wyjściowy jest wymagany, chyba że dla platformy BaseSpace Sequence Hub wybrano w konfiguracji opcję Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie). Jako domyślny folder wyjściowy należy używać wyłącznie dysku zewnętrznego lub sieciowego. Korzystanie z folderu wyjściowego w aparacie negatywnie wpływa na sekwencjonowanie.

Określanie folderu wyjściowego na dysku zewnętrznym

Poniższe instrukcje umożliwiają wybranie zewnętrznego dysku przenośnego jako domyślnego folderu wyjściowego. Zalecany jest dysk z zasilaniem własnym sformatowany zgodnie z systemem NTFS lub GPT/EXTA.

1. Podłączyć zewnętrzny dysk przenośny do portu 3.0 USB na bocznej lub tylnej ścianie aparatu. Upewnić się, że zewnętrzny dysk przenośny zapewnia uprawnienia do zapisu. Jeśli dysk jest ustawiony w trybie Read Only (Tylko odczyt), wówczas oprogramowanie sterujące nie będzie mogło zapisywać na nim danych.
2. Utworzyć nowy folder na zewnętrznym dysku przenośnym. Ten folder stanie się domyślną lokalizacją dla folderu wyjściowego.
Oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 wymaga co najmniej dwóch poziomów zagnieżdżonych folderów w celu rozpoznania, że lokalizacja jest zewnętrznym dyskiem przenośnym.
3. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).
4. W obszarze Default Output Folder (Domyślny folder wyjściowy) wybrać ścieżkę do istniejącego folderu i przejść do nowego folderu na zewnętrznym dysku przenośnym.
5. **[Opcjonalnie]** Jeśli wybrano opcję **Online Run Setup** (Konfiguracja przebiegu w trybie online) w obszarze Run Mode (Tryb przebiegu), wybrać opcję z menu rozwijanego Hosting Location (Lokalizacja hostingowa).
6. Wybrać opcję **Save** (Zapisz).

¹Obejmuje rozpoznawanie nukleotydów i powiązany wynik jakościowy dla poszczególnych klastrów w każdym cyklu sekwencjonowania.

Określanie domyślnego folderu wyjściowego na dysku sieciowym

Należy postępować zgodnie z poniższymi instrukcjami, aby zainstalować stały dysk sieciowy i określić lokalizację domyślnego folderu wyjściowego. Protokoły Server Message Block (SMB)/Common Internet File System (CIFS) oraz Network File System (NFS) stanowią jedyne obsługiwane metody instalowania stałego dysku sieciowego w systemie NextSeq 1000/2000.

Instrukcje instalacji zgodnie z protokołem SMB/CIFS

1. Jeśli oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 jest otwarte, wybrać opcję **Minimize Application** (Zminimalizuj aplikację).
2. Zalogować się do konta ilmnaadmin.
3. Wybrać opcję **Applications** (Aplikacje).
4. W polu Favorites (Ulubione) wybrać opcję **Terminal** (Terminal).
5. Wprowadzić polecenie `sudo touch /root/.smbcreds`, a następnie wybrać opcję **Enter** (Wprowadź).
6. Po wyświetleniu monitu wprowadzić hasło konta ilmnaadmin.
Hasło konta ilmnaadmin jest wymagane za każdym razem, gdy używane jest polecenie `sudo`.
7. Wprowadzić polecenie `sudo gedit /root/.smbcreds` i wybrać opcję **Enter** (Wprowadź), aby otworzyć plik tekstowy o nazwie `smbcreds`.
8. Gdy zostanie otwarty plik tekstowy `.smbcreds`, wprowadzić dane logowania do sieci w poniższym formacie:


```
username=<nazwa_uzytkownika>
password=<haslo>
domain=<nazwa_domeny>
```

W przypadku nazwy użytkownika, hasła i domeny nie są wymagane nawiasy kwadratowe. Nazwa domeny jest wymagana wyłącznie wówczas, gdy konto zdalne jest częścią domeny.
9. Wybrać opcję **Save** (Zapisz) i zamknąć plik.
10. Podać nazwę serwera i nazwę udziału dla serwera SMB/CIFS.
Nazwa serwera ani nazwa udziału nie mogą zawierać spacji – na przykład:
Nazwa serwera: `192.168.500.100` lub `Myserver-myinstitute-03`
Nazwa udziału: `/share1`
11. W terminalu wprowadzić polecenie `sudo chmod 400 /root/.smbcreds`, a następnie wybrać opcję **Enter** (Wprowadź), aby nadać uprawnienie do odczytu pliku tekstowego `.smbcreds`.
12. Wprowadzić polecenie `sudo mkdir /mnt/<nazwa_lokalna>`.
`<nazwa_lokalna>` to nazwa nowego katalogu na dysku sieciowym, która może zawierać spację. Jest to katalog, który pojawi się w aparacie.
13. Wybrać opcję **Enter** (Wprowadź).
14. Wprowadzić polecenie `sudo gedit /etc/fstab` i wybrać opcję **Enter** (Wprowadź).

15. Gdy zostanie otwarty plik fstab, wprowadzić poniższe polecenie na końcu pliku, a następnie wybrać opcję **Enter** (Wprowadź).

```
//<nazwa serwera>/<nazwa udziału> /mnt/<nazwa lokalna> cifs
credentials=/root/.smbcreds,uid=ilmnadmin,gid=ilmnusers,dir_
mode=0775,file_mode=0775,_netdev,x-systemd.automount,sec=ntlmssp 0 0
```

16. Wybrać opcję **Save** (Zapisz) i zamknąć plik.
17. W terminalu wprowadzić polecenie `sudo mount -a -vvv`, a następnie wybrać opcję **Enter** (Wprowadź).
Dysk sieciowy został zainstalowany jako `/mnt/<nazwa lokalna>`.
18. Aby potwierdzić, że instalacja powiodła się, wprowadzić polecenie `<df | grep <nazwa lokalna>>`, a następnie wybrać opcję **Enter** (Wprowadź).
Powinna pojawić się nazwa udziału plików.
19. Wprowadzić polecenie `sudo mkdir /mnt/<nazwa lokalna>/<katalog wyjściowy>`, aby utworzyć podfolder w katalogu lokalnym. `<katalog wyjściowy>` reprezentuje domyślną lokalizację folderu wyjściowego.
Oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 wymaga co najmniej dwóch poziomów zagnieżdżonych folderów w celu rozpoznania, że lokalizacja jest zainstalowanym dyskiem sieciowym.
20. Wyłączyć i ponownie włączyć aparat. Patrz: [Wyłączenie i ponowne włączenie aparatu na stronie 89](#).
21. Ustawić stały zainstalowany dysk sieciowy jako domyślny folder wyjściowy. Patrz: [Określanie stałego dysku sieciowego jako domyślnego folderu wyjściowego na stronie 18](#).

Instrukcje instalacji zgodnie z systemem plików NFS

1. Jeśli oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 jest otwarte, wybrać opcję **Minimize Application** (Zminimalizuj aplikację).
2. Zalogować się do konta ilmadmin.
3. Podać nazwę serwera NFS.
Nazwa serwera nie może zawierać spacji – na przykład:
Nazwa serwera: `192.168.500.100` lub `Myserver-myinstitute-03`
4. Wybrać opcję **Applications** (Aplikacje).
5. W polu Favorites (Ulubione) wybrać opcję **Terminal** (Terminal).
6. Wprowadzić polecenie `sudo mkdir /mnt/<nazwa lokalna>` i wybrać opcję **Enter** (Wprowadź).
`<nazwa lokalna>` to nazwa nowego katalogu na dysku sieciowym.
7. Wprowadzić polecenie `sudo gedit /etc/fstab` i wybrać opcję **Enter** (Wprowadź).
8. Gdy zostanie otwarty plik fstab, wprowadzić poniższe polecenie, a następnie wybrać opcję **Enter** (Wprowadź).

```
Nazwa serwera:/share //mnt/<nazwa lokalna> nfs x-  
systemd.automount,defaults 0 0
```

- Wybrać opcję **Save** (Zapisz) i zamknąć plik.
- W terminalu wprowadzić polecenie `sudo mount -a -vvv`, a następnie wybrać opcję **Enter** (Wprowadź).
Dysk sieciowy został zainstalowany w katalogu `/mnt/directory` w folderze `<nazwa lokalna>`.
- Utworzyć nowy `<podfolder>` w folderze `<nazwa lokalna>`. Ten podfolder reprezentuje domyślną lokalizację folderu wyjściowego.
Oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 wymaga co najmniej dwóch poziomów zagnieżdżonych folderów w celu rozpoznania, że lokalizacja jest zainstalowanym dyskiem sieciowym.
- Wyłączyć i ponownie włączyć aparat. Patrz: [Wyłączenie i ponowne włączenie aparatu na stronie 89](#).
- Ustawić stały zainstalowany dysk sieciowy jako domyślny folder wyjściowy. Patrz: [Określanie stałego dysku sieciowego jako domyślnego folderu wyjściowego na stronie 18](#).

Określanie stałego dysku sieciowego jako domyślnego folderu wyjściowego

- Zalogować się do konta `ilmnuser`.
- Z menu oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000 wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).
- W obszarze Default Output Folder (Domyślny folder wyjściowy) wybrać instalację stałego dysku sieciowego, która znajduje się w katalogu `/mnt/<nazwa lokalna>/<katalog wyjściowy>`.
- [Opcjonalnie]** Jeśli wybrano opcję **Online Run Setup** (Konfiguracja przebiegu w trybie online) w obszarze Run Mode (Tryb przebiegu), wybrać opcję z menu rozwijanego Hosting Location (Lokalizacja hostingowa).
- Wybrać opcję **Save** (Zapisz).

Importowanie niestandardowych genomów referencyjnych

Nowe niestandardowe genomy referencyjne mogą być importowane wyłącznie za pośrednictwem konta administratora. Aby uzyskać listę wszystkich zgodnych genomów referencyjnych, należy odwiedzić stronę poświęconą zgodności produktów z systemem NextSeq 1000/2000.

- Utworzyć genom referencyjny za pomocą aplikacji Reference Builder for Illumina Instruments na platformie BaseSpace Sequence Hub. Więcej informacji zawiera *Pomoc online dla aplikacji Reference Builder for Illumina Instruments w wersji 1.0.0*.
- Wybrać menu oprogramowania sterującego, a następnie wybrać opcję **Process Management** (Zarządzanie procesem).
- Upewnić się, że w aparacie nie są aktualnie przeprowadzane żadne przebiegi sekwencjonowania ani analizy wtórne.

4. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Minimize Application** (Minimalizuj aplikację).
5. Zalogować się do konta ilmnadmin.
6. Wybrać menu oprogramowania sterującego, a następnie wybrać opcję **DRAGEN**.
7. W sekcji Genome (Genom) wybrać opcję **View Installed Genomes** (Wyświetl zainstalowane genomy), aby wyświetlić listę wszystkich aktualnie zainstalowanych genomów firmy Illumina i niestandardowych.
8. Zamknąć okno modalne.
9. Wybrać opcję **Choose** (Wybierz) w obszarze Import New Reference Genomes (Import nowych genomów referencyjnych), przejść do pliku genomu referencyjnego (*.tar.gz) na przenośnym lub zainstalowanym dysku sieciowym, a następnie wybrać opcję **Open** (Otwórz).
10. Wybrać opcję **Import** (Importuj).

Importowanie plików szumu bazowego

Jeśli procedura DRAGEN Enrichment jest używana w trybie linii somatycznej, można użyć pliku szumu bazowego, aby odfiltrować szum sekwencjonowania lub systematyczny. Standardowe pliki szumu można pobrać z [witryny działu pomocy firmy Illumina](#) albo można utworzyć plik niestandardowego szumu bazowego.

Generowanie pliku niestandardowego szumu bazowego

Jeśli używany jest tryb linii somatycznej, można wygenerować plik niestandardowego szumu bazowego. Plik szumu bazowego jest tworzony z użyciem próbek standardowych, które nie pasują do obiektu badań, z którego pochodzą próbki. Zalecana liczba próbek standardowych to 50.

W celu wygenerowania pliku niestandardowego szumu bazowego należy użyć jednej z poniższych metod:

- Użyć serwera platformy DRAGEN Bio-IT. Instrukcje zawiera *Pomoc online* platformy DRAGEN Bio-IT.
- Użyć aplikacji DRAGEN Baseline Builder na platformie BaseSpace Sequence Hub. Użyć procedury BCL Convert w ramach narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie) na platformie BaseSpace Sequence Hub, aby wygenerować pliki FASTQ. Gdy sekwencjonowanie zostanie zakończone i będzie dostępnych 50 próbek, wprowadzić pliki FASTQ do aplikacji DRAGEN Baseline Builder.

Importowanie plików bazowych za pomocą interfejsu użytkownika

Po zaimportowaniu pliku bazowego można skonfigurować sekwencjonowanie, używając procedury DRAGEN Enrichment w trybie linii somatycznej.

1. Pobrać standardowy plik bazowy z [witryny działu pomocy firmy Illumina](#) albo pobrać niestandardowy plik bazowy z serwera DRAGEN lub aplikacji DRAGEN Baseline Builder.

2. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Minimize Application** (Minimalizuj aplikację).
3. Zalogować się do konta ilmnadmin.
4. Wybrać opcję **Applications** (Aplikacje), a następnie opcję **Favorites** (Ulubione).
5. Wybrać opcję **+Other Locations** (+Inne lokalizacje), a następnie opcję **Computer** (Komputer).
6. Kliknąć dwukrotnie pozycję **usr**, a następnie pozycję **local**.
7. Kliknąć dwukrotnie pozycję **illumina**, a następnie pozycję **aux_files**.
8. Przeciągnąć plik szumu bazowego do folderu aux_files.

Importowanie plików bazowych za pomocą terminala

Po zaimportowaniu pliku bazowego można skonfigurować sekwencjonowanie, używając procedury DRAGEN Enrichment w trybie linii somatycznej.

1. Pobrać standardowy plik bazowy z [witryny działu pomocy firmy Illumina](#) albo pobrać niestandardowy plik bazowy z serwera DRAGEN lub aplikacji DRAGEN Baseline Builder.
2. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Minimize Application** (Minimalizuj aplikację).
3. Zalogować się do konta ilmnadmin.
4. Wybrać opcję **Applications** (Aplikacje).
5. W polu Favorites (Ulubione) wybrać opcję **Terminal** (Terminal).
6. Wprowadzić poniższe polecenie:

```
cp [ścieżka/pliku/bazowego] /usr/local/illumina/aux_files
```

Konfiguracja trybu przebiegu

Tryb przebiegu ma zastosowanie do wszystkich przebiegów i określa, gdzie wprowadzane są parametry przebiegu i w jaki sposób analizowane są dane.

Tryb w chmurze lub hybrydowy

1. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).
2. W obszarze BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support (Usługi platformy BaseSpace Sequence Hub i usługa Proactive Support) wybrać opcję **Online Run Setup** (Konfiguracja przebiegu w trybie online).
3. Odpowiednio skonfigurować dodatkowe ustawienia, wybierając poniższe opcje:
 - a. **Proactive and Run Monitoring** (Usługa Proactive i monitorowanie przebiegu) lub **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie).
 - b. Menu rozwijane dla lokalizacji **Hosting Location** (Lokalizacja hostingowa).
 - c. **[Opcjonalnie]** Wprowadzić nazwę w polu **Private Domain Name** (Nazwa domeny prywatnej).
4. Wybrać opcję **Save** (Zapisz).

Tryb lokalny lub autonomiczny

1. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).
2. W obszarze BaseSpace Sequence Hub Services & Proactive Support (Usługi platformy BaseSpace Sequence Hub i usługa Proactive Support) wybrać opcję **Local Run Setup** (Konfiguracja przebiegu w trybie lokalnym).
3. Odpowiednio skonfigurować dodatkowe ustawienia, wybierając poniższe opcje:
 - a. **Proactive Support Only** (Tylko usługa Proactive Support), **Proactive and Run Monitoring** (Usługa Proactive i monitorowanie przebiegu), **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie) lub **None** (Brak).



Platforma BaseSpace Sequence Hub zezwoli na funkcję ponownego umieszczania w kolejce wyłącznie w przypadku wyboru opcji **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie). W przypadku nieprawidłowego arkusza próbek ta funkcja umożliwi wprowadzanie poprawek do arkusza próbek i ponowne umieszczanie analizy demultipleksowania w kolejce. Informacje o funkcji ponownego umieszczania w kolejce w aparacie zawiera część [Ponowne umieszczanie przebiegu w kolejce na stronie 88](#).

- b. Menu rozwijane dla lokalizacji **Hosting Location** (Lokalizacja hostingowa).
 - c. **[Opcjonalnie]** Wprowadzić nazwę w polu **Private Domain Name** (Nazwa domeny prywatnej).
4. Wybrać opcję **Save** (Zapisz).

Uwagi dotyczące arkusza próbek w przypadku trybu lokalnego lub autonomicznego

W celu wykonywania analizy z użyciem rozwiązania DRAGEN należy używać pliku arkusza próbek w formacie v2. Plik arkusza próbek w formacie v2 jest również zgodny z aplikacjami platformy BaseSpace Sequence Hub, które nie są aktywne dla rozwiązania DRAGEN. Informacje o tworzeniu pliku arkusza próbek w formacie v2 zawiera część [Ustawienia arkusza próbek v2 na stronie 92](#).

Dostosowywanie aparatu

Niniejsza część zawiera informacje na temat konfigurowania dostępnych ustawień dostosowywania. Informacje o ustawianiu domyślnego folderu wyjściowego zawiera część [Określanie domyślnej lokalizacji folderu wyjściowego na stronie 15](#).

Nadawanie nazwy aparatowi

1. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).
2. Wybrać opcję Instrument Nickname (Nazwa aparatu) i wprowadzić preferowaną nazwę aparatu. Nazwa jest wyświetlana w górnej części każdego ekranu.
3. Wybrać opcję **Save** (Zapisz).

Ustawianie preferencji dotyczących denaturacji i rozcieńczania

1. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).
2. Wybrać, czy biblioteki mają być automatycznie poddawane denaturacji i rozcieńczaniu w aparacie. Dla tego ustawienia domyślnie konfigurowana jest wartość wybrana dla poprzedniego przebiegu.
 - Aby przeprowadzać denaturowanie i rozcieńczanie bibliotek automatycznie w aparacie, zaznaczyć pole wyboru **Denature and Dilute On Board** (Denaturacja i rozcieńczanie w aparacie).
 - Aby ręcznie rozcieńczać i denaturować biblioteki, usunąć zaznaczenie pola wyboru **Denature and Dilute On Board** (Denaturacja i rozcieńczanie w aparacie).Instrukcje dotyczące ręcznego denaturowania i rozcieńczania bibliotek zawiera *Przewodnik dotyczący denaturacji i rozcieńczania w sekwenatorach NextSeq 1000 i 2000* (nr dokumentu: 1000000139235).

Ustawianie preferencji automatycznego czyszczenia odczynników

1. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).
2. W celu usprawnienia utylizacji zużytych odczynników po zakończeniu przebiegu można wybrać, czy system ma po każdym przebiegu automatycznie usuwać nieużyte odczynniki do przedziału zużytych odczynników:
 - Aby usuwać odczynniki automatycznie, zaznaczyć pole wyboru **Purge Reagent Cartridge** (Wyczyść kasetę odczynników).
 - Aby pominąć automatyczne usuwanie odczynników, usunąć zaznaczenie pola wyboru **Purge Reagent Cartridge** (Wyczyść kasetę odczynników) (jest to ustawienie domyślne).Usuwanie nieużytych odczynników powoduje wydłużenie procedury o 2 godziny.
3. Wybrać opcję **Save** (Zapisz).

Konfigurowanie aktualizacji oprogramowania

1. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).
2. Wybrać, czy system ma automatycznie sprawdzać dostępność aktualizacji oprogramowania:
 - Aby włączyć opcję sprawdzania automatycznego, zaznaczyć pole wyboru **Autocheck for software updates** (Automatycznie sprawdzaj dostępność aktualizacji oprogramowania).
 - Aby włączyć opcję sprawdzania ręcznego, usunąć zaznaczenie pola wyboru **Autocheck for software updates** (Automatycznie sprawdzaj dostępność aktualizacji oprogramowania).Automatyczne sprawdzanie dostępności aktualizacji oprogramowania wymaga połączenia internetowego. Więcej informacji dotyczących instalowania aktualizacji oprogramowania zawiera część [Aktualizacje oprogramowania na stronie 81](#).
3. Wybrać opcję **Save** (Zapisz).

Zmiana jasności wyświetlacza LCD

1. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).
2. Przesunąć suwak jasności wyświetlacza LCD w celu wybrania żądanej wartości procentowej.
3. Wybrać opcję **Save** (Zapisz).

Ustawianie serwera proxy

Obsługa serwera proxy jest dostępna wyłącznie w przypadku oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000 w wersji 1.3.

1. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Settings** (Ustawienia).
2. Wybrać bieżące ustawienia serwera proxy, aby otworzyć ekran Proxy Settings (Ustawienia serwera proxy).
3. Zaznaczyć pole wyboru **Enable Proxy** (Włącz serwer proxy), a następnie wprowadzić adres IP portu serwera.
4. **[Opcjonalnie]** Jeśli serwer proxy wymaga uwierzytelniania, zaznaczyć pole wyboru **Requires Username and Password** (Wymaga nazwy użytkownika i hasła), a następnie wprowadzić nazwę użytkownika i hasło.
5. Wybrać opcję **Save** (Zapisz), aby zapisać informacje o serwerze proxy i sprawdzić ich poprawność.
6. Wybrać jedną z poniższych opcji:
 - Wybrać opcję **Yes, I'm Finished** (Tak, skończone), aby ponownie uruchomić system i zastosować nowe ustawienia serwera proxy.
 - Wybrać opcję **No, Take Me Back** (Nie, wróć do poprzedniego ekranu), aby wrócić do ekranu Settings (Ustawienia). Nowe ustawienia serwera proxy są zapisane, ale zostaną zastosowane dopiero po ponownym uruchomieniu systemu.

Materiały eksploatacyjne i sprzęt

W niniejszym rozdziale udostępniono listę wszystkich elementów zawartych w zestawie odczynników wraz z informacją o warunkach przechowywania. W tym rozdziale można również sprawdzić, jakie pomocnicze materiały eksploatacyjne i sprzęt należy zakupić w celu zrealizowania protokołu i wykonywania procedur konserwacji oraz rozwiązywania problemów.

Materiały eksploatacyjne do sekwencjonowania

Sekwencjonowanie w systemie NextSeq 1000/2000 wymaga jednego zestawu odczynników Illumina NextSeq 1000/2000 P2 przeznaczonego do jednorazowego użytku albo jednego zestawu odczynników Illumina NextSeq 1000/2000 P3 przeznaczonego do jednorazowego użytku. Zestaw odczynników NextSeq 1000/2000 P2 jest dostępny w trzech rozmiarach (100 cykli, 200 cykli, 300 cykli), a zestaw NextSeq 1000/2000 P3 jest dostępny w czterech rozmiarach (50 cykli, 100 cykli, 200 cykli, 300 cykli).

Sekwenator NextSeq 1000 jest zgodny wyłącznie z zestawem odczynników Illumina NextSeq 1000/2000 P2.

Ten zestaw odczynników obejmuje kasetę i komorę przepływową do sekwencjonowania. Po otrzymaniu zestawu odczynników Illumina NextSeq 1000/2000 P2 lub Illumina NextSeq 1000/2000 P3:

- Niezwłocznie umieścić elementy we wskazanej temperaturze w celu zapewnienia poprawnego działania.
- Nie otwierać srebrnej torebki foliowej, chyba że pojawi się instrukcja, aby ją otworzyć.
- Kasety przechowywać w ich opakowaniu, aby uniknąć rozerwania lub przebicia torebki foliowej.
- Kasety przechowywać ze strzałkami skierowanymi do góry.


 Jeśli etykieta kasety nie jest skierowana do góry, wpłynie to niekorzystanie na dane sekwencjonowania.

Tabela 2 Elementy zestawu

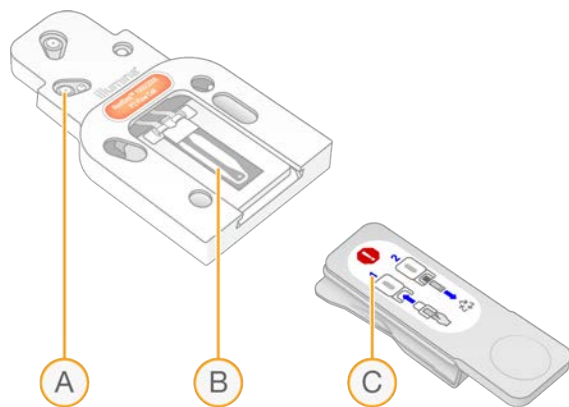
Materiał eksploatacyjny	Ilość	Temperatura przechowywania	Wymiary
Kaseta	1	Od -25°C do -15°C	29,2 cm × 17,8 cm × 12,7 cm (11,5 cala × 7 cali × 5 cali)
Komorę przepływową	1	Od 2°C do 8°C*	21,6 cm × 12,7 cm × 1,9 cm (8,5 cala × 5 cali × 0,75 cala)
RSB z Tween 20	1	Od -25°C do -15°C	4 cm × 6,6 cm × 5 cm (1,6 cala × 2,6 cala × 2 cale)

* Dostarczana w temperaturze pokojowej.

Oba materiały eksploatacyjne mają identyfikatory umożliwiające śledzenie i zapewnienie zgodności. Kasetka i komora przepływowa wykorzystują technologię RFID¹.

Komora przepływowa

Komora przepływowa jest uporządkowaną, jednopasmową komorą przepływową. Szklana komora przepływowa znajduje się wewnątrz plastikowej kasetki. W celu zapewnienia bezpiecznego sposobu obsługi z komory przepływowej wystaje szary uchwyt, który ją również zasłania.



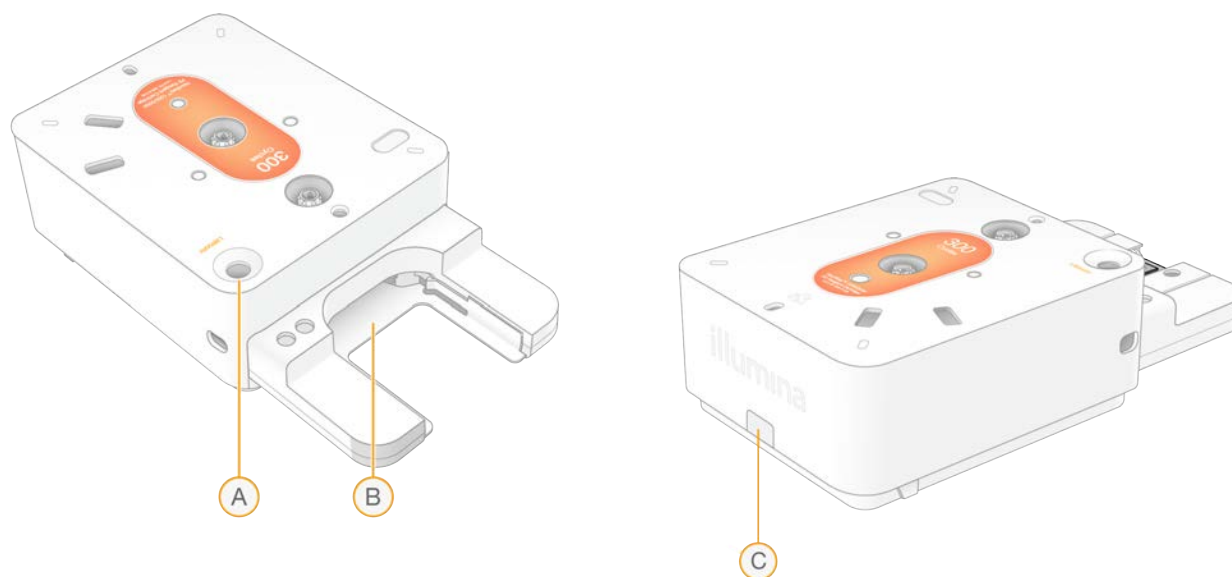
- A. Plastikowa kasetka
- B. Komora przepływowa
- C. Szary uchwyt

Powierzchnię wewnętrzną komory przepływowej pokrywają miliony nanodołków. W nanodołkach tworzą się klastry, z poziomu których jest następnie przeprowadzana reakcja sekwencjonowania. Uporządkowany układ nanodołków pozwala zwiększyć liczbę odczytów wyników i ilość danych.

¹identyfikacja za pomocą fal radiowych

Kaseta

Kaseta odczynników do sekwencjonowania jest wstępnie wypełniona odczynnikami do pracy z klastrami, sekwencjonowania, sekwencjonowania w trybie sparowanych końców i indeksowania. Zbiornik pokryty folią zabezpieczającą jest zarezerwowany dla bibliotek, a gniazdo z przedniej strony jest zarezerwowane dla komory przepływowej.



- A. Zbiornik na bibliotekę
- B. Gniazdo komory przepływowej
- C. Zatyczka odpływu

Kaseta zawiera wszystkie materiały eksploatacyjne do przebiegu: odczynniki, bibliotekę i komorę przepływową. Bibliotekę i komorę przepływową ładuje się do rozmrożonej kasety, która jest następnie ładowana do aparatu. Po rozpoczęciu przebiegu odczynniki i biblioteka są automatycznie przenoszone z kasety do komory przepływowej.

Kaseta zawiera pompy, zawory i cały układ przepływowy do systemu, w tym zbiornik spodni służący do gromadzenia zużytych odczynników. Po przebiegu kaseta jest utylizowana, dlatego płukanie aparatu nie jest wymagane.

Obsługiwana liczba cykli


Etykieta widoczna na kasecie wskazuje liczbę cykli, podczas których wykonywana jest analiza, a nie liczbę przeprowadzanych cykli. Komorę przepływową można stosować do dowolnej liczby cykli i dowolnego typu odczytu.

Wszystkie kasety do 100 i 200 cykli obejmują dodatkowe 38 cykli. Kaseeta do 300 cykli obejmuje dodatkowe 27 cykli. Na przykład kaseeta do 300 cykli zawiera odczynniki w objętości wystarczającej do przeprowadzenia maksymalnie 327 cykli sekwencjonowania. Informacje na temat liczby cykli w procesie sekwencjonowania zawiera część [Liczba cykli w odczycie na stronie 32](#).

Opisy symboli

Poniższa tabela zawiera opisy symboli stosowanych na materiałach eksploatacyjnych lub ich opakowaniach.

Symbol	Opis
	Termin ważności materiału eksploatacyjnego. W celu uzyskania najlepszych wyników materiał eksploatacyjny powinien zostać użyty przed tym terminem.
	Wskazuje producenta (Illumina).
	Przeznaczenie materiału wyłącznie do celów badawczych.
	Wskazuje numer katalogowy umożliwiający identyfikację materiału eksploatacyjnego ¹ .
	Wskazuje kod partii umożliwiający identyfikację partii lub serii produkcyjnej materiału eksploatacyjnego ¹ .
	Wskazuje na zagrożenie dla zdrowia.

Symbol	Opis
	Zakres temperatur przechowywania w stopniach Celsjusza. Materiał eksploatacyjny należy przechowywać w temperaturze mieszczącej się we wskazanym zakresie ² .

Pomocnicze materiały eksploatacyjne

Należy zakupić następujące materiały eksploatacyjne na potrzeby sekwencjonowania i konserwacji.

Materiały eksploatacyjne do sekwencjonowania

Tabela 3 Materiały eksploatacyjne do sekwencjonowania

Materiał eksploatacyjny	Dostawca	Cel
Rękawice jednorazowe, bezpudrowe	Ogólny dostawca laboratoryjny	Ogólne przeznaczenie.
Zestaw odczynników NextSeq 1000/2000 P2 (v3)	Illumina: nr katalogowy: 20046811 (100 cykli) nr katalogowy: 20046812 (200 cykli) nr katalogowy: 20046813 (300 cykli)	Zawiera kasetę odczynników, komorę przepływową oraz bufor do ponownego zawieszania NextSeq 1000/2000 RSB z roztworem Tween 20 do pojedynczego przebiegu. Zgodny z systemami NextSeq 1000 i NextSeq 2000.
Zestaw odczynników NextSeq 2000 P3	Illumina: nr katalogowy: 20046810 (50 cykli) nr katalogowy: 20040559 (100 cykli) nr katalogowy: 20040560 (200 cykli) nr katalogowy: 20040561 (300 cykli)	Zawiera kasetę odczynników, komorę przepływową oraz bufor do ponownego zawieszania NextSeq 1000/2000 RSB z roztworem Tween 20 do pojedynczego przebiegu. Kompatybilny wyłącznie z sekwenatorem NextSeq 2000.

Materiał eksploatacyjny	Dostawca	Cel
Mikroprobówki, 1,5 ml	Fisher Scientific, nr kat. 14-222-158 lub równoważne probówki o zmniejszonym przyleganiu próbki do powierzchni	Rozcieńczanie bibliotek do stężenia ładowania.
Końcówki do pipety, 10 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny	Rozcieńczanie bibliotek.
Końcówki do pipety, 20 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny	Rozcieńczanie i ładowanie bibliotek.
Końcówki do pipety, 200 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny	Rozcieńczanie bibliotek.
Końcówki do pipety, 1000 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny	Przebijanie folii zbiorniczka na bibliotekę.
[Opcjonalnie] PhiX Control v3	Illumina, nr kat. FC-110-3001	Wykonywanie przebiegów tylko z biblioteką PhiX lub roztworem specjalnym PhiX.
[Opcjonalnie] Ręczniki papierowe	Ogólny dostawca laboratoryjny	Suszenie kasety po kąpieli wodnej.

Materiały eksploatacyjne do konserwacji

Tabela 4 Materiały eksploatacyjne do konserwacji

Materiał eksploatacyjny	Dostawca	Cel
Rękawice jednorazowe, bezpudrowe	Ogólny dostawca laboratoryjny	Ogólne przeznaczenie.
Wymienny filtr powietrza NextSeq 1000/2000*	Illumina, nr kat. 20029759	Wymiana filtra powietrza co 6 miesięcy.

* Aparat jest dostarczany z jednym zainstalowanym i jednym zapasowym. W przypadkach nieobjętych gwarancją części zamienne są dostarczane przez użytkownika. Przechowywać w opakowaniu do momentu użycia.

Sprzęt pomocniczy

Należy zakupić następujące wyposażenie na potrzeby sekwencjonowania.

Element	Źródło	Cel
Zamrażarka, od -25°C do -15°C	Ogólny dostawca laboratoryjny	Przechowywanie kasety.
Pojemnik na lód	Ogólny dostawca laboratoryjny	Odkładanie bibliotek do momentu rozpoczęcia sekwencjonowania.
Pipeta, 10 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny	Rozcieńczanie bibliotek do stężenia ładowania.
Pipeta, 20 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny	Rozcieńczanie bibliotek do stężenia ładowania i ładowanie bibliotek do kasety.
Pipeta, 200 µl	Ogólny dostawca laboratoryjny	Rozcieńczanie bibliotek do stężenia ładowania.
Chłodziarka, od 2°C do 8°C	Ogólny dostawca laboratoryjny	Przechowywanie komory przepływowej lub rozmrażanie kasety.
[Opcjonalnie] Jedna z następujących łaźni wodnych o kontrolowanej temperaturze lub odpowiednik utrzymujący temperaturę 25°C:	<ul style="list-style-type: none"> • Thermo Fisher Scientific, nr katalogowy: TSCIR 35 • Shel Lab, nr katalogowy: SWBC22 	Rozmrażanie kasety.
<ul style="list-style-type: none"> • Thermo Scientific Precision 35L Circulating Water Bath (miejsce na 5 kasety jednocześnie) • SHEL LAB 22L Digital Circulating Water Bath (miejsce na 3 kasety jednocześnie) 		

Protokół

W niniejszej części podano instrukcje krok po kroku dotyczące przygotowywania materiałów eksploatacyjnych, rozcieńczania bibliotek i konfigurowania przebiegu sekwencjonowania w jednym z czterech trybów (w trybie Cloud (W chmurze), Hybrid (Hybrydowy) lub Local (Lokalny) z użyciem aplikacji DRAGEN lub platformy BaseSpace Sequence Hub albo w trybie Standalone (Autonomiczny), który jest przebiegiem autonomicznym przeznaczonym do generowania danych cBCL wyłącznie na potrzeby niestandardowych procedur analizy).

Podczas posługiwania się odczynnikami i innymi substancjami chemicznymi należy nosić okulary ochronne, fartuch laboratoryjny i rękawice bezpudrowe.

Przed rozpoczęciem protokołu należy się upewnić, że wymagane materiały eksploatacyjne i wyposażenie są na miejscu. Patrz: [Materiały eksploatacyjne i sprzęt na stronie 24](#).

Należy postępować zgodnie z protokołami w podanej kolejności, stosując podane objętości, temperatury i czasy trwania.

Zagadnienia dotyczące sekwencjonowania

Przed rozpoczęciem protokołu należy się zapoznać z poniższymi informacjami, aby przygotować się do rozcieńczania bibliotek i konfigurowania przebiegu. Osiągnięcie optymalnego stężenia ładowania jest szczególnie ważne dla pomyślnego sekwencjonowania i pomyślnej analizy. Wprowadzenie prawidłowej liczby cykli w odczycie pomaga zapewnić optymalne dane wyjściowe.

Objętość i stężenie ładowania

Objętość ładowania wynosi 20 µl. Stężenie ładowania waha się w zależności od typu biblioteki:

Typ biblioteki	Stężenie ładowania (pM)
AmpliSeq™ for Illumina Library PLUS	750
Illumina DNA Prep	750
Illumina DNA Prep z Enrichment	1000
Illumina Stranded Total RNA z Ribo-Zero Plus	750
Illumina Stranded mRNA Prep	750
Illumina DNA PCR-Free	1000
100 % PhiX	650
TruSeq DNA Nano 350	1200

Typ biblioteki	Stężenie ładowania (pM)
TruSeq DNA Nano 550	1500
TruSeq Stranded mRNA	1000

W przypadku innych rodzajów bibliotek zalecane początkowe stężenie ładowania wynosi 650 pM. To stężenie należy zoptymalizować podczas kolejnych przebiegów w celu określenia stężenia ładowania, które umożliwi powtarzalne uzyskiwanie danych spełniających wymagania specyfikacji.

i | W celu zoptymalizowania stężenia ładowania należy użyć parametru % Loading Concentration (Stężenie ładowania %) w pliku wyjściowym `PrimaryAnalysisMetrics.csv` dostępnym po zakończeniu przebiegu. Jeśli procentowe stężenie ładowania wynosi <95%, należy je zwiększać w ciągu kolejnych przebiegów z krokiem co 100 pM.

Liczba cykli w odczycie

Wprowadzenie liczby cykli z przedziału od 26 (minimum) do 151 (maksimum) dla każdego odczytu pomaga w utrzymaniu jakości danych. Dokładna liczba cykli zależy od badania. Oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 wymaga co najmniej 1 cyklu dla odczytu Read 1 (Odczyt 1), ale wyświetla ostrzeżenie, gdy liczba cykli w odczycie 1 jest mniejsza niż 26.

Łączna liczba cykli dla odczytu Read 1 (Odczyt 1), indeksu Index 1 (Indeks 1), indeksu Index 2 (Indeks 2) oraz odczytu Read 2 (Odczyt 2) nie może być większa niż liczba cykli obsługiwanych przez zestaw plus 38 cykli w przypadku zestawów 100-cyklowego i 200-cyklowego, a 27 cykli w przypadku zestawów P3 300-cyklowych. Oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 wyświetla ostrzeżenie, gdy indeks Index 1 (Indeks 1) i indeks Index 2 (Indeks 2) mają przypisane wartości poniżej 6 cykli. To ostrzeżenie nie zostanie wyświetlone, gdy dla indeksu Index 1 (Indeks 1) lub Index 2 (Indeks 2) zostanie wybrana wartość 0 cykli.

Minimalna i maksymalna liczba cykli uwzględniają dodatkowy cykl. Do żądanej długości odczytu należy zawsze dodać jeden cykl w celu skorygowania efektów fazowania i fazowania wyprzedzającego. Długość odczytu to liczba cykli **sekwencjonowania** w odczycie 1 i odczycie 2, co nie obejmuje cykli dodatkowych ani cykli indeksowania. Więcej informacji o korekcie fazowania zawiera część [Oprogramowanie Real-Time Analysis – procedura na stronie 61](#).

Przykładowa konfiguracja przebiegu:

- W przypadku długości odczytu 35 (odczyt pojedynczy) należy wprowadzić wartość **36** w polu Read 1 (Odczyt 1).
- W przypadku długości odczytu 150 na odczyt (sekwencjonowanie w trybie sparowanych końców) wprowadzić wartość **151** w polu Read 1 (Odczyt 1) oraz wartość **151** w polu Read 2 (Odczyt 2).

Planowanie sekwencjonowania na platformie BaseSpace Sequence Hub

Za pomocą narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie) na platformie BaseSpace Sequence Hub można tworzyć i konfigurować ustawienia przebiegu. Jeśli przebieg jest konfigurowany w trybie w chmurze lub hybrydowym, na karcie Planned Runs (Zaplanowane przebiegi) należy wczytać konfigurację tego przebiegu do listy zaplanowanych przebiegów na koncie na platformie BaseSpace Sequence Hub. Przebiegi dostępne do sekwencjonowania na sekwenatorach NextSeq 1000 i NextSeq 2000 są wyświetlane na karcie Planned Runs (Zaplanowane przebiegi). W przypadku konfigurowania przebiegu w trybie lokalnym należy użyć narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie), aby utworzyć i wyeksportować arkusz próbek w pliku o formacie v2. Można również zapoznać się z częścią [Ustawienia arkusza próbek v2 na stronie 92](#), aby utworzyć arkusz próbek bez platformy BaseSpace Sequence Hub, korzystając z udostępnionego szablonu. Narzędzie Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie) na platformie BaseSpace Sequence Hub nie obsługuje więcej niż 1536 próbek.


Konfigurowanie przebiegu

1. Przejść do platformy BaseSpace Sequence Hub.
2. Wprowadzić swój adres e-mail oraz hasło dostępu do platformy BaseSpace Sequence Hub, a następnie wybrać opcję **Sign In** (Zaloguj).
3. Wybrać kartę **Runs** (Przebiegi), a następnie wybrać listę rozwijaną **New Run** (Nowy przebieg).
4. Wybrać opcję **NextSeq 1000/2000**.
5. W polu Run Name (Nazwa przebiegu) wprowadzić unikatową nazwę zgodnie z preferencjami w celu zidentyfikowania bieżącego przebiegu.
Nazwa przebiegu może zawierać maksymalnie 225 znaków alfanumerycznych, spacji, kresek i znaków podkreślenia.
6. Wybrać jedną z następujących lokalizacji analizy.
 - **BaseSpace** – dane sekwencjonowania są analizowane w chmurze.
 - **Local** (Lokalnie) – dane sekwencjonowania są analizowane w aparacie lub generowany jest arkusz próbek v2 dla trybu lokalnego albo hybrydowego.
7. Wybrać typ i wersję analizy.
Więcej informacji o analizach wtórnych zawiera część [Pliki wyjściowe analizy wtórnej DRAGEN na stronie 66](#) oraz dokumentacja aplikacji platformy BaseSpace Sequence Hub. Jeśli wybrano analizę DRAGEN Single Cell RNA, należy się zapoznać ze stroną Products Files (Pliki produktu) dotyczącą systemu NextSeq 1000/2000, która zawiera informacje na temat zgodności zestawów innych firm do przygotowania biblioteki RNA z pojedynczych komórek.

i | W przypadku analizy w aparacie wybrana wersja musi być zgodna z wersją oprogramowania DRAGEN zainstalowaną w aparacie. Aby sprawdzić wersję oprogramowania DRAGEN zainstalowaną w aparacie, należy się zapoznać z częścią [Aktualizacje procedur i licencji DRAGEN na stronie 82](#).

8. **[Opcjonalnie]** Skonfigurować niestandardowe zestawy do indeksowania w sposób opisany poniżej. W przypadku używania więcej niż jednej biblioteki używane biblioteki muszą mieć takie same długości odczytu indeksu.
 - a. Na liście rozwijanej Index Adapter Kit (Zestaw adaptera indeksu) wybrać opcję **Add Custom Index Adapter Kit** (Dodaj niestandardowy zestaw adaptera indeksu).
 - b. Wybrać typ szablonu, a następnie wprowadzić nazwę zestawu, sekwencje adaptera, strategię indeksowania oraz sekwencje indeksu.
Upewnić się, że sekwencje adaptera drugiego indeksowania (i5) mają orientację do przodu.
 - c. Wybrać opcję **Create New Kit** (Utwórz nowy zestaw).
9. **[Opcjonalnie]** Skonfigurować zestawy do przygotowania biblioteki niestandardowej w sposób opisany poniżej.
 - a. Na liście rozwijanej Library Prep Kit (Zestaw do przygotowania biblioteki) wybrać opcję **Add Custom Library Prep Kit** (Dodaj zestaw do przygotowania biblioteki niestandardowej).
 - b. Wprowadzić nazwę, typy odczytów, domyślne cykle odczytów oraz zgodne zestawy adaptera indeksu na potrzeby zestawu do przygotowania biblioteki niestandardowej.
 - c. Wybrać opcję **Create New Kit** (Utwórz nowy zestaw).
10. Wybrać następujące ustawienia aparatu. W zależności od zestawu do przygotowania biblioteki zalecane opcje są wybierane automatycznie. Niektóre zestawy do przygotowania biblioteki mają ustalone liczby odczytów indeksów oraz typy indeksów, których nie można zmienić.
 - Zestaw do przygotowania biblioteki
 - Zestaw adaptera indeksu
 - Liczba odczytów indeksu
 - Typ odczytu
 - Liczba cykli sekwencjonowania na odczyt

i | Jeśli dla zestawu do przygotowania biblioteki wybrano opcję Not Specified (Nie określono), wówczas liczba odczytów indeksu nie jest aktualizowana do czasu wprowadzenia sekwencji indeksu do sekcji Sample Data (Dane próbek).
11. Wprowadzić informacje o próbkach do arkusza Sample Data (Dane próbek), korzystając z jednej z poniższych opcji. W celu pogrupowania próbek na potrzeby agregacji danych podczas dalszej analizy należy przypisać nazwę grupie w kolumnie Project (Projekt).
 - Wybrać opcję **Import Data** (Importuj dane), a następnie wybrać arkusz próbek. Należy się upewnić, że arkusz próbek spełnia wymagania dotyczące formatowania. Patrz: [Ustawienia arkusza próbek v2 na stronie 92](#). Zmodyfikowanie arkusza próbek po jego początkowym pobraniu może spowodować niepowodzenie analizy.

- Wkleić identyfikatory próbek oraz pozycje dołków z płytki indeksowania albo indeksy i7 i i5 bezpośrednio z pliku zewnętrznego. Przed wklejeniem wprowadzić liczbę wierszy próbek do pola Rows (Wiersze), a następnie wybrać +. Identyfikatory próbek mogą zawierać maksymalnie 20 znaków alfanumerycznych, łączników i znaków podkreślenia.
 -  Płytki indeksowania o stałym układzie wymagają wpisów dotyczących pozycji dołków. Indeksy, które nie mają ustalonego układu, wymagają indeksów i7 i i5. Indeksy i5 muszą być wprowadzane w orientacji do przodu.
- Ręcznie wprowadzić identyfikatory próbek i powiązane pozycje dołków lub indeksy. Jeśli dla opcji zestawu do przygotowania biblioteki wybrano wartość Not Specified (Nie określono), wówczas należy wprowadzić sekwencje indeksu 2 (i5) w orientacji do przodu.

12. Wybrać opcję **Next** (Dalej).

Konfigurowanie analizy wtórnej

Należy skonfigurować ustawienia dla typu analizy wybranej do przebiegu. Więcej informacji o procedurach analizy DRAGEN zawiera część [Pliki wyjściowe analizy wtórnej DRAGEN na stronie 66](#).

Illumina DRAGEN BCL Convert

W celu skonfigurowania analizy Illumina DRAGEN BCL Convert należy wykonać poniższe czynności.

- Wprowadzić następujące ustawienia opcjonalne.

Ustawienie	Opis
AdapterRead1	Sekwencja adaptera dla odczytu 1. Jeśli używany jest zestaw do przygotowania bibliotek firmy Illumina, pole AdapterRead1 należy zostawić puste.
AdapterRead2	Sekwencja adaptera dla odczytu 2. Jeśli używany jest zestaw do przygotowania bibliotek firmy Illumina, pole AdapterRead2 należy zostawić puste.
BarcodeMismatchesIndex1	Liczba dozwolonych niedopasowań między pierwszym odczytem indeksu a sekwencją indeksu. Wartością domyślną jest 1. Jeśli kod kreskowy wskazuje 6 bp, wówczas zalecaną wartością jest 0.
BarcodeMismatchesIndex2	Liczba dozwolonych niedopasowań między drugim odczytem indeksu a sekwencją indeksu. Wartością domyślną jest 1. Jeśli kod kreskowy wskazuje 6 bp, wówczas zalecaną wartością jest 0.

Ustawienie	Opis
OverrideCycles	<p>Ciąg używany do określania cykli UMI i cykli maskowania w ramach odczytu. Dozwolone są następujące wartości:</p> <ul style="list-style-type: none"> • N – określa cykle do zignorowania. • Y – określa cykle sekwencjonowania. • I – określa cykle indeksowania. • U – określa cykle UMI do przycięcia. <p>Poszczególne elementy są oddzielone średnikami. Poniżej przedstawiono przykładowe dane wejściowe dla pola OverrideCycles.</p> <pre>U8Y143;I8;I8;U8Y143 N10Y66;I6;N10Y66</pre>

- Wybrać, czy zostanie zapisana kopia plików FASTQ. Pliki FASTQ są generowane wyłącznie wówczas, jeśli wybrano opcję zachowania plików FASTQ.
- Wybrać jedną z poniższych opcji formatu wyjściowego FASTQ:
 - **gzip** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie gzip.
 - **DRAGEN** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie ora.
- Zakończyć konfigurację przebiegu.
 - Aby wysłać konfigurację przebiegu do konta na platformie BaseSpace Sequence Hub, wybrać opcję **Submit Run** (Prześlij przebieg). Przebiegi przesłane do platformy BaseSpace Sequence Hub pojawią się na liście zaplanowanych przebiegów i będą dostępne dla systemów używających trybu w chmurze lub hybrydowego.
 - Aby zapisać konfigurację przebiegu jako arkusz próbek w formacie pliku v2, wybrać opcję **Export Sample Sheet** (Eksportuj arkusz próbek) z listy rozwijanej **Submit Run** (Prześlij przebieg). W celu zainicjowania przebiegów w systemach z użyciem trybu lokalnego wymagany jest arkusz próbek. Ta opcja jest dostępna wyłącznie wówczas, gdy jako lokalizację analizy wybrano opcję Local (Tryb lokalny).

Illumina DRAGEN Enrichment

W celu skonfigurowania analizy Illumina DRAGEN Enrichment należy wykonać poniższe czynności.

- Wybrać genom referencyjny.
Jeśli to możliwe, użyć genomu referencyjnego z mapowaniem alt aware.
- Wybrać plik *.bed zawierający przewidywane regiony docelowe albo wczytać nowy plik niestandardowy.
Upewnić się, że genom referencyjny pliku BED pasuje do genomu referencyjnego wybranego w kroku 1. W przypadku nowego niestandardowego pliku BED użyć następującego formatu nazewnictwa: nazwa_panelu_numer_wersji.referencegenome.bed.

- **Local mode** (Tryb lokalny) – wybrać opcję **Select Custom File (Local)** (Wybierz plik niestandardowy (lokalny)), aby przesłać plik dla pojedynczego przebiegu, albo opcję **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prześlij plik niestandardowy (BaseSpace)) w celu użycia wielokrotnego.
 - **Cloud mode / Hybrid mode** (Tryb w chmurze / Tryb hybrydowy) – wybrać opcję **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prześlij plik niestandardowy (BaseSpace)). Niestandardowy plik BED jest dostępny wyłącznie w tej grupie roboczej, do której został przesłany.
3. Wybrać algorytm rozpoznawania wariantów w linii zarodkowej lub w linii somatycznej.
 4. **[Opcjonalnie]** Jeśli używany jest algorytm do rozpoznawania wariantów w linii somatycznej, wybrać plik szumu bazowego. Więcej informacji zawiera część [Importowanie plików szumu bazowego na stronie 19](#).
 5. Wybrać format wyjściowy mapy/dopasowania.
 6. Wybrać, czy zostanie zapisana kopia plików FASTQ. Pliki FASTQ są generowane wyłącznie wówczas, jeśli wybrano opcję zachowania plików FASTQ.
 7. Wybrać jedną z poniższych opcji formatu wyjściowego FASTQ:
 - **gzip** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie gzip.
 - **DRAGEN** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie ora.
 8. Zakończyć konfigurację przebiegu.
 - Aby wysłać konfigurację przebiegu do konta na platformie BaseSpace Sequence Hub, wybrać opcję **Submit Run** (Prześlij przebieg). Przebiegi przesłane do platformy BaseSpace Sequence Hub pojawią się na liście zaplanowanych przebiegów i będą dostępne dla systemów używających trybu w chmurze lub hybrydowego.
 - Aby zapisać konfigurację przebiegu jako arkusz próbek w formacie pliku v2, wybrać opcję **Export Sample Sheet** (Eksportuj arkusz próbek) z listy rozwijanej **Submit Run** (Prześlij przebieg). Arkusz próbek i pliki pomocnicze analizy wtórnej zostaną pobrane w folderze *.zip i będą wymagane do zainicjowania przebiegów w systemach używających trybu lokalnego. Ta opcja jest dostępna wyłącznie wówczas, gdy jako lokalizację analizy wybrano opcję Local (Tryb lokalny).

Illumina DRAGEN Germline

W celu skonfigurowania analizy Illumina DRAGEN Germline należy wykonać poniższe czynności.

1. Wybrać genom referencyjny.
Jeśli to możliwe, użyć genomu referencyjnego z mapowaniem alt aware.
2. Wybrać format wyjściowy mapy/dopasowania.
3. Wybrać, czy zostanie zapisana kopia plików FASTQ. Pliki FASTQ są generowane wyłącznie wówczas, jeśli wybrano opcję zachowania plików FASTQ.

4. Wybrać jedną z poniższych opcji formatu wyjściowego FASTQ:
 - **gzip** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie gzip.
 - **DRAGEN** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie ora.
5. Zakończyć konfigurację przebiegu.
 - Aby wysłać konfigurację przebiegu do konta na platformie BaseSpace Sequence Hub, wybrać opcję **Submit Run** (Prześlij przebieg). Przebiegi przesłane do platformy BaseSpace Sequence Hub pojawią się na liście zaplanowanych przebiegów i będą dostępne dla systemów używających trybu w chmurze lub hybrydowego.
 - Aby zapisać konfigurację przebiegu jako arkusz próbek w formacie pliku v2, wybrać opcję **Export Sample Sheet** (Eksportuj arkusz próbek) z listy rozwijanej **Submit Run** (Prześlij przebieg). Arkusz próbek i pliki pomocnicze analizy wtórnej zostaną pobrane w folderze *.zip i będą wymagane do zainicjowania przebiegów w systemach używających trybu lokalnego. Ta opcja jest dostępna wyłącznie wówczas, gdy jako lokalizację analizy wybrano opcję Local (Tryb lokalny).

Illumina DRAGEN RNA

W celu skonfigurowania analizy Illumina DRAGEN RNA należy wykonać poniższe czynności.

1. Wybrać genom referencyjny.
Jeśli to możliwe, użyć genomu referencyjnego bez mapowania alt aware.
2. Wybrać format wyjściowy mapy/dopasowania.
3. Wybrać, czy zostanie zapisana kopia plików FASTQ. Pliki FASTQ są generowane wyłącznie wówczas, jeśli wybrano opcję zachowania plików FASTQ.
4. Wybrać jedną z poniższych opcji formatu wyjściowego FASTQ:
 - **gzip** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie gzip.
 - **DRAGEN** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie ora.
5. **[Opcjonalnie]** Przesłać plik adnotacji RNA w formacie Gene Transfer Format (GTF).
 - **Local mode** (Tryb lokalny) – wybrać opcję **Select Custom File (Local)** (Wybierz plik niestandardowy (lokalny)), aby przesłać plik dla pojedynczego przebiegu, albo opcję **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prześlij plik niestandardowy (BaseSpace)) w celu użycia wielokrotnego.
 - **Cloud mode / Hybrid mode** (Tryb w chmurze / Tryb hybrydowy) – wybrać opcję **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prześlij plik niestandardowy (BaseSpace)). Plik GTF jest dostępny wyłącznie w tej grupie roboczej, do której został przesłany.

Po przesłaniu pliku GTF do grupy roboczej platformy BaseSpace Sequence Hub należy wybrać plik adnotacji RNA z menu rozwijanego.
6. Wybrać, czy ma zostać włączona ekspresja różnicowa.

7. Jeśli ekspresja różnicowa zostanie włączona, wybrać wartość kontrolną lub porównawczą dla każdej próbki.

W każdej grupie porównawczej dowolna próbka oznaczona jako kontrola jest porównywana ze wszystkimi próbkami oznaczonymi jako porównawcze. Jeśli taka próbka nie zawiera wartości kontrolnej ani porównawczej, jako wartość należy wybrać **na** (nd.).

8. Zakończyć konfigurację przebiegu.
 - Aby wysłać konfigurację przebiegu do konta na platformie BaseSpace Sequence Hub, wybrać opcję **Submit Run** (Prześlij przebieg). Przebiegi przesłane do platformy BaseSpace Sequence Hub pojawią się na liście zaplanowanych przebiegów i będą dostępne dla systemów używających trybu w chmurze lub hybrydowego.
 - Aby zapisać konfigurację przebiegu jako arkusz próbek w formacie pliku v2, wybrać opcję **Export Sample Sheet** (Eksportuj arkusz próbek) z listy rozwijanej **Submit Run** (Prześlij przebieg). Arkusz próbek i pliki pomocnicze analizy wtórnej zostaną pobrane w folderze *.zip (jeśli udostępniono opcjonalny plik GTF) i będą wymagane do zainicjowania przebiegów w systemach używających trybu lokalnego. Ta opcja jest dostępna wyłącznie wówczas, gdy jako lokalizację analizy wybrano opcję Local (Tryb lokalny).

ILLUMINA DRAGEN SINGLE CELL RNA

W celu skonfigurowania analizy Illumina DRAGEN Single Cell RNA należy wykonać poniższe czynności.

1. Wybrać genom referencyjny.
Jeśli to możliwe, użyć genomu referencyjnego bez mapowania alt aware.
2. **[Opcjonalnie]** Przesłać plik adnotacji RNA w formacie Gene Transfer Format (GTF).
 - **Local mode** (Tryb lokalny) – wybrać opcję **Select Custom File (Local)** (Wybierz plik niestandardowy (lokalny)), aby przesłać plik dla pojedynczego przebiegu, albo opcję **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prześlij plik niestandardowy (BaseSpace)) w celu użycia wielokrotnego.
 - **Cloud mode / Hybrid mode** (Tryb w chmurze / Tryb hybrydowy) – wybrać opcję **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prześlij plik niestandardowy (BaseSpace)). Plik GTF jest dostępny wyłącznie w tej grupie roboczej, do której został przesłany.

Po przesłaniu pliku GTF do grupy roboczej platformy BaseSpace Sequence Hub należy wybrać plik adnotacji RNA z menu rozwijanego.
3. Wybrać format wyjściowy mapy/dopasowania.
4. Wybrać, czy zostanie zapisana kopia plików FASTQ. Pliki FASTQ są generowane wyłącznie wówczas, jeśli wybrano opcję zachowania plików FASTQ.
5. Wybrać jedną z poniższych opcji formatu wyjściowego FASTQ:
 - **gzip** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie gzip.
 - **DRAGEN** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie ora.

6. Wybrać konfigurację identyczną z konfiguracją typu zestawu do przygotowania biblioteki.
Jeśli jako zestaw do przygotowania biblioteki wybrano na przykład zestaw Single Cell RNA Library Kit 1, należy wybrać wartość Type 1 (Typ 1) dla opcji Configuration Type (Typ konfiguracji).
7. Wybrać odczyt kodu kreskowego.
8. **[Opcjonalnie]** Dokonać edycji liczby nukleotydów w kodach kreskowych oraz w UMI. Te wartości są wypełniane automatycznie na podstawie zestawu do przygotowania biblioteki oraz wybranego typu konfiguracji.
9. Wybrać orientację nici.
10. **[Opcjonalnie]** Wybrać plik zawierający sekwencje kodu kreskowego lub wczytać nowy plik niestandardowy.
11. Jeśli używany jest typ konfiguracji Advanced (Zaawansowany) / Custom (Niestandardowy), wprowadzić wartości dla liczby cykli zastąpień, pozycji kodu kreskowego oraz pozycji UMI.
12. Zakończyć konfigurację przebiegu.
 - Aby wysłać konfigurację przebiegu do konta na platformie BaseSpace Sequence Hub, wybrać opcję **Submit Run** (Prześlij przebieg). Przebiegi przesłane do platformy BaseSpace Sequence Hub pojawią się na liście zaplanowanych przebiegów i będą dostępne dla systemów używających trybu w chmurze lub hybrydowego.
 - Aby zapisać konfigurację przebiegu jako arkusz próbek w formacie pliku v2, wybrać opcję **Export Sample Sheet** (Eksportuj arkusz próbek) z listy rozwijanej **Submit Run** (Prześlij przebieg). Arkusz próbek i pliki pomocnicze analizy wtórnej zostaną pobrane w folderze *.zip (jeśli udostępniono opcjonalny plik GTF) i będą wymagane do zainicjowania przebiegów w systemach używających trybu lokalnego. Ta opcja jest dostępna wyłącznie wówczas, gdy jako lokalizację analizy wybrano opcję Local (Tryb lokalny).

Illumina DRAGEN Amplicon

W celu skonfigurowania analizy Illumina DRAGEN Amplicon należy wykonać poniższe czynności.

1. Wybrać genom referencyjny.
2. Wybrać plik *.bed zawierający przewidywane regiony docelowe albo wczytać nowy plik niestandardowy.

Upewnić się, że genom referencyjny pliku BED pasuje do genomu referencyjnego wybranego w kroku 1. W przypadku nowego niestandardowego pliku BED użyć następującego formatu nazewnictwa: nazwa_panelu_numer_wersji.referencegenome.bed.

- **Cloud mode / Hybrid mode** (Tryb w chmurze / Tryb hybrydowy) – wybrać opcję **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prześlij plik niestandardowy (BaseSpace)). Niestandardowy plik BED jest dostępny wyłącznie w tej grupie roboczej, do której został przesłany.

- **Local mode** (Tryb lokalny) – wybrać opcję **Select Custom File (Local)** (Wybierz plik niestandardowy (lokalny)), aby przesłać plik dla pojedynczego przebiegu, albo opcję **Upload Custom File (BaseSpace)** (Prześlij plik niestandardowy (BaseSpace)) w celu użycia wielokrotnego.
3. Wybrać algorytm rozpoznawania wariantów w linii zarodkowej lub w linii somatycznej.
 4. Wybrać format wyjściowy mapy/dopasowania.
 5. **[W przypadku trybu lokalnego]** Wybrać, czy zostanie zapisana kopia plików FASTQ. Pliki FASTQ są generowane wyłącznie wówczas, jeśli wybrano opcję zachowania plików FASTQ.
 6. Wybrać, czy zostanie zapisana kopia plików FASTQ. Pliki FASTQ są generowane wyłącznie wówczas, jeśli wybrano opcję zachowania plików FASTQ.
 7. Wybrać jedną z poniższych opcji formatu wyjściowego FASTQ:
 - **gzip** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie gzip.
 - **DRAGEN** – pliki FASTQ są zapisywane w formacie ora.
 8. Zakończyć konfigurację przebiegu.
 - Aby wysłać konfigurację przebiegu do konta na platformie BaseSpace Sequence Hub, wybrać opcję **Submit Run** (Prześlij przebieg). Przebiegi przesłane do platformy BaseSpace Sequence Hub pojawią się na liście zaplanowanych przebiegów i będą dostępne dla systemów używających trybu w chmurze lub hybrydowego.
 - **[W przypadku trybu lokalnego]** Aby zapisać konfigurację przebiegu jako arkusz próbek w formacie pliku v2, wybrać opcję **Export Sample Sheet** (Eksportuj arkusz próbek) z listy rozwijanej **Submit Run** (Prześlij przebieg). Arkusz próbek i pliki pomocnicze analizy wtórnej zostaną pobrane w folderze *.zip i będą wymagane do zainicjowania przebiegów w systemach używających trybu lokalnego. Ta opcja jest dostępna wyłącznie wówczas, gdy jako lokalizację analizy wybrano opcję Local (Tryb lokalny).

Rozmrażanie zapakowanej w torebkę kasety i komory przepływowej

Ten etap dotyczy rozmrażania kasety w *nieotwartej torebce* i przygotowania komory przepływowej. Kasetę zapakowaną w torebkę należy rozmrozić, stosując jedną z trzech metod: kontrolowana łaźnia wodna, lodówka lub powietrze o temperaturze pokojowej. Kasety należy użyć natychmiast po rozmrożeniu bez ponownego zamrażania. Jeśli kasety nie można użyć bezpośrednio po rozmrożeniu, zapoznać się z częścią [Ponowne umieszczanie materiałów eksploatacyjnych w miejscu przechowywania na stronie 87](#).

Rysunek 4 Kasetę zapakowaną w torebkę




Rozmrażanie kasety w kontrolowanej łaźni wodnej


1. Założyć nową parę rękawic bezpudrowych i wyjąć kasetę z miejsca przechowywania.
 2. Wyjąć kasetę z pudełka, ale *nie otwierać srebrnej torebki foliowej*.
- ! Rozmrażanie rozerwanej lub przebitej torebki w łaźni wodnej może spowodować niepowodzenie sekwencjonowania. Zamiast tego należy rozmrażać w temperaturze pokojowej lub w lodówce.
3. Rozmrażać kasetę zapakowaną w torebkę w łaźni wodnej o kontrolowanej temperaturze 25°C przez 6 godzin:
 - Utrzymywać głębokość wody co najmniej 9,5–10 cm niezależnie od ilości rozmrażanych kaset.
 - Ustawić temperaturę łaźni wodnej na 25°C.
 - Etykieta torebki skierować do góry w łaźni wodnej i nie zanurzać jej.
- ! Nie podejmować prób dociążenia kasety w celu jej zanurzenia. Jeśli etykieta torebki nie jest skierowana w górę lub kaset obróci się podczas rozmrażania, wpłynie to negatywnie na dane sekwencjonowania.
- Nie przekraczać czasu 8 godzin w łaźni wodnej.
 - Jednocześnie nie rozmrażać więcej kaset niż ilość, jaką można zmieścić w łaźni wodnej. Informacje o zgodnych akcesoriach łaźni wodnej zawiera część [Sprzęt pomocniczy na stronie 30](#).
 - Nie układać kaset w stos.
4. Wyjąć kasetę z łaźni wodnej i osuszyć za pomocą ręczników papierowych.

Rozmrażanie kasety w lodówce

1. Założyć nowe rękawice bezpudrowe.
2. Na dzień przed przewidywanym przebiegiem wyjąć kasetę z miejsca przechowywania w temperaturze od -25°C do -15°C .
3. Wyjąć kasetę z pudełka, ale *nie otwierać srebrnej torebki foliowej*.
4. Ustawić kasetę w temperaturze pokojowej w taki sposób, aby etykieta była skierowana do góry, a powietrze mogło owiewać boki i wierzch kasety.

 Jeśli etykieta torebki nie jest skierowana do góry, wpłynie to niekorzystanie na dane sekwencjonowania.


5. Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 6 godzin.
6. Ustawić kasetę w lodówce w temperaturze od 2°C do 8°C w taki sposób, aby etykieta była skierowana do góry, a powietrze mogło owiewać boki kasety.

 Jeśli etykieta torebki nie jest skierowana do góry, wpłynie to niekorzystanie na dane sekwencjonowania.

7. Rozmrażać w lodówce przez 12 godzin. Nie przekraczać 72 godzin.

Rozmrażanie kasety w temperaturze pokojowej

1. Założyć nowe rękawice bezpudrowe.
2. Wyjąć kasetę z miejsca przechowywania w temperaturze od -25°C do -15°C .
3. Wyjąć kasetę z pudełka, ale *nie otwierać srebrnej torebki foliowej*.
4. Ustawić kasetę w taki sposób, aby etykieta była skierowana do góry, a powietrze mogło owiewać boki i wierzch kasety.

 Jeśli etykieta torebki nie jest skierowana do góry, wpłynie to niekorzystanie na dane sekwencjonowania.

5. Rozmrażać w temperaturze pokojowej przez 9 godzin. Nie przekraczać 16 godzin.

Przygotowanie komory przepływowej i kasety

1. Przygotować komorę przepływową zgodnie z poniższą instrukcją.
 - a. Wyjąć nową komorę przepływową z miejsca przechowywania w temperaturze od 2°C do 8°C .
 - b. Odłożyć nieotwarte opakowanie na 10–15 minut w miejsce o temperaturze pokojowej, aby zapobiec skraplaniu, gdy komora przepływowa będzie wyjmowana z opakowania. Przygotowanie komory przepływowej po tym okresie oczekiwania zapewnia, że osiągnie ona temperaturę pokojową we właściwym czasie.

2. W przypadku stosowania metody rozmrażania w lodówce:
 - a. Wyjąć rozmrożoną kasetę z miejsca przechowywania w temperaturze od 2°C do 8°C.
 - b. Odłożyć kasetę w nieotwartym opakowaniu w miejsce o temperaturze pokojowej na co najmniej 15 minut przed sekwencjonowaniem. Nie przekraczać 1 godziny.

Rozcieńczanie bibliotek

Gdy stosowana jest denaturacja i rozcieńczanie w aparacie, ten krok polega na rozcieńczeniu bibliotek do odpowiedniego stężenia ładowania. Opcjonalna 2% domieszka kontroli PhiX¹ umożliwia uzyskanie dodatkowych pomiarów, zróżnicowanie nukleotydów albo kontrolę dodatnią. W przypadku bibliotek o niższym zróżnicowaniu nukleotydów należy zwiększać odsetek domieszki kontroli PhiX.

W przypadku ręcznego denaturowania i rozcieńczania bibliotek należy korzystać z *Przewodnika dotyczącego denaturacji i rozcieńczania w sekwenatorach NextSeq 1000 i 2000 (nr dokumentu: 1000000139235)*. Ten etap ma zastosowanie wyłącznie w przypadku denaturowania i rozcieńczania w aparacie.

Rozcieńczanie biblioteki do stężenia 2 nM

1. [Opcjonalnie] Wyjąć zapas 10 nM kontroli PhiX z miejsca przechowywania w temperaturze od -25°C do -15°C.
Kontrola PhiX jest wymagana wyłącznie jako opcjonalna domieszka lub podczas przebiegu tylko z biblioteką PhiX.
2. [Opcjonalnie] Rozmrażać kontrolę PhiX w temperaturze pokojowej przez 5 minut, a następnie przeprowadzić kwantyfikację przy użyciu metody opartej na fluorescencji, takiej jak Qubit, aby potwierdzić stężenie kontroli PhiX.
Jeśli kwantyfikacja jest niemożliwa, kontynuować, stosując stężenie 10 nM.
3. Krótco wymieszać bibliotekę lub kontrolę PhiX przez worteksowanie, a następnie wirować z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę.
4. Stosując bufor RSB z Tween 20 jako rozcieńczalnik, przygotować co najmniej 24 µl biblioteki o stężeniu 2 nM w mikroprobówce o zmniejszonym przyleganiu próbki do powierzchni.
Instrukcje dodawania domieszki kontroli PhiX zawiera część [Dodawanie kontroli PhiX \(opcjonalnie\) na stronie 46](#).
5. Krótco wymieszać przez worteksowanie, a następnie wirować z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę.

¹PhiX to niewielka, gotowa do użycia biblioteka firmy Illumina, zapewniająca zrównoważoną reprezentację nukleotydów.

Rozcieńczanie biblioteki 2 nM do stężenia ładowania

1. W celu przygotowania 24 μ l biblioteki rozcieńczonej do odpowiedniego stężenia ładowania połączyć w mikropróbówce o zmniejszonym przyleganiu próbki do powierzchni podane poniżej objętości:

Typ biblioteki*	Stężenie ładowania (pM)	Objętość biblioteki 2 nM (μ l)	Objętość bufora RSB z Tween 20 (μ l)
Ampliseq for Illumina Library PLUS	750	9	15
Illumina DNA Prep	750	9	15
Illumina DNA Prep z Enrichment	1000	12	12
Illumina Stranded Total RNA z 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

* W przypadku typów bibliotek spoza listy należy rozpocząć od stężenia ładowania 650 pM i optymalizować stężenie w ciągu kolejnych przebiegów.

W tej tabeli podano przykładowe stężenia ładowania. System NextSeq 1000/2000 jest kompatybilny ze wszystkimi zestawami firmy Illumina do przygotowywania biblioteki, ale optymalne stężenia ładowania mogą się różnić.

2. Krótко wymieszać przez worteksowanie, a następnie wirować z przyspieszeniem 280 \times g przez 1 minutę.
3. Odłożyć na lód rozcieńczoną bibliotekę do czasu, gdy wszystko będzie przygotowane do sekwencjonowania.

Biblioteki rozcieńczone do stężenia ładowania należy poddać sekwencjonowaniu tego samego dnia, w którym zostały rozcieńczone.

4. Wykonać poniższe czynności.

- W przypadku dodawania kontroli PhiX zapoznać się z częścią [Dodawanie kontroli PhiX \(opcjonalnie\) na stronie 46](#).
- Jeśli nie jest dodawana kontrola PhiX albo wykonywany jest przebieg tylko z biblioteką PhiX, należy się zapoznać z częścią [Ładowanie materiałów eksploatacyjnych do kasety na stronie 46](#).

Dodawanie kontroli PhiX (opcjonalnie)

1. Podane poniżej objętości połączyć w mikropróbówce o zmniejszonym przyleganiu próbki do powierzchni w celu przygotowania 20 µl kontroli PhiX o stężeniu 1 nM:
 - PhiX 10 nM (2 µl)
 - RSB z Tween 20 (18 µl)
2. Krótco wymieszać przez worteksowanie, a następnie wirować z przyspieszeniem 280 × g przez 1 minutę.
3. Dodać 1 µl kontroli PhiX o stężeniu 1 nM do 24 µl biblioteki rozcieńczonej do ostatecznego stężenia ładowania.
Dzięki tym objętościom uzyskuje się 2% domieszkę kontroli PhiX. Rzeczywisty odsetek kontroli różni się w zależności od jakości i ilości biblioteki.
4. Odłożyć na bok bibliotekę z domieszką kontroli PhiX do czasu, gdy wszystko będzie przygotowane do sekwencjonowania.
Sekwencjonowanie bibliotek z domieszką kontroli PhiX należy przeprowadzić tego samego dnia, gdy zostały rozcieńczone.

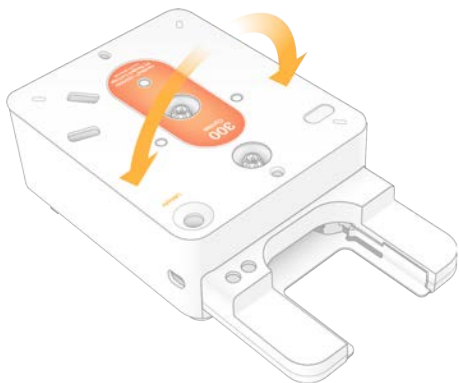
Ładowanie materiałów eksploatacyjnych do kasety

W ramach tego etapu kasety jest przygotowywana do sekwencjonowania przez zmieszanie odczynników, którymi jest wstępnie napełniona, oraz załadowanie rozcieńczonych bibliotek i komory przepływowej.

Przygotowanie kasety

1. Otworzyć torebkę kasety, rozdzierając ją lub przecinając nożyczkami od górnego karbu z dowolnej strony.
2. Wyjąć kasetę z torebki. Wyrzucić torebkę i środek osuszający.

3. Wymieszać odczynniki, odwracając kasetę 10 razy.
Podczas odwracania elementy wewnętrzne mogą grzechotać, co jest zjawiskiem normalnym.



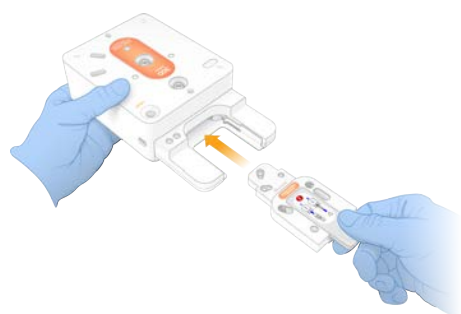
Ładowanie komory przepływowej

1. Otworzyć opakowanie ze srebrnej folii, rozdzielając je lub przecinając nożyczkami od górnego nacięcia w dowolną stronę.
Jeśli komory przepływowej nie można użyć od razu, zapoznać się z częścią [Ponowne umieszczenie materiałów eksploatacyjnych w miejscu przechowywania na stronie 87](#).
2. Wyjąć komorę przepływową z opakowania.
Odłożyć na bok opakowanie foliowe i środek osuszający na wypadek, gdyby konieczne było ponowne umieszczenie komory przepływowej w miejscu przechowywania. Środek osuszający znajduje się w woreczku na dnie opakowania foliowego. Te elementy należy wyrzucić, gdy rozpocznie się sekwencjonowanie.

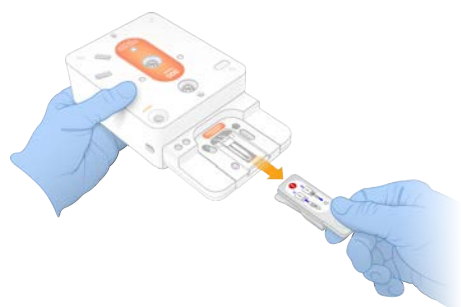


3. Przytrzymać komorę przepływową za szary uchwyt, kierując etykietę do góry.

4. Popchnąć, aby wprowadzić komorę przepływową do szczeliny z przodu kasety. Słyszalne kliknięcie wskazuje, że komora przepływowa znalazła się w położeniu docelowym. Po prawidłowym załadunku szary uchwyt wystaje z kasety.



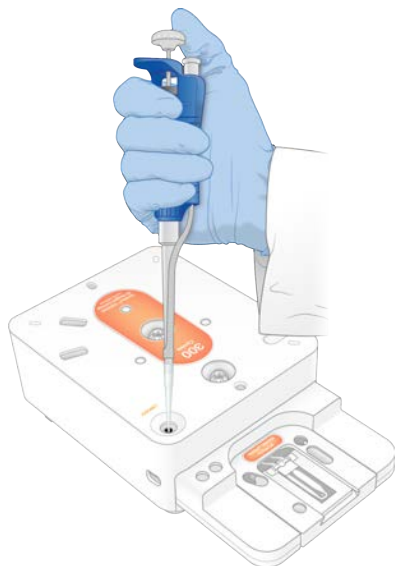
5. Pociągnąć do tyłu i wyjąć szary uchwyt, aby odsłonić komorę przepływową. Umieścić uchwyt w pojemniku do recyklingu.



Ładowanie bibliotek

1. Za pomocą nowej końcówki pipety P1000 przebić zbiornik na bibliotekę i odsunąć folię w kierunku krawędzi w celu powiększenia otworu.
2. Wyrzucić końcówkę pipety, aby zapobiec zanieczyszczeniu.


3. Nałożyć 20 µl rozcieńczonej biblioteki na **dno** zbiornika, powoli obniżając końcówkę pipety do dna zbiornika przed dozowaniem. Nie dotykać folii.




Inicjowanie sekwencjonowania

Ten etap powoduje zainicjowanie sekwencjonowania w jednym z czterech trybów:

- **Cloud mode** (Tryb w chmurze) – przebieg jest wybierany z listy planowanych przebiegów w oprogramowaniu sterującym NextSeq 1000/2000. Podczas sekwencjonowania dane cBCL są przesyłane do platformy BaseSpace Sequence Hub. Po sekwencjonowaniu następuje automatyczne uruchomienie rozwiązania DRAGEN na platformie BaseSpace Sequence Hub.
 - **Hybrid mode** (Tryb hybrydowy) – przebieg jest wybierany z listy planowanych przebiegów w oprogramowaniu sterującym NextSeq 1000/2000. Po sekwencjonowaniu analiza w aparacie rozpoczyna się automatycznie. Dane cBCL i pliki wyjściowe analizy wtórnej DRAGEN są zapisywane w wybranym folderze wyjściowym.
 - **Local mode** (Tryb lokalny) – arkusz próbek w pliku w formacie v2 jest ręcznie importowany do oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000. Po sekwencjonowaniu analiza w aparacie rozpoczyna się automatycznie. Dane cBCL i pliki wyjściowe analizy wtórnej DRAGEN są zapisywane w wybranym folderze wyjściowym. Jeśli wybrano opcję Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie), analiza może być również inicjowana za pośrednictwem aplikacji platformy BaseSpace Sequence Hub po zakończeniu sekwencjonowania.
 - **Standalone mode** (Tryb autonomiczny) – należy skonfigurować przebieg zgodnie z instrukcjami w oprogramowaniu sterującym NextSeq 1000/2000, aby wygenerować dane cBCL.
- ⚠ | Otwarcie osłony podczas wstępnych testów kontrolnych lub przebiegu może skutkować niepowodzeniem przebiegu.


-  Podczas otwierania lub zamykania osłony należy trzymać ręce z dala od aparatu, aby uniknąć obrażeń.

Inicjowanie przebiegu w chmurze lub hybrydowego

1. Skonfigurować tryb przebiegu zgodnie z opisem podanym w części [Konfiguracja trybu przebiegu na stronie 20](#).
 2. Wybrać opcję **Start** (Uruchom).
 3. Wprowadzić swoje dane logowania do platformy BaseSpace Sequence Hub, a następnie wybrać opcję **Sign In** (Zaloguj).
 4. W przypadku wyboru opcji Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie) wybrać grupę roboczą zawierającą przebieg utworzony za pomocą narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie) na platformie BaseSpace Sequence Hub.
-  W celu uniknięcia błędów konieczne jest wybranie grupy roboczej. Przed wykonaniem dalszych czynności upewnić się, że wybrano grupę roboczą.
5. Wybrać opcję **Next** (Dalej).
 6. Wybrać przebieg.
 7. Potwierdzić, czy analiza, długość przebiegu i wersja analizy wtórnej są zgodne z przebiegiem. W analizie zostanie wyświetlona informacja Cloud_ w celu wskazania, że analiza odbywa się na platformie BaseSpace Sequence Hub.
 8. Wybrać opcję **Review** (Przegląd).
 9. **[Opcjonalnie]** Wprowadzić lokalizacje niestandardowego startera odczytu i niestandardowego startera indeksowania.
Informacje na temat przygotowywania i dodawania starterów niestandardowych zawiera *Przewodnik dotyczący starterów niestandardowych NextSeq 1000 i 2000 (nr dokumentu: 1000000139569)*. Odwiedzić stronę poświęconą zgodnym produktom dla używanego zestawu do przygotowania biblioteki, aby sprawdzić, czy konieczne są niestandardowe startery Illumina.
 10. **[Opcjonalnie]** Wybrać procedurę niestandardową. Więcej informacji zawiera część [Sekwencjonowanie w cyklu ciemnym na stronie 108](#).
Jeśli używane jest oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 w wersji 1.3 oraz zestaw Illumina Stranded Total RNA Prep z Ribo-Zero Plus lub zestaw Illumina Stranded mRNA Prep, wówczas wymagany protokół niestandardowy jest wybierany automatycznie.
 11. **[Opcjonalnie]** Aby ręcznie rozcieńczyć i denaturować biblioteki, usunąć zaznaczenie pola wyboru **Denature and Dilute On Board** (Denaturacja i rozcieńczanie w aparacie). Patrz: *Przewodnik dotyczący denaturacji i rozcieńczania bibliotek w sekwenatorach NextSeq 1000 i 2000 (nr dokumentu: 1000000139235)*.
Wybór domyślny jest skonfigurowany w ustawieniach oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000.

12. **[Opcjonalnie]** W celu zmiany folderu wyjściowego wybrać pole Output Folder (Folder wyjściowy) i wprowadzić nową lokalizację.
Pole Output Folder (Folder wyjściowy) zostanie automatycznie wypełnione z ustawień domyślnych i będzie wymagane, chyba że wybrano opcję **Proactive, Run Monitoring and Storage** (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie).
Jeśli wybrano opcję Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie), wówczas dla opcji Save to BaseSpace Sequence Hub (Zapis na platformie BaseSpace Sequence Hub) wyświetlana jest wartość Enabled (Włączone).
Jeśli wybrano opcję Proactive and Run Monitoring (Usługa Proactive i monitorowanie przebiegu), wówczas dla opcji Save to BaseSpace Sequence Hub (Zapis na platformie BaseSpace Sequence Hub) wyświetlana będzie wartość Disabled (Wyłączone).
13. Sprawdzić informacje o przebiegu i wybrać opcję **Prep** (Przygotowanie).

Inicjowanie przebiegu lokalnego

1. Skonfigurować tryb przebiegu zgodnie z opisem podanym w części [Konfiguracja trybu przebiegu na stronie 20](#).
 2. Wybrać opcję **Start** (Uruchom).
 3. Jeśli wybrano opcję Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie) lub opcję Proactive and Run Monitoring (Usługa Proactive i monitorowanie przebiegu), wprowadzić dane logowania do platformy BaseSpace Sequence Hub i wybrać opcję **Sign In** (Zaloguj).
 4. W przypadku wyboru opcji Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie) wybrać grupę roboczą platformy BaseSpace Sequence Hub, w której zostanie zapisany przebieg, a następnie wybrać opcję **Next** (Dalej).
-  W celu uniknięcia błędów konieczne jest wybranie grupy roboczej. Przed wykonaniem dalszych czynności upewnić się, że wybrano grupę roboczą.
5. Wybrać opcję **Choose...** (Wybierz...) w obszarze Start With Sample Sheet (Zacznij z arkuszem próbek), a następnie przejść do lokalizacji arkusza próbek w formacie v2 w aparacie NextSeq 1000/2000, na dysku przenośnym lub zainstalowanym dysku sieciowym. Nazwy plików arkuszy próbek nie mogą zawierać znaków specjalnych.
Oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 w wersji 1.3 automatycznie wykrywa wersję rozwiązania DRAGEN z arkusza próbek i w razie potrzeby wyświetlany jest monit o zmianę wersji. Dana wersja rozwiązania DRAGEN musi być zainstalowana w systemie. Informacje o instalacji zawiera część [Aktualizacje oprogramowania na stronie 81](#).
 - **Instrument Run Setup Used** (Użyto konfiguracji przebiegu w aparacie) – wybrać folder .zip zawierający arkusz próbek v2 oraz pliki pomocnicze (jeśli dotyczy). W przeciwnym wypadku wybrać arkusz próbek v2.

- **Instrument Run Setup Not Used** (Nie użyto konfiguracji przebiegu w aparacie) – upewnić się, że plik pomocniczy analizy wtórnej znajduje się w tym samym katalogu, co arkusz próbek v2.

i | Wybrany arkusz próbek musi mieć formatowanie v2. W celu utworzenia arkusza próbek v2 należy pobrać wygenerowany arkusz próbek z narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie) na platformie BaseSpace Sequence Hub albo przeprowadzić edycję szablonu arkusza próbek v2, który jest dostępny na stronie pomocy dotyczącej systemu NextSeq 1000/2000. Więcej informacji o formatowaniu i wymaganiach dotyczących arkusza próbek v2 zawiera część [Ustawienia arkusza próbek v2 na stronie 92](#). Upewnić się, że jakiegokolwiek pliki, do których odwołuje się arkusz próbek, znajdują się w tym samym folderze, co arkusz próbek.

6. Wybrać opcję **Review** (Przegląd).

7. **[Opcjonalnie]** Wprowadzić lokalizacje niestandardowego startera odczytu i niestandardowego startera indeksowania.

Informacje na temat przygotowywania i dodawania starterów niestandardowych zawiera *Przewodnik dotyczący starterów niestandardowych NextSeq 1000 i 2000 (nr dokumentu: 1000000139569)*. Odwiedzić stronę poświęconą zgodnym produktom dla używanego zestawu do przygotowania biblioteki, aby sprawdzić, czy konieczne są niestandardowe startery Illumina.

8. **[Opcjonalnie]** Wybrać procedurę niestandardową. Więcej informacji zawiera część [Sekwencjonowanie w cyklu ciemnym na stronie 108](#).

Jeśli używane jest oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 w wersji 1.3 oraz zestaw Illumina Stranded Total RNA Prep z Ribo-Zero Plus lub zestaw Illumina Stranded mRNA Prep, wówczas wymagany protokół niestandardowy jest wybierany automatycznie.

9. **[Opcjonalnie]** Aby ręcznie rozcieńczyć i denaturować biblioteki, usunąć zaznaczenie pola wyboru **Denature and Dilute On Board** (Denaturacja i rozcieńczanie w aparacie). Patrz: *Przewodnik dotyczący denaturacji i rozcieńczania bibliotek w sekwenatorach NextSeq 1000 i 2000 (nr dokumentu: 1000000139235)*.

Wybór domyślny jest skonfigurowany w ustawieniach oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000.

10. **[Opcjonalnie]** W celu zmiany folderu wyjściowego wybrać pole Output Folder (Folder wyjściowy) i wprowadzić nową lokalizację.

Pole Output Folder (Folder wyjściowy) zostanie automatycznie wypełnione z ustawień domyślnych i będzie wymagane, chyba że wybrano opcję Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie).

Jeśli wybrano opcję Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie), wówczas dla opcji Save to BaseSpace Sequence Hub (Zapis na platformie BaseSpace Sequence Hub) zostanie wyświetlona wartość Enabled (Włączone).

Jeśli wybrano opcję Proactive and Run Monitoring (Usługa Proactive i monitorowanie przebiegu), wówczas dla opcji Save to BaseSpace Sequence Hub (Zapis na platformie BaseSpace Sequence Hub) wyświetlana będzie wartość Disabled (Wyłączone).

11. Sprawdzić informacje o przebiegu i wybrać opcję **Prep** (Przygotowanie).

Inicjowanie przebiegu autonomicznego

1. Skonfigurować tryb przebiegu zgodnie z opisem podanym w części [Konfiguracja trybu przebiegu na stronie 20](#).
2. Wybrać opcję **Start** (Uruchom).
3. Jeśli wybrano opcję Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie) lub opcję Proactive and Run Monitoring (Usługa Proactive i monitorowanie przebiegu), wprowadzić dane logowania do platformy BaseSpace Sequence Hub i wybrać opcję **Sign In** (Zaloguj).
4. W przypadku wyboru opcji Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie) wybrać grupę roboczą platformy BaseSpace Sequence Hub, w której zostanie zapisany przebieg, a następnie wybrać opcję **Next** (Dalej).
5. Wybrać opcję **Set Up New Run** (Skonfiguruj nowy przebieg).
6. W polu Run Name (Nazwa przebiegu) wprowadzić unikatową nazwę zgodnie z preferencjami w celu zidentyfikowania bieżącego przebiegu.
Nazwa przebiegu może zawierać znaki alfanumeryczne, kreski, myślniki i znaki podkreślenia.
7. Dla ustawienia Read Type (Typ odczytu) wybrać liczbę odczytów sekwencjonowania do przeprowadzenia:
 - **Single Read** (Pojedynczy odczyt) – przeprowadzenie jednego odczytu, co jest prostszą i szybszą opcją.
 - **Paired End** (Sparowane końce) – przeprowadzenie dwóch odczytów, czego skutkiem jest generowanie danych o wyższej jakości, umożliwiającym dokładniejsze dopasowanie.
8. Wprowadzić liczbę cykli do wykonania w każdym odczycie:
Nie istnieje maksymalna liczba cykli indeksowania, ale suma cykli odczytu i cykli indeksowania musi być mniejsza niż liczba cykli wskazana na etykiecie kasety powiększona o 27.

Read 1 (Odczyt 1) – wprowadzić wartość od **1** do **151** cykli.

Index 1 (Indeks 1) – wprowadzić liczbę cykli dla startera Index 1 (i7) (Indeks 1 (i7)). W przypadku przebiegu tylko z biblioteką PhiX wprowadzić wartość **0** do obu pól indeksu.

Index 2 (Indeks 2) – wprowadzić liczbę cykli dla startera Index 2 (i5) (Indeks 2 (i5)).

Read 2 (Odczyt 2) – wprowadzić maksymalnie **151** cykli. Ta wartość jest zwykle taka sama jak wartość Read 1 (Odczyt 1).

9. Jeśli wybrano opcję Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie), wybrać opcję **Choose...** (Wybierz...), aby zaimportować arkusz próbek.

Oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 w wersji 1.3 automatycznie wykrywa wersję rozwiązania DRAGEN z arkusza próbek i w razie potrzeby wyświetlany jest monit o zmianę wersji. Dana wersja rozwiązania DRAGEN musi być zainstalowana w systemie. Informacje o instalacji zawiera część [Aktualizacje oprogramowania na stronie 81](#).

- i** | Wybrany arkusz próbek musi mieć formatowanie v2. W celu utworzenia arkusza próbek v2 należy pobrać wygenerowany arkusz próbek z narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie) na platformie BaseSpace Sequence Hub albo przeprowadzić edycję szablonu arkusza próbek v2, który jest dostępny na stronie pomocy dotyczącej systemu NextSeq 1000/2000. Więcej informacji o formatowaniu i wymaganiach dotyczących arkusza próbek v2 zawiera część [Ustawienia arkusza próbek v2 na stronie 92](#). Upewnij się, że jakiegokolwiek pliki, do których odwołuje się arkusz próbek, znajdują się w tym samym folderze, co arkusz próbek.
10. **[Opcjonalnie]** Wprowadzić lokalizacje niestandardowego startera odczytu i niestandardowego startera indeksowania.
Informacje na temat przygotowywania i dodawania starterów niestandardowych zawiera *Przewodnik dotyczący starterów niestandardowych NextSeq 1000 i 2000 (nr dokumentu: 1000000139569)*. Odwiedzić stronę poświęconą zgodnym produktom dla używanego zestawu do przygotowania biblioteki, aby sprawdzić, czy konieczne są niestandardowe startery Illumina.
 11. **[Opcjonalnie]** Wybrać procedurę niestandardową. Więcej informacji zawiera część [Sekwencjonowanie w cyklu ciemnym na stronie 108](#)
 12. **[Opcjonalnie]** Aby ręcznie rozcieńczyć i denaturować biblioteki, usunąć zaznaczenie pola wyboru **Denature and Dilute On Board** (Denaturacja i rozcieńczanie w aparacie). Patrz: *Przewodnik dotyczący denaturacji i rozcieńczania bibliotek w sekwenatorach NextSeq 1000 i 2000 (nr dokumentu: 1000000139235)*.
Wybór domyślny jest skonfigurowany w ustawieniach oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000.
 13. **[Opcjonalnie]** W celu zmiany folderu wyjściowego wybrać pole Output Folder (Folder wyjściowy) i wprowadzić nową lokalizację.
Pole Output Folder (Folder wyjściowy) zostanie automatycznie wypełnione z ustawień domyślnych i będzie wymagane, chyba że wybrano opcję Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie).
 14. Wybrać opcję **Prep** (Przygotuj).

Ładowanie materiałów eksploatacyjnych do aparatu

1. Upewnić się, że kasetę została wcześniej rozmrożona i odwrócona 10 razy w celu wymieszania przed załadowaniem komory przepływowej (po wyjęciu szarego uchwyty) i rozcieńczonej biblioteki.
2. Wybrać opcję **Load** (Załaduj).
Oprogramowanie NextSeq 1000/2000 otworzy osłonę i wysunie tacę.
3. Umieścić kasetę na tacy w taki sposób, aby etykieta była skierowana do góry, a komora przepływowa znajdowała się wewnątrz aparatu. Wepchnąć kasetę, aż zablokuje się w gnieździe.



4. Wybrać opcję **Close** (Zamknij), aby wsunąć kasetę i zamknąć osłonę.
Po około 3 minutach oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 wyświetli informacje z zeskanowanych materiałów eksploatacyjnych.
5. [Opcjonalnie] Wybrać opcję **Eject Cartridge** (Wysuń kasetę), aby wyjąć kasetę.
Osłona otworzy się po 1 minucie, a kasetę zostanie wysunięta.
6. Wybrać opcję **Sequence** (Sekwencja).

Wstępne testy kontrolne

Wstępne testy kontrolne obejmują kontrolę aparatu, po której następuje kontrola układu przepływowego. Podczas kontroli układu przepływowego następuje przebicie uszczelki kasety, czemu towarzyszy odgłos 3–4 trzaśnień dobiegający z aparatu. Jest to normalne zjawisko. Następnie odczynnik przepływa przez komorę przepływową.

! Od momentu rozpoczęcia testu układu przepływowego nie można już ponownie użyć materiałów eksploatacyjnych.

1. Począkać około 15 minut na zakończenie wstępnych testów kontrolnych.
Przebieg rozpocznie się automatycznie po ich pomyślnym zakończeniu.
2. W przypadku wystąpienia błędu podczas kontroli aparatu wybrać opcję **Retry** (Ponów próbę), aby ponownie wykonać test kontrolny.
Podczas kontroli wyświetlany jest animowany okrąg postępu.

3. Informacje na temat usuwania powtarzających się błędów zawiera część [Usuwanie komunikatów o błędach na stronie 86](#).

Monitorowanie postępu przebiegu

1. Monitorować postęp i dane przebiegu w miarę ich wyświetlania na ekranie Sequencing (Sekwencjonowanie).
 - **Estimated run completion** (Szacowane zakończenie przebiegu) – przybliżona data i godzina zakończenia przebiegu. Parametr szacunkowego czasu trwania przebiegu wymaga 10 wcześniejszych przebiegów w celu wyliczenia dokładnego czasu trwania przebiegu.
 - **Average %Q30** (Średnie %Q30) – uśredniona wartość procentowa rozpoznań nukleotydów z wynikiem jakościowym ≥ 30 .
 - **Projected Yield** (Prognozowany uzysk) – oczekiwana liczba nukleotydów rozpoznanych podczas przebiegu.
 - **Total Reads PF** (Łączna liczba przebiegów PF) – liczba klastrów ze sparowanymi końcami (jeśli dotyczy), które przechodzą przez filtr (w milionach).
 - **Real Time Demux** (Demultipleksowanie w czasie rzeczywistym) – status demultipleksowania zainicjowanego na początku odczytu Read 2, po zakończeniu cykli Read 1, Index 1 i Index 2. Status będzie wyświetlany jako Complete (Zakończony), nawet jeśli cykle indeksowania nie zostały wykonane. Parametr niedostępny w przypadku przebiegów przeprowadzanych w trybie w chmurze.
 - **Real Time Alignment** (Dopasowanie w czasie rzeczywistym) – status dopasowania odczytu Read 1 zainicjowanego na początku odczytu Read 2, po zakończeniu cykli Read 1, Index 1 i Index 2. Parametr niedostępny w przypadku przebiegów przeprowadzanych w trybie w chmurze.

Dane dotyczące wartości Q30 i uzysku pojawiają się po cyklu 26 (około 6 godzin po rozpoczęciu przebiegu).
2. Aby monitorować procesy przebiegu, wybrać menu oprogramowania sterującego, a następnie wybrać opcję **Process Management** (Zarządzanie procesem).
3. Aby anulować przebieg, wybrać opcję **End Run** (Zakończ przebieg). Więcej informacji o anulowaniu przebiegów zawiera część [Anulowanie przebiegu na stronie 87](#).
4. Wyładować materiały eksploatacyjne z aparatu. Kasetę należy wyjąć z aparatu w ciągu 3 dni.

Wyładowywanie materiałów eksploatacyjnych

1. Po zakończeniu sekwencjonowania wybrać opcję **Eject Cartridge** (Wysuń kasetę). Oprogramowanie wysunie zużytą kasetę z aparatu.
2. Wyjąć kasetę z tacy.
3. Wyjąć komorę przepływową z kasety.

4. Zutylizować komorę przepływową, która zawiera elementy elektroniczne, zgodnie z odpowiednimi normami obowiązującymi w regionie.
5. [Opcjonalnie] Wyjąć zatyczkę odpływu znajdującą się pod logo Illumina z boku kasety nad odpowiednim zbiornikiem (np. nad zlewem albo pojemnikiem na płynne odpady niebezpieczne), ustawiając zatyczkę poziomo lub kierując ją w dół z dala od twarzy. Odprowadzić do zbiornika zużyte odczynniki zgodnie z odpowiednimi normami obowiązującymi w regionie. Czas opróżniania jest zależny od wielkości kasety, jeśli automatyczne czyszczenie odczynników nie jest włączone.

! Ten zestaw odczynników zawiera potencjalnie niebezpieczne substancje chemiczne. **Wdychanie, połknięcie, kontakt ze skórą i oczami mogą powodować uszczerbek na zdrowiu. Należy nosić wyposażenie ochronne, w tym ochronę oczu, rękawiczki oraz fartuch laboratoryjny odpowiednie do ryzyka narażenia. Zużyte odczynniki należy traktować jako odpady chemiczne i utylizować je zgodnie z odpowiednimi przepisami regionalnymi, krajowymi i lokalnymi.** Dodatkowe informacje dotyczące ochrony środowiska, zdrowia i bezpieczeństwa zawiera karta charakterystyki dostępna na stronie support.illumina.com/sds.html.

6. Zutylizować kasetę odczynników.
Płukanie aparatu po zakończeniu przebiegu nie jest wymagane, ponieważ elementy układu przepływowego są usuwane wraz z kasetą.
7. Wybrać **Close Door** (Zamknij drzwiczki), aby ponownie załadować tacę i powrócić do ekranu głównego.
Oprogramowanie automatycznie ponownie załaduje tacę, a czujniki potwierdzą usunięcie kasety.

Czyszczenie tacy na kasetę

Czyszczenie tacy na kasetę jest wymagane wyłącznie wówczas, gdy wyciekł na nią odczynnik.

1. Wyjąć kasetę z aparatu.
2. Założyć nową parę rękawic bezpudrowych i wszelkie inne dodatkowe elementy odzieży ochronnej.
3. Rozpylić na ściereczkę 10% roztwór wybielacza.
4. Wyrzeć tacę na kasetę ściereczką, a następnie natychmiast usunąć roztwór wybielacza, używając ściereczki z mocnego materiału.
Jeśli wybielacz nie zostanie natychmiast usunięty, spowoduje odbarwienie tacy na kasetę.
5. Rozpylić 70% roztwór etanolu na tacę na kasetę i natychmiast go usunąć, używając ściereczki z mocnego materiału.
6. Ustawić tacę na kasetę z powrotem w pozycji ładowania.

Dane wyjściowe sekwencjonowania

W niniejszym rozdziale opisano oprogramowanie Real-Time Analysis, które służy do rozpoznawania nukleotydów, przypisywania wyników jakościowych i generowania danych wyjściowych. Informacje zawarte w tym rozdziale ułatwiają poznanie różnych typów plików wyjściowych oraz ich lokalizacji po przebiegu.

Oprogramowanie Real-Time Analysis – omówienie

W sekwenatorach NextSeq 1000 i NextSeq 2000 działa oprogramowanie RTA3, które jest implementacją oprogramowania Real-Time Analysis na silniku Compute Engine (CE) aparatu. Oprogramowanie RTA3 wyodrębnia natężenia z obrazów otrzymanych z kamery, przeprowadza rozpoznawanie nukleotydów, przypisuje wynik jakościowy do rozpoznań nukleotydów, dopasowuje je do kontroli PhiX, a następnie raportuje dane w plikach InterOp w celu wyświetlania w oprogramowaniu sterującym aparatu.

W celu optymalizacji czasu przetwarzania oprogramowanie RTA3 zapisuje informacje w pamięci. W przypadku przerwania pracy oprogramowania RTA3 przetwarzanie nie jest wznowiane, a dane każdego przebiegu przetwarzane w pamięci zostają utracone.

RTA3 – dane wejściowe

Na potrzeby przetwarzania oprogramowanie RTA3 wymaga obrazów płytek w lokalnej pamięci systemu. Oprogramowanie RTA3 otrzymuje informacje o przebiegu oraz polecenia z oprogramowania sterującego.

RTA3 – dane wyjściowe

Obrazy poszczególnych kanałów kodowanych kolorem są przekazywane w pamięci do oprogramowania RTA3 jako płytki. Na podstawie tych obrazów oprogramowanie RTA3 generuje zestaw plików rozpoznań nukleotydów z oceną jakościową oraz plików filtrów. Wszystkie pozostałe dane wyjściowe są pomocniczymi plikami wyjściowymi.

Typ pliku	Opis
Pliki rozpoznań nukleotydów	Każda przeanalizowana płytka jest uwzględniana w skoncatenowanym pliku rozpoznań nukleotydów (*.cbcl). Płytki z tego samego pasma i powierzchni są umieszczane zbiorczo w jednym pliku *.cbcl dla danego pasma i powierzchni.

Typ pliku	Opis
Pliki filtrów	Każda płytkę generuje plik filtru (*.filter), który określa, czy klastery przechodzą przez filtry.
Pliki lokalizacji klastrów	Pliki lokalizacji klastrów (*.locs) zawierają współrzędne X, Y wszystkich klastrów w płytce. Plik lokalizacji klastrów jest generowany dla każdego przebiegu.

Pliki wyjściowe są używane do dalszej analizy w oprogramowaniu DRAGEN oraz na platformie BaseSpace Sequence Hub.

Usuwanie błędów

Oprogramowanie RTA3 tworzy pliki dziennika i zapisuje je w folderze Logs. Błędy są zapisywane w pliku tekstowym w formacie *.log.

Następujące pliki dzienników są przesyłane do końcowej lokalizacji danych wyjściowych pod koniec przetwarzania:

info_00000.log – zawiera podsumowanie zdarzeń ważnych dla przebiegu.

error_00000.log – zawiera listę błędów, jakie wystąpiły podczas przebiegu.

warning_00000.log – zawiera listę ostrzeżeń, jakie wystąpiły podczas przebiegu.

Płytki komory przepływowej

Płytki są niewielkimi obszarami obrazowania w komorze przepływowej. Kamera rejestruje jeden obraz na płytkę.

Komora przepływowa NextSeq 1000/2000 P2 zawiera łącznie 132 płytki. Komora przepływowa NextSeq 1000/2000 P3 zawiera łącznie 264 płytki.

Tabela 5 Płytki komory przepływowej

Element komory przepływowej	Komora przepływowa NextSeq 1000/2000 P2	Komora przepływowa NextSeq 1000/2000 P3	Opis
Pasma	1	2	Pasma różnią się pod względem optycznym, ale nie stanowią oddzielnych kanałów w układzie przepływowym.

Element komory przepływowej	Komora przepływowa NextSeq 1000/2000 P2	Komora przepływowa NextSeq 1000/2000 P3	Opis
Powierzchnie	2	2	Komory przepływowe P2 i P3 są obrazowane na dwóch powierzchniach – górnej i dolnej. Górna powierzchnia płytki jest obrazowana jako pierwsza.
Zbiory w paśmie	6	6	Zbiór to kolumna w paśmie komory przepływowej.
Płytki na zbiór	11	11	Płytki jest częścią zbioru, która przedstawia obrazowany obszar komory przepływowej.
Łączna liczba generowanych płytek	132	264	Łączna liczba płytek jest wynikiem równania: pasma × powierzchnie × zbiory × płytki na zbiór.

Nazewnictwo płytek

Nazwa płytki jest czterocyfrową liczbą, która reprezentuje pozycję płytki w komorze przepływowej. Na przykład nazwa płytki 1205 oznacza powierzchnię górną, zbiór 2, płytkę 05.

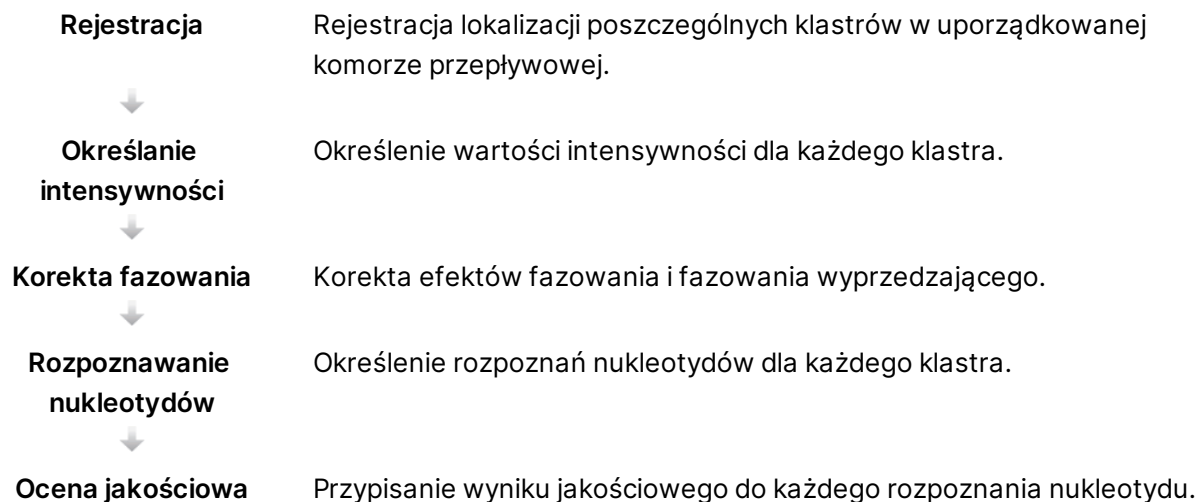
Pierwsza cyfra reprezentuje powierzchnię: 1 oznacza górną powierzchnię, a 2 oznacza dolną powierzchnię.

Druga cyfra reprezentuje numer zbioru: 1, 2, 3, 4, 5 lub 6.

Ostatnie dwie cyfry reprezentują numer płytki. W przypadku numerów zbioru 1–4 numeracja zaczyna się od 01 przy wylotowym końcu komory przepływowej, a kończy się na 11 przy końcu wlotowym.

W przypadku numerów zbioru 5–6 numeracja zaczyna się od 01 przy wlotowym końcu, a kończy się na 11 przy końcu wylotowym.

Oprogramowanie Real-Time Analysis – procedura



Rejestracja

Rejestracja dopasowuje obraz do obróconej kwadratowej macierzy nanodołków w uporządkowanej komorze przepływowej. Ze względu na uporządkowany układ nanodołków współrzędne X i Y dla poszczególnych klastrów w płytce są wstępnie określone. Dla każdego przebiegu pozycje klastrów są zapisywane w pliku lokalizacji klastrów (s.locs).

Jeśli rejestracja się nie powiedzie dla któregokolwiek z obrazów w cyklu, w danym cyklu nie zostaną utworzone żadne rozpoznania nukleotydów w ramach tej płytki. Aby zidentyfikować obrazy, dla których rejestracja się nie powiodła, należy użyć przeglądarki Sequencing Analysis Viewer.

Określanie intensywności

Po rejestracji następuje etap określania intensywności, w ramach którego obliczana jest wartość intensywności dla każdego nanodołka na danym obrazie. W przypadku niepowodzenia rejestracji nie można określić intensywności dla danej płytki.

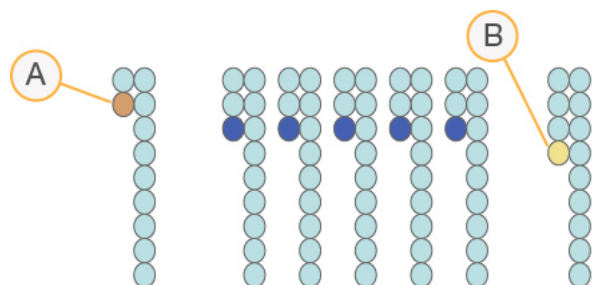
Korekta fazowania

Podczas reakcji sekwencjonowania każda nić DNA w klastrze wydłuża się o jeden nukleotyd na cykl. Fazowanie i fazowanie wyprzedzające występują, gdy nić znajdzie się poza fazą, w której przebiega bieżący cykl dołączania.

Fazowanie występuje, gdy dochodzi do opóźnienia o jedną zasadę.

Fazowanie wyprzedzające występuje, gdy dochodzi do wyprzedzenia o jedną zasadę.

Rysunek 5 Fazowanie i fazowanie wyprzedzające



- A. Odczyt z nukleotydem na etapie fazowania.
 B. Odczyt z nukleotydem na etapie fazowania wyprzedzającego.

Oprogramowanie RTA3 koryguje efekty fazowania i fazowania wyprzedzającego, co pozwala zmaksymalizować jakość danych w każdym cyklu podczas przebiegu.

Rozpoznawanie nukleotydów

Rozpoznawanie nukleotydów określa zasadę azotową (A, C, G lub T) dla każdego klastra danej płytki w określonym cyklu. Sekwenatory NextSeq 1000 i NextSeq 2000 wykorzystują sekwencjonowanie dwukanałowe, które wymaga tylko dwóch obrazów, aby zakodować dane dla czterech zasad azotowych DNA – jednego z kanału zielonego i jednego z kanału niebieskiego.

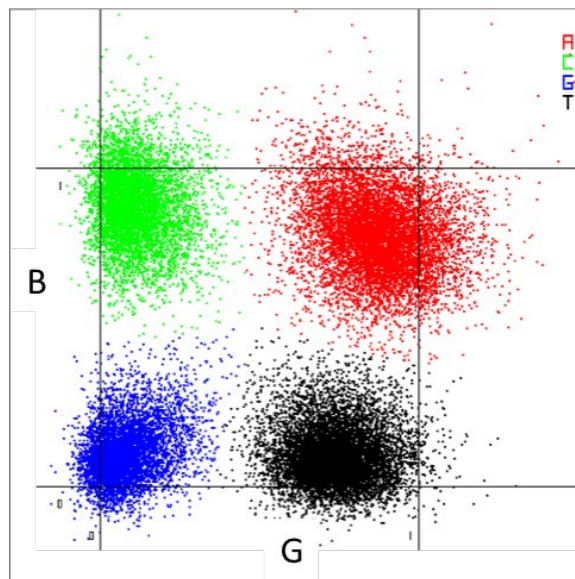
Brak rozpoznania jest identyfikowany jako N. Brak rozpoznań następuje wtedy, gdy klastr nie przechodzi filtru, rejestracja kończy się niepowodzeniem albo klastr przesunął się poza obraz.

Intensywności dla każdego klastra są określane na podstawie obrazów niebieskich i zielonych, a następnie są ze sobą porównywane, co powoduje uzyskanie czterech odrębnych populacji. Każda populacja odpowiada zasadzie azotowej. Proces rozpoznawania nukleotydów określa populację, do której należy każdy klastr.

Tabela 6 Rozpoznawanie nukleotydów w sekwencjonowaniu dwukanałowym

Zasada	Kanał zielony	Kanał niebieski	Wynik
A	1 (obecna)	1 (obecna)	Klastry, które wykazują intensywność zarówno w kanale zielonym, jak i niebieskim.
C	0 (nieobecna)	1 (obecna)	Klastry, które wykazują intensywność wyłącznie w kanale niebieskim.
G	0 (nieobecna)	0 (nieobecna)	Klastry, które nie wykazują intensywności w znanej lokalizacji klastra.
T	1 (obecna)	0 (nieobecna)	Klastry, które wykazują intensywność wyłącznie w kanale zielonym.

Rysunek 6 Wizualizacja poziomów intensywności klastrów



i | Kolory poszczególnych klastrów korelują z wykresem %Base w przeglądarce Sequence Analysis Viewer (SAV) oraz z danymi przebiegu według cyklu na platformie BaseSpace Sequence Hub. Korelacja kolorystyczna z kanałem zielonym i niebieskim nie jest zamierzona.

Klastry przechodzące przez filtr

Podczas przebiegu oprogramowanie RTA3 umożliwia odfiltrowanie nieprzetworzonych danych w celu usunięcia odczytów, które nie osiągają progu jakości danych. Klastry nakładające się i niskiej jakości są usuwane.

W przypadku analizy dwukanałowej oprogramowanie RTA3 wykorzystuje system oparty o populację, aby określić czystość (pomiar czystości intensywności) rozpoznania nukleotydu. Klastry przechodzą przez filtr (PF), gdy nie więcej niż jeden rozpoznany nukleotyd w pierwszych 25 cyklach ma czystość poniżej ustalonego progu. Dopasowanie kontroli PhiX (jeśli jest stosowana) przeprowadza się w cyklu 26 na podzestawie płytek dla klastrów, które przeszły przez filtr. Klastry, które nie przechodzą przez filtr, nie są poddawane rozpoznawaniu nukleotydów ani dopasowywane.

Wyniki jakościowe

Wynik jakościowy określa prawdopodobieństwo rozpoznania niewłaściwego nukleotydu. Wyższy wynik jakościowy wskazuje, że rozpoznanie nukleotydu ma wyższą jakość i większe prawdopodobieństwo poprawności. Po określeniu wyników jakościowych są one zapisywane w plikach rozpoznań nukleotydów (*.cbcl).

Pomiar jakości stanowi zwięzły sposób komunikacji prawdopodobieństwa wystąpienia niewielkich błędów. Wyniki jakościowe są wyświetlane jako $Q(X)$, gdzie X jest wynikiem. W poniższej tabeli przedstawiono relację między wynikiem jakościowym i prawdopodobieństwem błędu.

Wynik jakościowy Q(X)	Prawdopodobieństwo błędu
Q40	0,0001 (1 na 10 000)
Q30	0,001 (1 na 1000)
Q20	0,01 (1 na 100)
Q10	0,1 (1 na 10)

Ocena jakościowa i raportowanie

W ramach oceny jakościowej dla każdego rozpoznania nukleotydu obliczany jest zbiór wartości prognostycznych, które następnie są używane w celu wyszukania wyniku jakościowego w tabeli jakości. Tabele jakości zostały utworzone w celu zapewnienia optymalnej dokładności prognostycznej oceny jakościowej przebiegów wygenerowanych w określonej konfiguracji platformy do sekwencjonowania oraz metody oznaczania.



Wynik jakościowy jest obliczany na podstawie zmodyfikowanej wersji algorytmu Phred.

W celu wygenerowania tabeli jakości dla sekwenatorów NextSeq 1000 i NextSeq 2000 ustalono trzy grupy rozpoznania nukleotydów na podstawie klastrowania swoistych cech predykcyjnych. Po pogrupowaniu rozpoznania nukleotydów metodą doświadczalną obliczono średni odsetek błędów dla każdej z trzech grup, a następnie w tabeli jakości zarejestrowano odpowiednie wyniki jakościowe wraz z cechami predykcyjnymi skorelowanymi z konkretną grupą. W rezultacie w przypadku oprogramowania RTA3 możliwe są tylko trzy wyniki jakościowe, które reprezentują średni odsetek błędów grupy (*Uproszczone wyniki jakościowe w oprogramowaniu RTA3 na stronie 65*). W ujęciu ogólnym wyniki są uproszczone, jednak metoda ta zapewnia bardzo dokładną ocenę jakości. Trzy grupy w tabeli jakości odpowiadają rozpoznaniom nukleotydów o jakości marginalnej (<Q15), średniej (~Q20) i wysokiej (>Q30), a ponadto przypisuje się im swoiste wyniki – odpowiednio 12, 23 i 37. Dodatkowo wynik null wynoszący 2 jest przypisywany w przypadku braku rozpoznania. Taki model raportowania wyników jakościowych zmniejsza wymagania dotyczące ilości przestrzeni dyskowej i przepustowości, a nie wpływa na dokładność ani wydajność.

Rysunek 7 Uprozczone wyniki jakościowe w oprogramowaniu RTA3



Pliki wyjściowe sekwencjonowania

Typ pliku	Opis, lokalizacja i nazwa pliku
Skonkatenowane pliki rozpoznań nukleotydów	<p>W skonkatenowanym pliku rozpoznań nukleotydów uwzględniany jest każdy przeanalizowany klastrowy, przy czym klastry są grupowane do jednego pliku na cykl, pasmo i powierzchnię. Plik zbiorczy zawiera skonkatenowane rozpoznania nukleotydów oraz zakodowaną ocenę jakościową dla każdego klastra. Skonkatenowane pliki rozpoznań nukleotydów są wykorzystywane przez platformę BaseSpace Sequence Hub lub bcl2fastq2.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001/C1.1</p> <p>L[pasmo]_[powierzchnia].cbcl – na przykład L001_1.cbcl</p>
Pliki lokalizacji klastrów	<p>W przypadku każdej komory przepływowej binarny plik lokalizacji klastra zawiera współrzędne XY dla klastrów w płytce. Heksagonalny układ zgodny z układem nanodołków komory przepływowej wstępnie definiuje współrzędne.</p> <p>Data/Intensities</p> <p>s_[pasmo].locs</p>
Pliki filtrów	<p>Plik filtra określa, czy klastrowy przeszedł przez filtry. Pliki filtrów są tworzone podczas cyklu 26 z użyciem 25 cykli danych. Dla każdej płytki tworzony jest jeden plik filtra.</p> <p>Data/Intensities/BaseCalls/L001</p> <p>s_[pasmo]_[płytki].filter</p>

Typ pliku	Opis, lokalizacja i nazwa pliku
Pliki InterOp	Binarne pliki sprawozdawcze mogą być wyświetlane w aparacie w oprogramowaniu sterującym aparatu albo poza aparatem w przeglądarce SAV lub na platformie BaseSpace Sequence Hub. Pliki InterOp są aktualizowane przez cały czas trwania przebiegu. Folder <code>InterOp</code>
Plik informacji o przebiegu	Zawiera nazwę przebiegu, liczbę cykli w poszczególnych odczytach, informację, czy odczyt jest odczytem indeksu, a także liczbę zbiorów i płytek w komorze przepływowej. Plik informacji o przebiegu jest tworzony na początku przebiegu. [Folder główny], <code>RunInfo.xml</code>

Pliki wyjściowe analizy wtórnej DRAGEN

Platforma DRAGEN Bio-IT analizuje dane wyjściowe sekwencjonowania w aparacie z wykorzystaniem jednego z poniższych protokołów analizy.

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

W tej części podano informacje o poszczególnych procedurach DRAGEN, w tym na temat plików wyjściowych. Oprócz generowania plików właściwych dla poszczególnych procedur rozwiązanie DRAGEN udostępnia również parametry analizy w pliku `<nazwa_próbki>.metrics.json` oraz raporty opisane w części [Procedura DRAGEN BCL Convert na stronie 72](#). Więcej informacji o aplikacji DRAGEN można znaleźć na [stronie pomocy technicznej platformy DRAGEN Bio-IT](#).

Wszystkie procedury DRAGEN obsługują dekompresję wejściowych plików BCL oraz kompresję wyjściowych plików BAM/CRAM.

Uwagi dotyczące plików wyjściowych:

- W przypadku procedur Germline, RNA, Enrichment i DNA Amplicon wykonywanych w ramach analizy w aparacie pliki BAM nie są przekazywane do platformy BaseSpace Sequence Hub, jeśli wybrano opcję Proactive, Run Monitoring and Storage (Usługa Proactive, monitorowanie przebiegu i przechowywanie).

Procedura DRAGEN Enrichment

Procedura DRAGEN Enrichment obsługuje poniżej wymienione funkcje. W przypadku używania rozwiązania DRAGEN w wersji 3.7 lub nowszej obsługiwany jest zarówno tryb linii zarodkowej, jak i tryb linii somatycznej (tylko guz).

- Demultipleksowanie próbki
- Mapowanie i dopasowanie, w tym sortowanie i oznaczanie duplikatów
- Rozpoznawanie wariantów małych
- Rozpoznawanie wariantów strukturalnych

Aby wykonać rozpoznawanie wariantów, plik *.bed musi być uwzględniony w arkuszu próbek lub musi zostać określony za pomocą narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie) na platformie BaseSpace Sequence Hub. Rozpoznawanie wariantów strukturalnych jest przeprowadzane wyłącznie w przypadku odczytów w trybie sparowanych końców i trybie linii zarodkowej.

Jeśli używana jest aplikacja DRAGEN Enrichment w wersji 3.8 lub nowszej, należy wprowadzić plik szumu bazowego, aby poprawić wydajność w trybie linii somatycznej. Patrz: [Importowanie plików szumu bazowego na stronie 19](#).

W wyniku tej procedury generowane są poniżej opisane pliki wyjściowe.

Element	Typ	Nazwa pliku wyjściowego
Mapowanie/dopasowanie	BAM lub CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.bam lub • <nazwa_próbki>.cram
Rozpoznawanie wariantów małych	VCF i gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.hard-filtered.gvcf.gz • <nazwa_próbki>.hard-filtered.vcf.gz
Rozpoznawanie wariantów strukturalnych	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.sv.vcf.gz

* Pliki wyjściowe gVCF są dostępne wyłącznie dla trybu linii zarodkowej.

Procedura DRAGEN Germline

Procedura DRAGEN Germline obsługuje następujące funkcje:

- Demultipleksowanie próbki
- Mapowanie i dopasowanie, w tym sortowanie i oznaczanie duplikatów
- Rozpoznawanie wariantów małych
- Rozpoznawanie wariantów strukturalnych w przypadku odczytów w trybie sparowanych końców
- Rozpoznawanie polimorfizmu liczby kopii na potrzeby genomów ludzkich

- Identyfikacja ekspansji powtórzeń na potrzeby genomów ludzkich
- Identyfikacja regionów homozygotyczności na potrzeby genomów ludzkich
- [Oprogramowanie DRAGEN w wersji 3.8 lub nowszej] Wykrywanie CYP2D6

Rozpoznawanie wariantów strukturalnych jest przeprowadzane wyłącznie w przypadku odczytów w trybie sparowanych końców.

W wyniku tej procedury generowane są poniżej opisane pliki wyjściowe.

Element	Typ	Nazwa pliku wyjściowego
Mapowanie/dopasowanie	BAM lub CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.bam lub • <nazwa_próbki>.cram
Rozpoznawanie wariantów małych	VCF i gVCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.hard-filtered.gvcf.gz • <nazwa_próbki>.hard-filtered.vcf.gz
Algorytm rozpoznawania wariantów strukturalnych	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.sv.vcf.gz
Polimorfizm liczby kopii	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.cnv.vcf.gz
Ekspansja powtórzeń	VCF	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.repeats.vcf.gz
Regiony homozygotyczności	CSV i BED	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.roh_metrics.csv • <nazwa_próbki>.roh.bed
Wykrywanie CYP2D6	TSV	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.cyp2d6.tsv

Procedura DRAGEN DNA Amplicon

Ta procedura DRAGEN obsługuje następujące funkcje:

- Demultipleksowanie próbek
- Mapowanie i dopasowanie, w tym sortowanie i oznaczanie duplikatów
- Rozpoznawanie wariantów małych w trybie linii zarodkowej lub linii somatycznej

Aby wykonać rozpoznawanie wariantów, plik *.bed musi być uwzględniony w arkuszu próbek lub musi zostać określony za pomocą narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie) na platformie BaseSpace Sequence Hub.

W wyniku tej procedury generowane są poniżej opisane pliki wyjściowe.

Element	Typ	Nazwa pliku wyjściowego
Mapowanie/dopasowanie	BAM lub CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.bam lub • <nazwa_próbki>.cram
Rozpoznawanie wariantów małych	VCF i gVCF*	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.hard-filtered.gvcf.gz • <nazwa_próbki>.hard-filtered.vcf.gz

* Pliki wyjściowe gVCF są dostępne wyłącznie dla trybu linii zarodkowej.

Procedura DRAGEN RNA

Procedura DRAGEN RNA obsługuje następujące funkcje:

- Demultipleksowanie próbki
- Mapowanie i dopasowanie, w tym sortowanie i oznaczanie duplikatów
- Wykrywanie fuzji genów
- Kwantyfikacja transkryptów
- **[Oprogramowanie DRAGEN w wersji 3.8 lub nowszej]** Różnicowa ekspresja genów

Aby wygenerować pliki wyjściowe, należy określić plik GTF w arkuszu próbek lub upewnić się, że domyślny plik `genes.gtf.gz` istnieje w genomie referencyjnym.

W wyniku tej procedury generowane są poniżej opisane pliki wyjściowe.

Element	Typ	Nazwa pliku wyjściowego	Opis
Mapowanie/dopasowanie	BAM lub CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.bam lub • <nazwa_próbki>.cram 	Dane wyjściowe dopasowania zgodne ze specyfikacjami SAM.
Wykrywanie fuzji genów	Zwykły tekst	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.fusion_candidates.preliminary • <nazwa_próbki>.fusion_candidates.final 	<ul style="list-style-type: none"> • Kandydady do fuzji przed zastosowaniem filtrów. • Kandydady do fuzji po zastosowaniu filtrów.
Kwantyfikacja transkryptów	Zwykły tekst	<ul style="list-style-type: none"> • nazwa_próbki.quant.genes.sf • nazwa_próbki.quant.sf 	<ul style="list-style-type: none"> • Wyniki kwantyfikacji transkryptów na poziomie genów. • Wszystkie wyniki kwantyfikacji transkryptów.

Element	Typ	Nazwa pliku wyjściowego	Opis
Ekspresja różnicowa	PNG	Zapoznać się z poniższą tabelą plików wyjściowych ekspresji różnicowej.	W celu wygenerowania plików wyjściowych należy skonfigurować porównanie w arkuszu próbek.

Gdy włączona jest funkcja ekspresji różnicowej, generowane są poniżej opisane pliki wyjściowe.

Nazwa pliku	Opis
Control_vs_Comparison.differential_expression_metrics.csv	Zawiera wyniki analizy ekspresji różnicowej.
Control_vs_Comparison.genes.counts.csv	Zawiera opis liczby odczytów mapowanych na poszczególne geny dla każdej próbki w grupie kontrolnej i porównawczej.
Control_vs_Comparison.genes.heatmap.png	Mapa cieplna ekspresji genów podlegających ekspresji różnicowej dla próbek w grupie kontrolnej i porównawczej. Ta mapa przedstawia wyłącznie geny podlegające ekspresji różnicowej ze skorygowaną wartością $P < 0,05$. Jeśli liczba genów podlegających ekspresji różnicowej jest większa niż 30, wówczas używanych jest pierwszych 30 genów podlegających takiej ekspresji. Jeśli nie nastąpi konwersja DESeq1 lub jeśli nie ma genów podlegających ekspresji różnicowej, wówczas plik nie zostanie wygenerowany.

Nazwa pliku	Opis
Control_vs_Comparison.genes.ma.png	Zawiera różne wartości stosunku ekspresji genów wyrażone jako funkcja średniej intensywności sygnału. W celu zaprezentowania różnic w pomiarach przeprowadzonych w dwóch próbkach tworzony jest wykres wartości, na którym dane są przekształcane w skalę M (wskaźnik logarytmiczny) i skalę A (średnia). Wykres MA pokazuje wielokrotność zmian (\log_2), które można przypisać konkretnej zmiennej w średniej znormalizowanych zliczeń ze wszystkich próbek. Jeśli skorygowana wartość P jest mniejsza niż 0,1, punkty mają kolor czerwony. Punkty, które nie należą do tego okna, są widoczne na wykresie jako trójkąty otwarte. Trójkąty wskazujące do góry reprezentują dodatnią wielokrotność zmian (\log). Trójkąty wskazujące w dół reprezentują ujemną wielokrotność zmian (\log).
Control_vs_Comparison.genes.pca.png	Na wykresie wyświetlane są dwa pierwsze elementy główne, które odpowiadają za większość zmienności.
Control_vs_Comparison.genes.res.csv	Zawiera wyniki analizy DESeq2, które obejmują ekspresję średnią, \log_2 (wielokrotność zmian), błąd standardowy \log_2 , wartość P, skorygowaną wartość P oraz status ekspresji poszczególnych genów.
Control_vs_Comparison.genes.rlog.csv	Zawiera wyniki regularyzowanych zliczeń po transformacji logarytmicznej obliczone w ramach analizy DESeq2.

Procedura DRAGEN Single Cell RNA

Ta procedura DRAGEN obsługuje następujące funkcje:

- Demultipleksowanie próbki
- Mapowanie i dopasowanie, w tym sortowanie i oznaczanie duplikatów
- Klasyfikowanie komórek i genów

Aby wygenerować pliki wyjściowe, należy określić plik GTF w arkuszu próbek lub upewnić się, że domyślny plik `genes.gtf.gz` istnieje w genomie referencyjnym.

W wyniku tej procedury generowane są poniżej opisane pliki wyjściowe.

Element	Typ	Nazwa pliku wyjściowego
Mapowanie/dopasowanie	BAM lub CRAM	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.bam lub • <nazwa_próbki>.cram
Klasyfikacja komórek/genów	TSV, CSV i MTX	<ul style="list-style-type: none"> • <nazwa_próbki>.scRNA.barcodeSummary.tsv • <nazwa_próbki>.scRNA.genes.tsv • <nazwa_próbki>.scRNA.matrix.mtx
Raporty z analiz	HTML	<nazwa_próbki>.dragen.scrna-report.*.html

Procedura DRAGEN BCL Convert

Procedura DRAGEN BCL Convert wykorzystuje dane BCL wygenerowane z sekwencjonowania oraz informacje z arkusza próbek w celu wygenerowania pliku FASTQ dla każdej próbki. Plik FASTQ ma nazwę w następującym formacie: <nazwa_próbki>.fastq.gz.

Ta procedura generuje następujące raporty:

Element	Typ	Nazwa pliku wyjściowego
Demultipleksowanie	CSV	• Demultiplex_Stats.csv
Parametry adaptera	CSV	• Adapter_Metrics.csv
Błędy multipleksowania	CSV	• Index_Hopping_Counts.csv
Pierwsze nieznane kody kreskowe	CSV	• Top_Unknown_Barcodes.csv

Raport statystyk demultipleksowania

Raport statystyk demultipleksowania zawiera informacje o liczbie odczytów przejścia przez filtr, które są przypisane do poszczególnych próbek w arkuszu próbek. Jakikolwiek odczyty, które nie są wyraźnie powiązane z próbką, są sklasyfikowane jako nieokreślone. Raport ten zawiera także informacje o wynikach jakościowych nukleotydów w odczytach przejścia przez filtr (PF) przypisanych do poszczególnych próbek.

Zawarte są następujące informacje.

Pomiar	Opis
Lane (Pasma)	Pasma w komorze przepływowej, w której próbka była sekwencjonowana.
SampleID	Identyfikator próbki z arkusza próbek. Jeśli odczyt nie odpowiada próbce, pole zawiera wartość <code>undetermined</code> (nieokreślone).

Pomiar	Opis
Index (Indeks)	Konkatenacja odczytów Index Read 1 (Odczyt 1 indeksu) i Index Read 2 (Odczyt 2 indeksu) z arkusza próbek rozdzielonych łącznikiem. Jeśli odczyt nie odpowiada próbce, pole zawiera wartość <code>undetermined</code> (nieokreślone).
# Reads (L. odczytów)	Liczba odczytów PF demultipleksowanych dla próbki w określonym paśmie.
# Perfect Index Reads (L. idealnych odczytów indeksu)	Liczba odczytów z idealnym dopasowaniem do połączonych sekwencji indeksów określonych w arkuszu próbek.
# One Mismatch Index Reads (L. odczytów indeksu z jedną niezgodnością)	Liczba odczytów z jednym błędem w połączonych sekwencjach indeksów określonych w arkuszu próbek.
# of \geq Q30 Bases (PF) (L. nukleotydów (PF) \geq progu Q30)	Liczba nukleotydów, wraz z adapterami, które odpowiadają odczytom przechodzącym przez próg jakości Q30.
Mean Quality Score (PF) (Średni wynik jakościowy (PF))	Średni wynik jakościowy dla odczytów odpowiadających próbce w określonym paśmie. Wartość ta uwzględnia nukleotydy adaptera.

Raport dotyczący parametrów adaptera

Plik parametrów adaptera zawiera liczby nukleotydów adaptera i próbki powiązane z poszczególnymi odczytami.

Zawarte są następujące informacje.

Pomiar	Opis
Lane (Pasma)	Pasma w komorze przepływowej, w której próbka była sekwencjonowana.
Sample_ID	Identyfikator próbki z arkusza próbek. Jeśli odczyt nie odpowiada próbce, pole zawiera wartość <code>undetermined</code> (nieokreślone).
index	Seqwencja index1 z arkusza próbek. Pole to jest puste, jeśli indeks nie został określony w arkuszu próbek albo identyfikator próbki ma wartość <code>undetermined</code> (nieokreślone).

Pomiar	Opis
index2	Sekwencja index2 z arkusza próbek. Pole to jest puste, jeśli indeks (index2) nie został określony w arkuszu próbek albo identyfikator próbki ma wartość <code>undetermined</code> (nieokreślone).
R1_ AdapterBases	Liczba nukleotydów odpowiadająca pozycji AdapterRead1 w arkuszu próbek.
R1_ SampleBases	Liczba przyciętych lub zamaskowanych nukleotydów z odczytu 1 dla odpowiedniego pasma i odpowiedniej próbki.
R2_ AdapterBases	Liczba nukleotydów odpowiadająca pozycji AdapterRead2 w arkuszu próbek.
R2_ SampleBases	Liczba przyciętych lub zamaskowanych nukleotydów z odczytu 2 dla odpowiedniego pasma i odpowiedniej próbki.
# Reads (L. odczytów)	Liczba odczytów dla próbki w określonym paśmie.

Raport dotyczący liczby błędów multipleksowania

Raport dotyczący liczby błędów multipleksowania zawiera liczbę odczytów dla każdego oczekiwanego i multipleksowanego indeksu w przypadku przebiegów z podwójnym indeksowaniem. Raport ten zawiera wyłącznie unikatowe podwójne indeksy na pasmo, w którym nie wykryto żadnego konfliktu kodu kreskowego w żadnym indeksie. W celu wygenerowania parametrów błędów multipleksowania dla pasma każda para pozycji w każdym indeksie musi mieć odległość Hamminga wynoszącą co najmniej $2N + 1$, gdzie N reprezentuje tolerancję niezgodności kodu kreskowego dla konkretnego indeksu.

Zawarte są następujące informacje.

W przypadku przebiegów bez indeksowania, przebiegów z pojedynczym indeksowaniem albo pasm, które nie zawierają unikatowych podwójnych indeksów, ten plik zawiera tylko nagłówki.

Pomiar	Opis
Lane (Pasma)	Pasma w komorze przepływowej, w której próbka była sekwencjonowana.
# Reads (L. odczytów)	Liczba odczytów dla próbki w określonym paśmie.
SampleID	Identyfikator próbki z arkusza próbek. Jeśli odczyt nie odpowiada próbce, pole zawiera wartość <code>undetermined</code> (nieokreślone).

Pomiar	Opis
index	Sekwencja index1 z arkusza próbek. To pole jest puste, jeśli odczyt został przeprowadzony w trybie pojedynczego końca lub identyfikator próbki ma wartość <code>undetermined</code> (nieokreślony).
index2	Sekwencja index2 z arkusza próbek. To pole jest puste, jeśli odczyt został przeprowadzony w trybie pojedynczego końca lub identyfikator próbki ma wartość <code>undetermined</code> (nieokreślony).

Raport dotyczący pierwszych nieznanymi kodów kreskowych

Raport dotyczący pierwszych nieznanymi kodów kreskowych zawiera pierwsze 100 indeksów lub par indeksów na pasmo, które nie zostały rozpoznane w arkuszu próbek odpowiednio do liczby dozwolonych niedopasowań. Jeśli istnieje wiele wartości indeksu zakwalifikowanych jako 100. najwyższa pozycja wg liczby indeksu, wszystkie wartości indeksu o takiej samej liczbie są prezentowane w pliku wyjściowym na 100. pozycji.

Zawarte są następujące informacje:

Pomiar	Opis
Lane (Pasma)	Pasma w komorze przepływowej, w której próbka była sekwencjonowana.
index	Sekwencja każdego nieznanego indeksu w odczycie Read 1 (Odczyt 1) indeksu. To pole jest puste, jeśli nie znaleziono żadnych nieznanymi indeksów.
index2	Sekwencja każdego nieznanego indeksu w odczycie Read 2 (Odczyt 2) indeksu. Jeśli przebieg podlegał pojedynczemu odczytowi lub nie znaleziono nieznanymi indeksów, to pole jest puste.
# Reads (L. odczytów)	Liczba odczytów dla próbki w określonym paśmie.

Raporty kontroli jakości Illumina DRAGEN

W przypadku wszystkich procedur DRAGEN FastQC domyślnie generuje wykresy kontroli jakości. Zbiorcze wyniki kontroli jakości są zapisywane w folderze `AggregatedFastqcMetrics`, a wyniki dla poszczególnych próbek są zapisywane w folderze `<nazwa_próbki>`.

Raporty z kontroli jakości nie są generowane, jeśli liczba próbek jest większa niż 512.

Dostępne są następujące wykresy kontroli jakości.

Wykres kontroli jakości	Opis
adapter_content	Wartość procentowa sekwencji w poszczególnych parach nukleotydów.

Wykres kontroli jakości	Opis
positional_mean_quality	Średni wynik jakościowy na skali Phred dla nukleotydów w ramach poszczególnych pozycji odczytu.
gc_content	Procentowa zawartość GC dla poszczególnych odczytów sekwencjonowania.
positional_quality.read_1	Średnia wartość jakości na skali Phred z konkretnym nukleotydem i przy danej lokalizacji w odczycie Read 1 (Odczyt 1).
gc_quality	
positional_quality.read_2	Średnia wartość jakości na skali Phred z konkretnym nukleotydem i przy danej lokalizacji w odczycie Read 2 (Odczyt 2).
n_content	
read_length	Długość sekwencji dla poszczególnych odczytów.
positional_base_content.read_1	Liczba poszczególnych nukleotydów w konkretnych lokalizacjach w odczycie Read 1 (Odczyt 1).
read_quality	Średni wynik jakościowy na skali Phred dla poszczególnych odczytów sekwencji.
positional_base_content.read_2	Liczba poszczególnych nukleotydów w konkretnych lokalizacjach w odczycie Read 2 (Odczyt 2).

Struktura folderu wyjściowego analizy wtórnej DRAGEN


Domyślnie rozwiązanie DRAGEN generuje pliki wyjściowe w folderze wyjściowym wybranym na karcie Settings (Ustawienia). W przypadku każdej procedury rozwiązanie DRAGEN generuje raport podsumowujący w pliku `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

Pliki wejściowe przebiegu (np. pliki BED, GTF)

nazwa_próbki

enrich_caller, germline_seq, dna_amplicon_seq, rna_seq lub scrna_seq

nazwa_próbki

*.png

dragen_*.log

nazwa_próbki.*.metrics.csv

[DNA] nazwa_próbki.*.vcf.gz

[DNA] nazwa_próbki.*.gvcf.gz – niedostępny w przypadku protokołu DRAGEN Bio-IT Platform Amplicon (linia somatyczna).

nazwa_próbki.*.bam lub nazwa_próbki.*.cram

Logs

[RNA] nazwa_próbki.fusion_candidates.filter_info

[RNA] nazwa_próbki.fusion_candidates.final

[RNA] nazwa_próbki.quant.genes.sf

[RNA] nazwa_próbki.quant.sf

nazwa_próbki.metrics.json

[scRNA] sample_dragen-scrna-report.*.html

[scRNA] nazwa_próbki.scrna.barcodeSummary.tsv

[Germline] nazwa_próbki.roh_metrics.csv

[Germline] nazwa_próbki.roh.bed

[Germline] nazwa_próbki.cyp2d6.tsv

nazwa_próbki.fastqc_metrics.csv

nazwa_próbki.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

logs

- *.txt
- *.csv

fastq – dostępny wyłącznie wówczas, gdy ustawienie KeepFastq ma wartość true (prawda).

- *.fastq.gz

ora_fastq – dostępny wyłącznie wówczas, gdy ustawienie FastqCompressionFormat ma wartość 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** – dostępny wyłącznie w przypadku odczytów przeprowadzanych w trybie sparowanych końców.


 **0001**


 dataset.json


 **0002**

 dataset.json


 Adapter_Metrics.csv

 Demultiplex_Stats.csv

 Index_Hopping_Counts.csv

 **Read1Metrics** – dostępny wyłącznie w przypadku odczytów przeprowadzanych w trybie sparowanych końców.

 Adapter_Metrics.csv


 Index_Hopping_Counts.csv

Konserwacja

W niniejszej części opisano procedury wymagane do utrzymania prawidłowego stanu systemu. Informacje zawarte w tej części ułatwiają naukę instalowania aktualizacji oprogramowania, wymiany filtra powietrza i wykonywania innych okresowych procedur konserwacji. Aktualizowanie oprogramowania sterującego zapewnia, że w systemie dostępne są najnowsze poprawki błędów oraz funkcje zainstalowane w celu zapewnienia optymalnej wydajności.

Zwalnianie miejsca na dysku twardym

Do wykonania sekwencjonowania potrzeba około 200 GB wolnego miejsca na lokalnym dysku twardym. Gdy ilość miejsca na dysku jest mała, pojawia się powiadomienie z ostrzeżeniem. Poniższe czynności umożliwiają zwolnienie miejsca poprzez usunięcie zakończonych przebiegów i zainstalowanych genomów referencyjnych z tymczasowego folderu przebiegów.

 | Przebiegi należy usuwać wyłącznie za pomocą oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000, a nie ręcznie za pośrednictwem systemu operacyjnego. Ręczne usuwanie przebiegów może negatywnie wpływać na oprogramowanie sterujące.

1. W menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Disk Management** (Zarządzanie dyskiem). Pojawi się ekran Disk Management (Zarządzanie dyskiem) z listą przebiegów i genomów referencyjnych zapisanych na lokalnym dysku twardym.
2. Dla przebiegu, który ma zostać usunięty, wybrać opcję **Delete Run** (Usuń przebieg). Usunięcie przebiegu spowoduje usunięcie lokalnego folderu przebiegu. Folder wyjściowy, który jest kopią folderu przebiegu, zostanie zachowany.
3. W oknie dialogowym wybrać opcję **Yes, Delete Run** (Tak, usuń przebieg), aby potwierdzić usunięcie przebiegu.
4. Powtórzyć czynności opisane w krokach 2 i 3 dla każdego przebiegu, który ma zostać usunięty.
5. Dla genomu, który ma zostać usunięty, wybrać opcję **Delete Genome** (Usuń genom).
6. W oknie dialogowym wybrać opcję **Yes, Delete Genome** (Tak, usuń genom).
7. Powtórzyć czynności opisane w krokach 5 i 6 dla każdego genomu, który ma zostać usunięty.
8. Po zakończeniu zamknąć obszar Disk Management (Zarządzanie dyskiem) i wrócić do ekranu głównego.

Aktualizacje oprogramowania

Oprogramowanie należy aktualizować w celu zapewnienia, że w systemie są dostępne najnowsze funkcje i poprawki. Aktualizacje oprogramowania są dostępne w pakietach oprogramowania systemowego zawierających następujące składniki:

- Oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000
- Protokoły NextSeq 1000/2000
- Aplikacja Universal Copy Service
- Oprogramowanie Real-Time Analysis

i | Moduły DRAGEN nie są zawarte w pakiecie oprogramowania systemowego. Należy je instalować osobno w zależności od potrzeb. Dostęp do oprogramowania modułów DRAGEN można uzyskać na stronach pomocy technicznej.

System jest konfigurowany do automatycznego lub ręcznego pobierania aktualizacji oprogramowania:

- **Automatic updates** (Aktualizacje automatyczne) – aktualizacje są automatycznie pobierane z platformy BaseSpace Sequence Hub, a następnie instalowane przez użytkownika. Opcja ta wymaga połączenia z Internetem, ale nie wymaga posiadania konta na platformie BaseSpace Sequence Hub.
- **Manual updates** (Aktualizacje ręczne) – aktualizacje są pobierane ręcznie z sieci, zapisywane lokalnie lub na dysku przenośnym, a następnie instalowane z poziomu lokalizacji, w której zostały zapisane. Opcja ta nie wymaga połączenia aparatu z Internetem.

Instalacja automatycznej aktualizacji oprogramowania

1. Upewnić się, że w aparacie nie są aktualnie przeprowadzane żadne przebiegi sekwencjonowania ani analizy wtórne.
2. Zalogować się do konta ilmnadmin.
3. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Software Update** (Aktualizacja oprogramowania).
Gdy aktualizacja oprogramowania jest dostępna, w systemach, w których skonfigurowano aktualizacje automatyczne, wyświetlane jest powiadomienie.
4. Aby sprawdzić dostępność aktualizacji, wybrać opcję **Check Online for Software Update** (Sprawdź dostępność aktualizacji oprogramowania w trybie online).
5. Wybrać opcję **Update Now** (Zaktualizuj teraz), aby pobrać nową wersję oprogramowania.
Gdy pobieranie się zakończy, oprogramowanie sterujące zostanie zamknięte i pojawi się kreator instalacji.
Oprogramowanie sterujące zostanie automatycznie uruchomione ponownie. Wszelkie aktualizacje oprogramowania sprzętowego przebiegają automatycznie po ponownym uruchomieniu.

i | Po rozpoczęciu instalacji nie ma możliwości anulowania aktualizacji. Aktualizację można anulować wyłącznie podczas pobierania.

Ręczna instalacja aktualizacji oprogramowania

1. Zalogować się do konta ilmnadmin.
2. Upewnić się, że w aparacie nie są aktualnie przeprowadzane żadne przebiegi sekwencjonowania ani analizy wtórne.
3. Gdy dostępna jest aktualizacja oprogramowania, pobrać instalator pakietu (*.tar.gz) ze [strony pomocy technicznej sekwenatorów NextSeq 1000 i NextSeq 2000](#). Zapisać instalator na dysku lokalnym lub przenośnym.
4. W przypadku zapisania instalatora na dysku przenośnym podłączyć ten dysk do portu USB 3.0, który znajduje się z boku oraz z tyłu aparatu.
5. W menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Software Update** (Aktualizacja oprogramowania).
6. Wybrać opcję **Choose...** (Wybierz...) i wyszukać instalator.
7. Wybrać opcję **Update Now** (Aktualizuj teraz), aby rozpocząć instalację.
Podczas instalacji w oprogramowaniu sterującym wyświetlany jest wskaźnik zajętości. Oprogramowanie sterujące zostanie automatycznie uruchomione ponownie. Wszelkie aktualizacje oprogramowania sprzętowego przebiegają automatycznie po ponownym uruchomieniu.

i | Po rozpoczęciu instalacji nie ma możliwości anulowania aktualizacji. Aktualizację można anulować wyłącznie podczas pobierania.

Aktualizacje procedur i licencji DRAGEN

Wyłącznie administratorzy systemu mogą instalować procedury DRAGEN i odnawiać licencję na rozwiązanie DRAGEN.

Odnowienie licencji na rozwiązanie DRAGEN w trybie online

Jeśli system NextSeq 1000/2000 jest podłączony do Internetu, należy zaktualizować licencję na platformę DRAGEN Bio-IT, wykonując poniższe czynności.

1. Skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina, aby uzyskać nowy klucz licencji.
2. Odczekać 24 godziny na automatyczne zaktualizowanie się licencji albo zaktualizować licencję natychmiast, postępując w sposób opisany poniżej.
 - a. Wybrać menu oprogramowania sterującego, a następnie wybrać opcję **DRAGEN**.
 - b. Wybrać opcję **Check Online** (Sprawdź online), aby sprawdzić, czy dostępny jest nowy klucz licencji na rozwiązanie DRAGEN.
 - c. Jeśli jest dostępny, wybrać opcję **Update** (Aktualizuj).

Odnowienie licencji na rozwiązanie DRAGEN w trybie offline

Jeśli system NextSeq 1000/2000 nie jest podłączony do Internetu, należy zaktualizować licencję na platformę DRAGEN Bio-IT, wykonując poniższe czynności.

1. Skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina, aby uzyskać nowy klucz licencji. Zapisać plik `license.zip` na dysku lokalnym lub przenośnym.
2. W przypadku zapisania pliku *.zip na dysku przenośnym podłączyć ten dysk do portu USB 3.0, który znajduje się z boku oraz z tyłu aparatu. W razie potrzeby ostrożnie przesunąć aparat w celu uzyskania dostępu do jego tylnej części.
3. Wybrać menu oprogramowania sterującego, a następnie wybrać opcję **DRAGEN**.
4. Wybrać opcję **Choose** (Wybierz), aby przejść do pliku *.zip, a następnie wybrać opcję **Open** (Otwórz).

Instalowanie procedur DRAGEN w trybie online

Jeśli system NextSeq 1000/2000 jest podłączony do Internetu, można instalować procedury DRAGEN bezpośrednio w oprogramowaniu sterującym NextSeq 1000/2000. Instalowanie procedur DRAGEN w trybie online jest możliwe wyłącznie w przypadku oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000 w wersji 1.3.

1. Wybrać menu oprogramowania sterującego, a następnie wybrać opcję **Process Management** (Zarządzanie procesem).
2. Upewnić się, że w aparacie nie są aktualnie przeprowadzane żadne przebiegi sekwencjonowania ani analizy wtórne.
3. Wybrać menu oprogramowania sterującego, a następnie wybrać opcję **DRAGEN**.
W obszarze Version (Wersja) w sekcji Available Workflows (Dostępne procedury) znajduje się lista procedur aktualnie zainstalowanych w systemie.
4. Aby zainstalować procedury DRAGEN w oprogramowaniu sterującym NextSeq 1000/2000, wybrać opcję **Check Online** (Sprawdź online).
Nie wszystkie wersje oprogramowania DRAGEN i nie wszystkie procedury DRAGEN są zgodne z instalacją w trybie online. W przypadku dodatkowych procedur należy przeprowadzić instalację w trybie offline.
5. Zaznaczyć pole wyboru dla procedur przeznaczonych do zainstalowania. Jeśli procedura BCL Convert nie jest zainstalowana, najpierw należy zainstalować jej najnowszą wersję.
Informacje o najnowszej wersji procedury są dostępne w informacjach o wersji.
6. Wybrać opcję **Install** (Instaluj), aby rozpocząć instalację.
7. Wprowadzić `iladmin` jako hasło systemowe, a następnie wybrać opcję **Authenticate** (Uwierzytelnij).

Instalowanie procedur DRAGEN w trybie offline

1. Gdy dostępna jest aktualizacja procedury DRAGEN, należy pobrać instalator (*.tar.gz) ze [strony pomocy technicznej DRAGEN](#). Zapisać instalator na dysku lokalnym lub przenośnym.
2. W przypadku zapisania instalatora na dysku przenośnym podłączyć ten dysk do portu USB 3.0, który znajduje się z boku oraz z tyłu aparatu. W razie potrzeby ostrożnie przesunąć aparat w celu uzyskania dostępu do jego tylnej części.
3. Wybrać menu oprogramowania sterującego, a następnie wybrać opcję **Process Management** (Zarządzanie procesem).
4. Upewnić się, że w aparacie nie są aktualnie przeprowadzane żadne przebiegi sekwencjonowania ani analizy wtórne.
5. Wybrać menu oprogramowania sterującego, a następnie wybrać opcję **DRAGEN**.
6. W obszarze Version (Wersja) wybrać opcję **Browse for New Version** (Wyszukaj nową wersję), aby przejść do instalatora.
7. Wybrać opcję **Install** (Instaluj), aby rozpocząć instalację.
8. Wprowadzić ilmnadmin jako hasło systemowe, a następnie wybrać opcję **Authenticate** (Uwierzytelnij).

Wymiana filtra powietrza

W celu wymiany zużytego filtra powietrza co 6 miesięcy należy postępować zgodnie z poniższymi instrukcjami.

Filtr powietrza jest prostokątną kasetą jednorazowego użytku, która osłania wentylator z prawej strony aparatu. Zapewnia on poprawne chłodzenie i uniemożliwia wnikanie zanieczyszczeń do systemu. Aparat jest dostarczany z jednym zainstalowanym i jednym zapasowym filtrem powietrza. Posiadacze ważnej umowy serwisowej na aparat otrzymują filtry zapasowe. Można je również kupić w firmie Illumina.

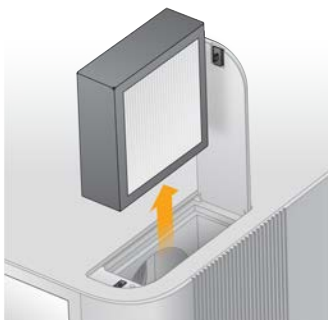
1. W górnej części aparatu nacisnąć prawą stronę panelu górnego w sposób przedstawiony na poniższej ilustracji w celu zwolnienia panelu.



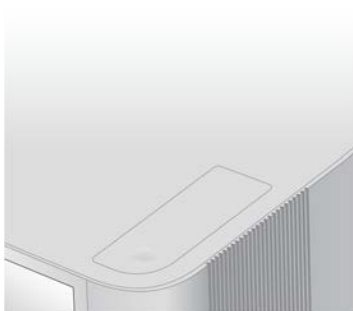
2. Otworzyć panel.



3. Nacisnąć, aby zwolnić kasetę filtra powietrza, wyjąć ją ze środkowej części panelu i wyrzucić.



4. Umieścić nowy filtr powietrza w gnieździe, a następnie docisnąć go w celu zabezpieczenia.
5. Zamknąć panel górny i nacisnąć, aby zablokować go na miejscu.



6. Ustawić aparat we wcześniejszym miejscu.

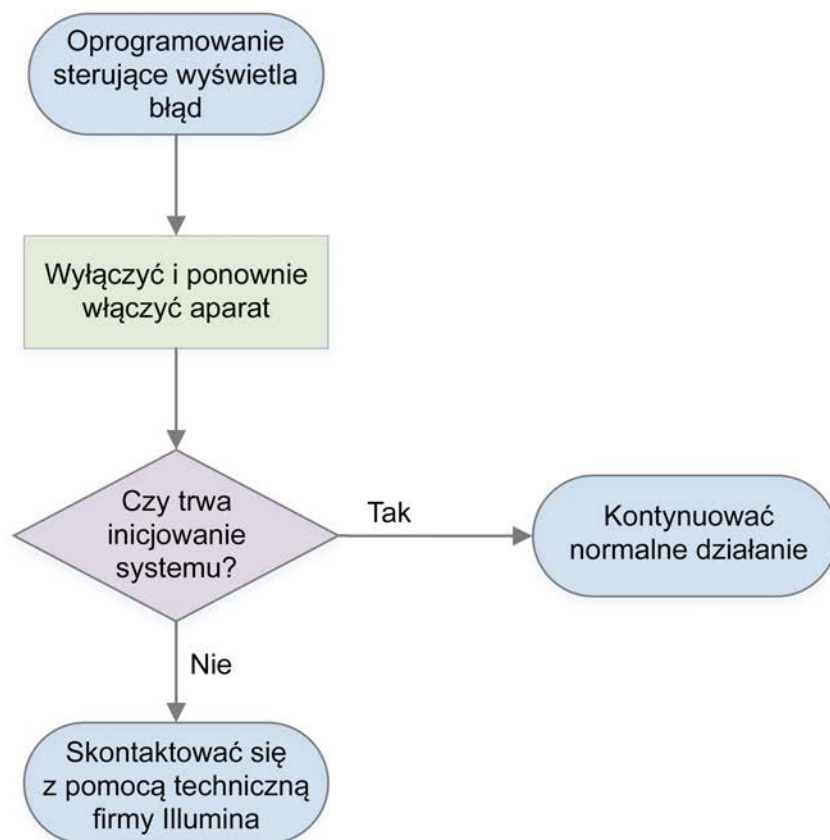
Rozwiązywanie problemów

Niniejszy rozdział zawiera instrukcje krok po kroku dotyczące anulowania przebiegu, wyłączenia i włączania zasilania aparatu oraz inne procedury rozwiązywania problemów.

Usuwanie komunikatów o błędach


Niniejszy dodatek zawiera szczegółowe instrukcje dotyczące wykonywania różnych czynności w ramach rozwiązywania problemów. Poniższy schemat przedstawia przegląd czynności wykonywanych w celu usunięcia komunikatów o błędach, które pojawiły się podczas inicjowania aparatu, konfigurowania przebiegu lub sekwencjonowania, a których nie udało się usunąć przez ponowienie danej operacji.

Wiele błędów można rozwiązać przez wyłączenie i ponowne włączenie aparatu. Więcej informacji na temat tej operacji zawiera część [Wyłączenie i ponowne włączenie aparatu na stronie 89](#).



Ponowne umieszczanie materiałów eksploatacyjnych w miejscu przechowywania

Poniższe instrukcje umożliwiają przechowywanie rozmrożonej kasety i komory przepływowej w przypadku błędu aparatu podczas wstępnych testów kontrolnych poprzedzających testy układu przepływowego.

1. Oddzielić komorę przepływową od kasety.
 2. Usunąć rozcieńczoną bibliotekę ze zbiornika (maksymalnie około 18 µl) i wyrzucić.
-  Przygotować świeże rozcieńczenie tej samej biblioteki dla następnego przebiegu, aby uniknąć zanieczyszczenia próbki biblioteką, która pozostała w zbiorniku.
3. Ustawić kasetę w miejscu przechowywania w temperaturze od 2°C do 8°C w taki sposób, aby etykieta była skierowana do góry, a powietrze mogło owiewać wszystkie jej boki.
Nie przekraczać 72 godzin. Jeśli kasetą była rozmrażana w lodówce przez 12 godzin przez noc, nie należy przekraczać 60 godzin.
 4. Umieścić komorę przepływową z powrotem w oryginalnej srebrnej torebce foliowej ze środkiem osuszającym.
 5. Zamknąć opakowanie foliowe, zaklejając je taśmą, i umieścić w miejscu przechowywania w temperaturze od 2°C do 8°C.
Nie przekraczać 72 godzin.

Anulowanie przebiegu

1. Wybrać opcję **End Run** (Zakończ przebieg).
2. Aby automatycznie wyczyścić kasetę odczynników, zaznaczyć pole wyboru **Purge Reagent Cartridge** (Wyczyść kasetę odczynników).
Wybór domyślny jest skonfigurowany w ustawieniach oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000.
3. Wybrać opcję **Yes, end the sequencing run** (Tak, zakończ sekwencjonowanie).
Anulowanie jest ostateczne. Oprogramowanie nie może wznowić przebiegu, a po przeprowadzeniu kontroli aparatu w ramach wstępnych testów kontrolnych nie można ponownie użyć materiałów eksploatacyjnych.
4. Wybrać opcję **Eject Cartridge** (Wysuń kasetę), aby otworzyć osłonę i wysunąć tace.
5. Wyjąć kasetę z tacy.

6. Umieścić w miejscu przechowywania lub zutylizować kasetę, w zależności od tego, kiedy nastąpiło anulowanie:

Sytuacja	Informacje
Anulowano przed wstępnym testem kontrolnym w aparacie albo podczas tego testu i planowane jest ponowne użycie materiałów eksploatacyjnych.	Patrz: Ponowne umieszczanie materiałów eksploatacyjnych w miejscu przechowywania na stronie 87 .
We wszystkich pozostałych sytuacjach.	Patrz: Wyładowywanie materiałów eksploatacyjnych na stronie 56 .

7. Wybrać opcję **Close Door** (Zamknij drzwiczki), aby ponownie załadować tacę i wrócić do ekranu głównego.
Czujniki potwierdzą wyjęcie kasety.

Ponowne umieszczanie przebiegu w kolejce

Jeśli w obszarze Process Management (Zarządzanie procesem) pojawi się błąd dotyczący Status of Secondary Analysis (Status analizy wtórnej), wówczas można ponownie umieścić przebieg w kolejce, aby powtórzyć analizę DRAGEN w urządzeniu z wykorzystaniem wygenerowanych plików cBCL. Oryginalny folder przebiegu musi być nadal dostępny w urządzeniu na potrzeby funkcji ponownego umieszczania w kolejce. Korzystanie z funkcji ponownego umieszczania w kolejce nie powoduje ponownego umieszczenia przebiegów w kolejce na platformie BaseSpace Sequence Hub. W celu ponownego umieszczenia przebiegów w kolejce na platformie BaseSpace Sequence Hub należy się zapoznać z tematem Fix Sample Sheet (Naprawa arkusza próbek) w centrum pomocy dla platformy BaseSpace Sequence Hub.

1. Zaktualizować arkusz próbek v2, a następnie zapisać arkusz próbek na przenośnym lub zainstalowanym dysku sieciowym.
2. W przypadku zapisania arkusza próbek na dysku przenośnym podłączyć ten dysk do portu USB 3.0, który znajduje się z boku oraz z tyłu aparatu. W razie potrzeby ostrożnie przesunąć aparat w celu uzyskania dostępu do jego tylnej części.
3. Wybrać menu oprogramowania sterującego, a następnie wybrać opcję **Process Management** (Zarządzanie procesem).
4. Upewnić się, że w aparacie nie są aktualnie przeprowadzane żadne przebiegi sekwencjonowania ani analizy wtórne.
5. Wybrać opcję **Requeue** (Ponownie umieść w kolejce) obok zakończonego przebiegu, który ma zostać ponownie umieszczony w kolejce.
6. Wybrać opcję **Choose** (Wybierz), aby przejść do zaktualizowanego arkusza próbek, a następnie wybrać opcję **Open** (Otwórz).
7. Wybrać opcję **Start Requeue** (Rozpocznij ponowne umieszczanie w kolejce).

Wyłączenie i ponowne włączenie aparatu

Wyłączenie i ponowne włączenie zasilania aparatu pozwala w bezpieczny sposób wyłączyć i ponownie uruchomić system w celu przywrócenia utraconego połączenia, dopasowania specyfikacji lub rozwiązania problemu związanego z niepowodzeniem inicjalizacji. Komunikaty wyświetlane w oprogramowaniu wskazują, kiedy należy wyłączyć i ponownie włączyć zasilanie w celu usunięcia błędu lub ostrzeżenia.

1. Z menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **Shut Down Instrument** (Wyłącz aparat).
2. Jeśli system się nie wyłączy, przytrzymać przycisk zasilania po prawej stronie aparatu do momentu, aż kontrolki zgasną.
3. Gdy przycisk zasilania zacznie migać, wcisnąć przełącznik zasilania na panelu tylnym po stronie oznaczenia (O).
Przycisk zasilania może po wyłączeniu zasilania nadal migać.

Rysunek 8 Lokalizacja przełącznika



4. Odczekać 30 sekund.
5. Nacisnąć przełącznik zasilania po stronie oznaczenia (I).
6. Gdy przycisk zasilania zacznie migać, odczekać 30 sekund i nacisnąć go.

Rysunek 9 Lokalizacja przycisku zasilania



7. Poczekać około 5 minut na załadowanie systemu operacyjnego. Po załadowaniu systemu operacyjnego zalogować się do systemu.
Oprogramowanie sterujące zostanie uruchomione i zainicjalizuje pracę systemu. Poczekać około 5 minut na zainicjowanie systemu. Po zakończeniu inicjalizacji pojawi się ekran główny.

Przeprowadzanie kontroli systemu

Kontrola systemu nie jest wymagana podczas standardowej obsługi ani w celu przeprowadzenia konserwacji aparatu. W celu rozwiązania problemu przedstawiciel działu pomocy technicznej firmy Illumina może jednak poprosić o wykonanie kontroli systemu.

Cztery kontrole podsystemów zajmują około 58 minut w celu usunięcia błędów wstępnego testu kontrolnego i innych problemów. Te testy potwierdzają, czy komponenty są poprawnie wyrównane i funkcjonalne.

Wyniki testów są przesyłane do folderu `system-check`, który znajduje się w lokalizacji o ścieżce `/usr/local/illumina/system-check`.

Przed wykonaniem testów kontroli systemu należy wyłączyć kasetę.

Przeprowadzanie kontroli systemu

1. W menu oprogramowania sterującego wybrać opcję **System Checks** (Kontrole systemu).
2. Zaznaczyć pole wyboru dla dowolnej z poniższych kontroli systemu, które mają zostać przeprowadzone.
 - **Network Connectivity** (Łączność sieciowa) – sprawdza stan i wydajność połączenia sieciowego.
 - **Enclosure** (Obudowa) – sprawdza wydajność systemu termicznego i mechanizm podnoszenia osłony.
 - **Motion** (Ruch) – sprawdza limity przesuwu oraz działanie stolika Z i stolika XY.
 - **Optics** (Optyka) – sprawdza wydajność modułu obrazowania.
3. Wybrać opcję **Start** (Uruchom).

Przywracanie ustawień fabrycznych

Przywracanie fabrycznych ustawień domyślnych systemu przeprowadza się w celu zmiany wersji oprogramowania na niższą lub cofnięcia niepożądaną konfiguracji. Ta funkcja powinna być używana wyłącznie przez przedstawiciela firmy Illumina.

Przechwytywanie obrazu instalacji

Aby utworzyć kopię zapasową poprawnie działającej instalacji oprogramowania, należy przechwycić obraz systemu. Ten obraz systemu można przywrócić w późniejszym terminie. Zalecane jest przechwycenie obrazu systemu natychmiast po zakończeniu instalacji wstępnej i zmianie hasła z pomocą przedstawiciela firmy Illumina.

1. Uruchomić ponownie system Linux.
2. Gdy pojawi się monit o wybór systemu operacyjnego, wybrać opcję **Capture Installed Image** (Przechwyć obraz instalacji).

Na ekranie na krótko pojawią się opcje systemów operacyjnych, po czym procedura będzie automatycznie kontynuowana z wykorzystaniem oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000.



Ponieważ w pamięci zachowany jest tylko jeden obraz, spowoduje to nadpisanie poprzednio przechwyconego obrazu.

3. Odczekać około 30 minut. W tym czasie system przechwyci obraz aktualnej instalacji. Proces przechwytywania może obejmować kilka cykli ponownego uruchamiania. Po zakończeniu system uruchomi się ponownie z obrazem aktualnej instalacji zapisanym w pamięci.

Przywracanie przechwyconego obrazu

W celu odzyskania systemu w przypadku niepożądanego konfiguracyjnego można przywrócić stan systemu z poprzednio przechwyconego obrazu.

1. Uruchomić ponownie system Linux.
2. Gdy pojawi się monit o wybór systemu operacyjnego, wybrać opcję **Restore Installed Image** (Przywróć obraz instalacji).

Na ekranie na krótko pojawią się opcje systemów operacyjnych, po czym procedura będzie automatycznie kontynuowana z wykorzystaniem oprogramowania sterującego NextSeq 1000/2000.



Hasła są powiązane z obrazem systemu. Aby po przywróceniu zalogować się do systemu, należy użyć hasła obowiązującego dla przywróconego obrazu.

3. Poczekać około 30 minut do zakończenia procesu przywracania. Proces przywracania może obejmować kilka cykli ponownego uruchamiania. Po zakończeniu system uruchomi się ponownie z przywróconym obrazem.

Źródła i referencje

Ustawienia arkusza próbek v2

Jeśli realizowany jest tryb lokalny, w celu skonfigurowania ustawień przebiegu można użyć arkusza próbek w formacie pliku v2. Arkusz próbek należy utworzyć za pomocą narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie), edytując *szablon v2 arkusza próbek w sekwenatorach NextSeq 1000 i NextSeq 2000*. W przypadku edycji arkusza próbek należy się upewnić, że poniższe sekcje i pola są uwzględnione w podanej kolejności i spełniają wymagania. Po edycji należy użyć przenośnego lub zainstalowanego dysku sieciowego, aby przenieść arkusz próbek do sekwenatora NextSeq 1000 lub NextSeq 2000. W przypadku nawigacji do arkusza próbek w oprogramowaniu sterującym arkusz ten jest kopiowany do folderu danych gromadzonych przed przebiegiem w aparacie, dzięki czemu urządzenie przenośne może zostać odłączone.

Należy się upewnić, że ustawienia arkusza próbek v2 spełniają poniższe wymagania:

- Sekwencje indeksu określone w sekcji BCLConvert_Data arkusza próbek powinny być zgodne z zestawem do indeksowania wybranym w oprogramowaniu NextSeq 1000/2000.
- Jeśli używane jest oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 w wersji 1.2, wówczas wersja rozwiązania DRAGEN określona w arkuszu próbek musi być zainstalowana i aktywna w systemie. Informacje o instalacji zawiera część [Aktualizacje oprogramowania na stronie 81](#).
- Jeśli używane jest oprogramowanie sterujące NextSeq 1000/2000 w wersji 1.3, wówczas wersja rozwiązania DRAGEN określona w arkuszu próbek musi być zainstalowana w systemie. Oprogramowanie sterujące automatycznie wykrywa wersję rozwiązania DRAGEN z arkusza próbek i w razie potrzeby wyświetlany jest monit o zmianę aktywnej wersji. Informacje o instalacji zawiera część [Aktualizacje oprogramowania na stronie 81](#).

W przypadku używania rozwiązania DRAGEN konieczne jest skonfigurowanie dodatkowych ustawień. Więcej informacji zawiera część [Ustawienia arkusza próbek DRAGEN na stronie 96](#)

Szablon v2 arkusza próbek należy pobrać z obszaru Product Files (Pliki produktu) na stronie pomocy dla sekwenatorów NextSeq 1000 i NextSeq 2000. Jeśli arkusz próbek utworzono za pomocą narzędzia Instrument Run Setup (Konfiguracja przebiegu w aparacie), wówczas modyfikacja arkusza próbek po początkowym pobraniu może spowodować niepowodzenie analizy.

Nazwy plików nie mogą zawierać znaków specjalnych.

Wymagania dotyczące sekcji [Header]

Sekcja [Header] zawiera ogólne informacje dotyczące przebiegu. Poniżej widoczne są dostępne pola sekcji [Header] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
FileFormatVersion	Tak	Wersja arkusza próbek. Jako wartość należy wprowadzić 2.
RunName	Nie	Niepowtarzalna nazwa przebiegu zgodna z preferencjami użytkownika. Pole RunName może zawierać znaki alfanumeryczne, podkreślenia, kreski i kropki. Jeśli pole RunName zawiera spacje lub znaki specjalne, analiza kończy się niepowodzeniem.
RunDescription	Nie	Opis przebiegu.
InstrumentPlatform	Nie	NextSeq 1000/2000
InstrumentType	Nie	NextSeq 1000/2000

Wymagania dotyczące sekcji [Reads]

Sekcja [Reads] zawiera opis liczby cykli sekwencjonowania używanych do odczytu 1 i 2 genomu oraz indeksu. Poniżej widoczne są dostępne pola sekcji [Reads] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
Read1Cycles	Tak	Liczba cykli w pierwszym odczycie. Wartość musi być liczbą całkowitą większą od zera.
Read2Cycles	Nie	Liczba cykli w drugim odczycie.
Index1Cycles	Nie	Liczba cykli w pierwszym odczycie indeksu. Wymagane w przypadku sekwencjonowania więcej niż jednej próbki. Maksymalnie 10 cykli.
Index2Cycles	Nie	Liczba cykli w drugim odczycie indeksu. Maksymalnie 10 cykli.

Wymagania dotyczące sekcji [Sequencing_Settings]

Sekcja [Sequencing_Settings] służy do określania używanego zestawu do przygotowania biblioteki.

Pole	Wymagane	Opis
LibraryPrepKits	Nie	<p>Używany zestaw do przygotowania biblioteki. Dozwolony jest tylko jeden zestaw do przygotowania biblioteki.</p> <p>W oprogramowaniu sterującym NextSeq 1000/2000 w wersji 1.3 wymagany protokół niestandardowy jest wybierany automatycznie, jeśli jako zestaw do przygotowania biblioteki wybrano Illumina Stranded Total RNA Prep z Ribo-Zero Plus albo Illumina Stranded mRNA Prep.</p> <p>Wprowadzić jedną z poniższych wartości:</p> <ul style="list-style-type: none"> w przypadku zestawu Illumina Stranded Total RNA Prep z Ribo-Zero Plus – <code>ILMNStrandedTotalRNA</code> w przypadku zestawu Illumina Stranded mRNA Prep – <code>ILMNStrandedmRNA</code>

Wymagania dotyczące sekcji BCL Convert

Sekcje BCL Convert zawierają informacje o konwersji danych z formatu BCL do FASTQ. Opcje BCL Convert obejmują dwie osobne sekcje: [BCLConvert_Settings] i [BCLConvert_Data]. Sekcje BCL Convert wymagają informacji dotyczących sekwencji adaptera indeksu. W celu zidentyfikowania zgodnej sekwencji adaptera dla każdego odczytu i indeksu należy się zapoznać z dokumentem *Sekwencje adaptera firmy Illumina (nr dokumentu: 1000000002694)*.

Poniżej widoczne są dostępne pola sekcji [BCLConvert_Settings] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
SoftwareVersion	Tak	<p>Wersja oprogramowania DRAGEN aktualnie zainstalowana w systemie. Należy użyć wszystkich trzech liczb całkowitych, które zawiera nazwa wersji. Na przykład 3.5.7.</p>
BarcodeMismatchesIndex1	Nie	<p>Liczba dozwolonych niedopasowań między pierwszym odczytem indeksu a sekwencją indeksu. Wartością może być 0, 1 lub 2. Wartością domyślną jest 1.</p>

Pole	Wymagane	Opis
BarcodeMismatchesIndex2	Nie	Liczba dozwolonych niedopasowań między drugim odczytem indeksu a sekwencją indeksu. Wartością może być 0, 1 lub 2. Wartością domyślną jest 1.
FastqCompressionFormat	Nie	W celu generowania plików FASTQ jako pliku *.gz wprowadzić wartość <code>gzip</code> . W celu zapisu plików FASTQ jako pliku *.ora i użycia dekompresji DRAGEN wprowadzić wartość <code>dragen</code> .
AdapterRead1	Nie	Sekwencja do przycięcia lub zamaskowania od końca odczytu 1. Sekwencja adaptera odczytu 1 zawierająca zasadę azotową A, C, G lub T. AdapterRead1 domyślnie przycina cykle.
AdapterRead2	Nie	Sekwencja do przycięcia lub zamaskowania od końca odczytu 2. Sekwencja adaptera odczytu 2 zawierająca zasadę azotową A, C, G lub T. AdapterRead2 domyślnie przycina cykle.
OverrideCycles	Nie	Ciąg używany do określania cykli UMI i cykli maskowania w ramach odczytu. Dozwolone są następujące wartości: <ul style="list-style-type: none"> • N – określa cykle do zignorowania. • Y – określa cykle sekwencjonowania. • I – określa cykle indeksowania. • U – określa cykle UMI do przycięcia. Poszczególne elementy są oddzielone średnikami. Poniżej przedstawiono przykładowe dane wejściowe dla pola <code>OverrideCycles</code> . <code>U8Y143;I8;I8;U8Y143</code> <code>N10Y66;I6;N10Y66</code>

Poniżej widoczne są dostępne pola sekcji [BCLConvert_Data] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
Sample_ID	Tak	Identyfikator próbki. Identyfikator próbki może zawierać maksymalnie 20 znaków alfanumerycznych, łączników i znaków podkreślenia. W identyfikatorze rozróżniana jest wielkość liter. Poszczególne identyfikatory należy rozdzielać kreskami lub znakami podkreślenia. Na przykład Sample1-DQB1-022515.
Index (Indeks)	Nie	Sekwencja indeksu powiązana z próbką. Dozwolone są wyłącznie wartości A, C, T, G. Wymagane w przypadku sekwencjonowania więcej niż jednej próbki.
Index2	Nie	Druga sekwencja indeksu powiązana z próbką. Dozwolone są wyłącznie wartości A, C, T, G. Upewnić się, że sekwencje adaptera drugiego indeksowania (i5) mają orientację do przodu. Podczas analizy wtórnej rozwiązanie DRAGEN automatycznie zapewnia odwrotną komplementarność indeksów i5.
Lane (Pasma)	Nie	Pasma komory przepływowej. Pasma są reprezentowane przez jedną wartość całkowitą.

Ustawienia arkusza próbek DRAGEN

W niniejszej części opisano wymagania dotyczące arkusza próbek w przypadku każdej procedury DRAGEN. Ustawienia procedury DRAGEN należy dodać jako ostatnią sekcję arkusza próbek. Można używać wyłącznie jednej procedury DRAGEN.

Każda procedura DRAGEN zawiera kilka sekcji na ustawienia i dane.

Wymagania dotyczące procedury DRAGEN Germline

Poniżej widoczne są dostępne pola [DragenGermline_Settings] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
SoftwareVersion	Tak	Wersja oprogramowania DRAGEN aktualnie zainstalowana w systemie. Należy użyć wszystkich trzech liczb całkowitych, które zawiera nazwa wersji. Na przykład 3.5.7. Wersja oprogramowania musi być zgodna z wersją określoną w sekcji BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Tak	Nazwa genomu referencyjnego. Na przykład hg19_alt_aware. Należy użyć nazwy genomu referencyjnego, który jest zapisany w lokalizacji o następującej ścieżce: <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Informacje o korzystaniu z niestandardowego genomu referencyjnego zawiera <i>Pomoc online aplikacji Reference Builder for Illumina Instruments w wersji 1.0.0</i> .
MapAlignOutFormat	Nie	Formatowanie pliku wyjściowego. Wartości dozwolone to bam lub cram. Jeśli nie zostanie podana żadna wartość, ustawieniem domyślnym będzie none (brak).
KeepFastq	Nie	Aby zapisywać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>true</code> (prawda). Aby usuwać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>false</code> (fałsz).

Poniżej widoczne są dostępne pola [DragenGermline_Data] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
Sample_ID	Tak	Identyfikator próbki. Identyfikator próbki może zawierać maksymalnie 20 znaków alfanumerycznych. W identyfikatorze rozróżniana jest wielkość liter. Poszczególne identyfikatory należy rozdzielać kreskami. Na przykład Sample1-DQB1-022515. Identyfikatory próbek muszą być zgodne z identyfikatorami określonymi w sekcji BCLConvert_Data.

Wymagania dotyczące procedury DRAGEN RNA

Poniżej widoczne są dostępne pola [DragenRNA_Settings] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
SoftwareVersion	Tak	Wersja oprogramowania DRAGEN aktualnie zainstalowana w systemie. Należy użyć wszystkich trzech liczb całkowitych, które zawiera nazwa wersji. Na przykład 3.5.7. Wersja oprogramowania musi być zgodna z wersją określoną w sekcji BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Tak	Nazwa genomu referencyjnego. Na przykład hg38_noalt_with_decoy. Należy użyć nazwy genomu referencyjnego, który jest zapisany w lokalizacji o następującej ścieżce: <code>/usr/local/illumina/genomes</code> . Informacje o korzystaniu z niestandardowego genomu referencyjnego zawiera <i>Pomoc online aplikacji Reference Builder for Illumina Instruments w wersji 1.0.0</i> .
RnaGeneAnnotationFile	Nie	Plik zawierający adnotacje genów RNA. Dozwolone są tylko znaki alfanumeryczne. Jeśli nazwa nie zostanie podana, będzie używany domyślny plik adnotacji zawarty w określonym genomie referencyjnym.

Pole	Wymagane	Opis
MapAlignOutFormat	Nie	Formatowanie pliku wyjściowego. Wartości dozwolone to bam lub cram. Jeśli nie zostanie podana żadna wartość, ustawieniem domyślnym będzie none (brak).
KeepFastq	Nie	Aby zapisywać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>true</code> (prawda). Aby usuwać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>false</code> (fałsz).
DifferentialExpressionEnable	Nie	Aby włączyć różnicową ekspresję genów, wprowadzić wartość <code>true</code> (prawda). W celu wykluczenia różnicowej ekspresji genów z analizy wprowadzić wartość <code>false</code> (fałsz).

Poniżej widoczne są dostępne pola [DragenRna_Data] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
Sample_ID	Tak	Identyfikator próbki. Identyfikator próbki może zawierać maksymalnie 20 znaków alfanumerycznych. W identyfikatorze rozróżniana jest wielkość liter. Poszczególne identyfikatory należy rozdzielać kreskami. Na przykład Sample1-DQB1-022515. Identyfikatory próbek muszą być zgodne z identyfikatorami określonymi w sekcji BCLConvert_Data.
Comparison<N>	Nie	Wartość kontrolna lub porównawcza dla każdej próbki. Jeśli dla konkretnej próbki nie ma wartości kontrolnej ani porównawczej, do takiej próbki przypisana jest wartość <code>na</code> (nd.). Wszystkie próbki oznaczone jako kontrolne są porównywane ze wszystkimi próbkami oznaczonymi jako porównawcze. Wartość <code>N</code> odzwierciedla grupę porównawczą próbek.

Wymagania dotyczące procedury DRAGEN Enrichment

Poniżej widoczne są dostępne pola [DragenEnrichment_Settings] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
SoftwareVersion	Tak	Wersja oprogramowania DRAGEN aktualnie zainstalowana w systemie. Należy użyć wszystkich trzech liczb całkowitych, które zawiera nazwa wersji. Na przykład 3.5.7. Wersja oprogramowania musi być zgodna z wersją określoną w sekcji BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Tak	Nazwa genomu referencyjnego. Na przykład hg38_alt_aware. Genomy referencyjne znajdują się w lokalizacji o następującej ścieżce: /usr/local/illumina/genomes. Informacje o korzystaniu z niestandardowego genomu referencyjnego zawiera <i>Pomoc online aplikacji Reference Builder for Illumina Instruments w wersji 1.0.0</i> .
BedFile	Tak	Plik bed zawierający regiony docelowe.
GermlineOrSomatic	Tak	Aby wykonać analizę Enrichment linii zarodkowej, wprowadzić wartość <code>germline</code> (linia zarodkowa). Aby wykonać analizę Enrichment linii somatycznej, należy wprowadzić wartość <code>somatic</code> (linia somatyczna).
KeepFastq	Nie	Aby zapisywać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>true</code> (prawda). Aby usuwać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>false</code> (fałsz).
MapAlignOutFormat	Nie	Formatowanie pliku wyjściowego. Wartości dozwolone to bam lub cram. Jeśli nie zostanie podana żadna wartość, ustawieniem domyślnym będzie none (brak).

Pole	Wymagane	Opis
AuxNoiseBaselineFile	Nie	Nazwa pliku szumu bazowego. Można używać formatu pliku *.txt lub *.gz. Pliki szumu bazowego są dostępne wyłącznie wówczas, gdy używany jest tryb linii somatycznej. Więcej informacji zawiera część Importowanie plików szumu bazowego na stronie 19 .

Poniżej widoczne są dostępne pola [DragenEnrichment_Data] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
Sample_ID	Tak	Identyfikator próbki. Identyfikator próbki może zawierać maksymalnie 20 znaków alfanumerycznych. W identyfikatorze rozróżniana jest wielkość liter. Poszczególne identyfikatory należy rozdzielać kreskami. Na przykład Sample1-DQB1-022515. Identyfikatory próbek muszą być zgodne z identyfikatorami określonymi w sekcji BCLConvert_Data.

Wymagania dotyczące procedury DRAGEN DNA Amplicon

Poniżej widoczne są dostępne pola [DragenAmplicon_Settings] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
SoftwareVersion	Tak	Wersja oprogramowania DRAGEN aktualnie zainstalowana w systemie. Należy użyć wszystkich trzech liczb całkowitych, które zawiera nazwa wersji. Na przykład 3.5.7. Wersja oprogramowania musi być zgodna z wersją określoną w sekcji BCLConvert_Settings.

Pole	Wymagane	Opis
ReferenceGenomeDir	Tak	Nazwa genomu referencyjnego. Na przykład hg38_alt_aware. Genomy referencyjne znajdują się w lokalizacji o następującej ścieżce: /usr/local/illumina/genomes. Informacje o korzystaniu z niestandardowego genomu referencyjnego zawiera <i>Pomoc online aplikacji Reference Builder for Illumina Instruments w wersji 1.0.0.</i>
DnaBedFile	Tak	Plik bed zawierający regiony docelowe. Plik bed można wprowadzić w formacie pliku *.txt lub *.gz.
DnaGermlineOrSomatic	Tak	Aby wykonać analizę DNA Amplicon linii zarodkowej, wprowadzić wartość <code>germline</code> (linia zarodkowa). Aby wykonać analizę DNA Amplicon linii somatycznej, wprowadzić wartość <code>somatic</code> (linia somatyczna).
KeepFastq	Nie	Aby zapisywać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>true</code> (prawda). Aby usuwać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>false</code> (fałsz).
MapAlignOutFormat	Nie	Formatowanie pliku wyjściowego. Wartości dozwolone to bam lub cram. Jeśli nie zostanie podana żadna wartość, ustawieniem domyślnym będzie none (brak).

Poniżej widoczne są dostępne pola [DragenAmplicon_Data] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
Sample_ID	Tak	Identyfikator próbki. Identyfikator próbki może zawierać maksymalnie 20 znaków alfanumerycznych. W identyfikatorze rozróżniana jest wielkość liter. Poszczególne identyfikatory należy rozdzielać kreskami. Na przykład Sample1-DQB1-022515. Identyfikatory próbek muszą być zgodne z identyfikatorami określonymi w sekcji BCLConvert_Data.

Pole	Wymagane	Opis
DnaOrRna	Tak	Typ analizy Amplicon do wykonania. W przypadku oprogramowania DRAGEN w wer. 3.8 obsługiwana jest tylko analiza DNA. Wprowadzić wartość dna.

Wymagania dotyczące procedury DRAGEN Single Cell RNA

Poniżej widoczne są dostępne pola [DragenSingleCellRNA_Settings] i ich opisy. Informacje na temat zgodności zestawów innych firm zawiera strona pomocy dotycząca zgodności produktów z platformą DRAGEN Bio-IT.

Zestawy Single Cell Library Kit 1–5

Poniższe ustawienia arkusza próbek mają zastosowanie do zestawów do przygotowania biblioteki o takiej samej strukturze genetycznej, co zestawy DRAGEN Single Cell Library Kit 1–5. Aby sprawdzić strukturę genetyczną konkretnego zestawu, należy skorzystać ze strony pomocy dotyczącej zgodności produktów z platformą DRAGEN Bio-IT.

Pole	Wymagane	Opis
SoftwareVersion	Tak	Wersja oprogramowania DRAGEN aktualnie zainstalowana w systemie. Należy użyć wszystkich trzech liczb całkowitych, które zawiera nazwa wersji. Na przykład 3.5.7. Wersja oprogramowania musi być zgodna z wersją określoną w sekcji BCLConvert_Settings.
ReferenceGenomeDir	Tak	Nazwa genomu referencyjnego. Na przykład hg38_alt_aware. Genomy referencyjne znajdują się w lokalizacji o następującej ścieżce: /usr/local/illumina/genomes. Informacje o korzystaniu z niestandardowego genomu referencyjnego zawiera <i>Pomoc online aplikacji Reference Builder for Illumina Instruments w wersji 1.0.0</i> .
RnaLibraryType	Nie	Wprowadzić jedną z poniższych wartości: <ul style="list-style-type: none"> SF – nić do przodu. SF jest wartością domyślną. SR – nić do tyłu. U – brak nici.

Pole	Wymagane	Opis
RnaGeneAnnotationFile	Nie	Plik zawierający adnotacje genów RNA. Dozwolone są tylko znaki alfanumeryczne. Jeśli nazwa nie zostanie podana, będzie używany domyślny plik adnotacji zawarty w określonym genomie referencyjnym.
BarcodeRead	Nie	Lokalizacja w sekwencjonowaniu odczytu kodu kreskowego, która zawiera kod kreskowy i UMI. Wartości mogą zawierać <code>Read1</code> lub <code>Read2</code> . Wartością domyślną jest <code>Read1</code> .
BarcodePosition	Tak	Lokalizacja nukleotydów odpowiadająca kodowi kreskowemu w zakresie wartości wprowadzonej jako <code>BarcodeRead</code> . Pozycje nukleotydów są indeksowane, począwszy od pozycji zerowej. Wartość <code>BarcodePosition</code> należy wprowadzić w następującym formacie: <code>0_<pozycja końcowa kodu kreskowego></code> Jeśli na przykład kod kreskowy zawiera 16 nukleotydów, wówczas wartością jest <code>0_15</code> .
UmiPosition	Tak	Lokalizacja nukleotydów odpowiadająca UMI w zakresie wartości wprowadzonej jako <code>BarcodeRead</code> . Wartość <code>UmiPosition</code> należy wprowadzić w następującym formacie: <code><pozycja początkowa UMI>_<pozycja końcowa UMI></code> Jeśli na przykład UMI zawiera 10 nukleotydów, a kod kreskowy zawiera 16, wartością jest <code>16_25</code> .
BarcodeSequenceWhitelist	Nie	Nazwa pliku zawierającego sekwencje kodu kreskowego do uwzględnienia. Nazwa pliku może zawierać wyłącznie znaki alfanumeryczne, kreski, podkreślenia i kropki.
KeepFastq	Nie	Aby zapisywać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>true</code> (prawda). Aby usuwać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>false</code> (fałsz).

Pole	Wymagane	Opis
MapAlignOutFormat	Nie	Formatowanie pliku wyjściowego. Wartości dozwolone to bam lub cram. Jeśli nie zostanie podana żadna wartość, ustawieniem domyślnym będzie none (brak).

Poniżej widoczne są dostępne pola [DragenSingleCellRNA_Data] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
Sample_ID	Tak	Identyfikator próbki. Identyfikator próbki może zawierać maksymalnie 20 znaków alfanumerycznych. W identyfikatorze rozróżniana jest wielkość liter. Poszczególne identyfikatory należy rozdzielać kreskami. Na przykład Sample1-DQB1-022515. Identyfikatory próbek muszą być zgodne z identyfikatorami określonymi w sekcji BCLConvert_Data.

Zestaw Single Cell Library Kit 6

Poniższe ustawienia arkusza próbek mają zastosowanie do zestawów do przygotowania biblioteki o takiej samej strukturze genetycznej, co zestaw DRAGEN Single Cell Library Kit 6. Aby sprawdzić strukturę genetyczną konkretnego zestawu, należy skorzystać ze strony pomocy dotyczącej zgodności produktów z platformą DRAGEN Bio-IT.

Pole	Wymagane	Opis
SoftwareVersion	Tak	Wersja oprogramowania DRAGEN aktualnie zainstalowana w systemie. Należy użyć wszystkich trzech liczb całkowitych, które zawiera nazwa wersji. Na przykład 3.5.7. Wersja oprogramowania musi być zgodna z wersją określoną w sekcji BCLConvert_Settings.

Pole	Wymagane	Opis
ReferenceGenomeDir	Tak	Nazwa genomu referencyjnego. Na przykład hg38_alt_aware. Genomy referencyjne znajdują się w lokalizacji o następującej ścieżce: /usr/local/illumina/genomes. Informacje o korzystaniu z niestandardowego genomu referencyjnego zawiera <i>Pomoc online aplikacji Reference Builder for Illumina Instruments w wersji 1.0.0</i> .
RnaLibraryType	Nie	Wprowadzić jedną z poniższych wartości: <ul style="list-style-type: none"> • SF – nić do przodu. • SR – nić do tyłu. • U – brak nici.
RnaGeneAnnotationFile	Nie	Plik zawierający adnotacje genów RNA. Dozwolone są tylko znaki alfanumeryczne. Jeśli nazwa nie zostanie podana, będzie używany domyślny plik adnotacji zawarty w określonym genomie referencyjnym.
BarcodeRead	Nie	Lokalizacja w sekwencjonowaniu odczytu kodu kreskowego, która zawiera kod kreskowy i UMI. Wartości mogą zawierać Read1 lub Read2. Wartością domyślną jest Read1.

Pole	Wymagane	Opis
BarcodePosition	Tak	<p>Lokalizacja nukleotydów odpowiadająca kodom kreskowym w zakresie wartości wprowadzonej jako BarcodeRead. Pozycje nukleotydów są indeksowane, począwszy od pozycji zerowej. Wartość BarcodePosition należy wprowadzić w następującym formacie:</p> <p>0_<pozycja końcowa pierwszego kodu kreskowego>+<pozycja początkowa drugiego kodu kreskowego>_<pozycja końcowa drugiego kodu kreskowego>+<pozycja początkowa trzeciego kodu kreskowego>_<pozycja końcowa trzeciego kodu kreskowego></p> <p>Na przykład dla poniższej struktury obowiązywałby zapis 0_8+21_29+43_51:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 9 nukleotydów w pierwszym kodzie kreskowym (0_8). • 12 nukleotydów między pierwszym a drugim kodem kreskowym. • 9 nukleotydów w drugim kodzie kreskowym (21_29). • 13 nukleotydów między drugim a trzecim kodem kreskowym. • 9 nukleotydów w trzecim kodzie kreskowym (43_51).
UmiPosition	Tak	<p>Lokalizacja nukleotydów odpowiadająca UMI w zakresie wartości podanej jako BarCodeRead. Wprowadzić ciąg w następującym formacie:</p> <p><pozycja początkowa UMI>_<pozycja końcowa UMI></p> <p>Jeśli na przykład UMI zawiera 8 nukleotydów, a łączna liczba nukleotydów poprzedzających UMI wynosi 51, wówczas wartością jest 52_59.</p>
BarcodeSequenceWhitelist	Nie	<p>Nazwa pliku zawierającego sekwencję kodu kreskowego do umieszczenia na liście dozwolonych. Nazwa pliku może zawierać wyłącznie znaki alfanumeryczne, kreski, podkreślenia i kropki.</p>

Pole	Wymagane	Opis
KeepFastq	Nie	Aby zapisywać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>true</code> (prawda). Aby usuwać pliki wyjściowe FASTQ, wprowadzić wartość <code>false</code> (fałsz).
MapAlignOutFormat	Nie	Formatowanie pliku wyjściowego. Wartości dozwolone to <code>bam</code> lub <code>cram</code> . Jeśli nie zostanie podana żadna wartość, ustawieniem domyślnym będzie <code>none</code> (brak).

Poniżej widoczne są dostępne pola [DragenSingleCellRNA_Data] i ich opisy.

Pole	Wymagane	Opis
Sample_ID	Tak	Identyfikator próbki. Identyfikator próbki może zawierać maksymalnie 20 znaków alfanumerycznych. W identyfikatorze rozróżniana jest wielkość liter. Poszczególne identyfikatory należy rozdzielać kreskami. Na przykład <code>Sample1-DQB1-022515</code> . Identyfikatory próbek muszą być zgodne z identyfikatorami określonymi w sekcji <code>BCLConvert_Data</code> .

Sekwencjonowanie w cyklu ciemnym

W niniejszej części opisano sposób używania sekwencjonowania w cyklu ciemnym w protokole.

Sekwencjonowanie w cyklu ciemnym jest stosowane wyłącznie do realizowania etapów chemicznych cyklu sekwencjonowania. Aby sprawdzić, czy wymagane jest sekwencjonowanie w cyklu ciemnym, należy się zapoznać z informacjami na stronie [Compatible Products](#) (Zgodne produkty) poświęconej konkretnemu zestawowi do przygotowania bibliotek w [witrynie działu pomocy firmy Illumina](#).

Aby przeprowadzić sekwencjonowanie w cyklu ciemnym, należy wykonać poniższe czynności.

Edycja pliku protokołu

1. Pobrać plik XML protokołu z [witryny działu pomocy firmy Illumina](#).
2. Przeprowadzić edycję pliku XML protokołu.
 - a. Zidentyfikować odpowiednią sekcję protokołu na podstawie konfiguracji odczytu i sekwencjonowania indeksów. W przypadku niestandardowego protokołu istnieje sześć różnych protokołów, które mogą być edytowane.

Na przykład protokół dla pojedynczego odczytu Read 1 (Odczyt 1) bez konfiguracji sekwencjonowania indeksu będzie miał postać <Protocol Name="1 Read 0 Index" ProtocolType="1Read0Index" >.

- b. Przed <ReadRef ReadName="Read 1"/> i <ReadRef ReadName="Read 2"/> należy wprowadzić poniższy etap cyklu ciemnego w nowej linii.
<DarkCycle ChemistryName="Dark Cycle Before First Base" />.
- c. Etap cyklu ciemnego należy wprowadzić w nowej linii dla każdego wymaganego cyklu ciemnego.

3. Zapisać plik XML protokołu.

Poniżej przedstawiono przykładowy protokół z cyklem ciemnym:

```
<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" />
  ...
```

Dołączanie protokołu do przebiegu

- 1 W konfiguracji przebiegu w oprogramowaniu sterującym wybrać opcję **Choose** (Wybierz) w obszarze Custom Recipe (Protokół niestandardowy).
- 2 Przejść do zaktualizowanego pliku XML protokołu.
- 3 Wybrać opcję **Open** (Otwórz).
4. Wrócić do sekcji [Inicjowanie sekwencjonowania na stronie 49](#).

Indeks

%

%PF 63

A

adres IP 6
aktualizacje automatyczne 81
algorytm Phred 64
amplifikacja 9
analiza
 metody 5, 9
analiza lokalna 1
analiza obrazu 5
analiza oparta na chmurze 1
aparatus, dane dotyczące działania 14

B

BaseSpace Sequence Hub 1
 dokumentacja 14
 ustawienia 14
bcl2fastq2 58
biblioteki
 denaturacja 9
błędy 6, 89
 komunikaty 86
 prawdopodobieństwo 63-64
brak rozpoznań 61-62
bufor do ponownego zawieszania 28

C

CE 58
chusteczki nasączone alkoholem 29
chusteczki nasączone wybielaczem 29
Compute Engine 58
cykle odczytu 32
części zamienne 84

D

dane dotyczące działania 14
denaturacja 9
długości odczytu 32
dodatkowe cykle 32
dokumentacja 64, 114
domena prywatna 14
domeny 14
domyślny folder wyjściowy 53
dopasowanie specyfikacji 89
drzwiczki
 zamykanie 55
dysk D 80
dysk twarde 6, 80
dyski mapowane 53
dział pomocy technicznej 114
dzienniki błędów 59

E

edycja parametrów przebiegu 53

F

fabryczne ustawienia domyślne 90-91
fazowanie i fazowanie wyprzedzające 61
filtr czystości 63
filtrowanie klastrów 63
filtry powietrza
 elementy zapasowe 29
 lokalizacja 84
folder przebiegów 80
folder wyjściowy 53, 80
fragmenty protokołu 6

G

generowanie szablonu 61
gwarancja 29

I

ikony 6
Illumina Proactive Support 14
indeks
 cykle 32
inicjalizacja 89
 niepowodzenie 89
instalacja oprogramowania 81
instalator System Suite 81
intensywności klastrów 61

J

jakość danych 63

K

kabel Ethernet 4
kabel zasilający 4
kamery 59
kanał czerwony 62
kanał zielony 62
kasetą
 orientacja ładowania 55
klawiatury 4
konfiguracja przebiegu
 przykłady 32
kontrole systemu 86
konwersja plików FASTQ 58

L

liczby cykli 32
licznik przebiegów 6
listwa oświetleniowa 3
Local Run Manager 5
lokalizacja hostingowa 14
lokalizacja serwera 14
lokalizacje klastrów 58, 65

M

materiały eksploatacyjne
 skanowanie 55
 śledzenie 1
miejsce na dysku 6, 80
miniatury 65
monitor 3
mysz 4

N

nanodołki 61
nazewnictwo
 nazwa aparatu 21
 nazwa komputera 6
nazwa 21
nazwa komputera 6
niepowodzenia rejestracji 61
nukleotydy 62
numer seryjny 6
numerowanie płytek 60
numerowanie powierzchni 60
numery katalogowe 28

O

obrazowanie 58-59
obrazy 58
obsługa klienta 114
odczynniki NextSeq 1000/2000 28
oprogramowanie
 instalacja 81
 powiadomienia o aktualizacji 22
 zmiana na niższą wersję 90-91
ostrzeżenia 6, 81, 89

P

pakiet oprogramowania 1, 5
parametry przebiegu
 edycja 53
pasek stanu 3

- pasma 59
- PhiX 29
 - wyrównanie 58
- PhiX Control ver. 3 28
- pierwsza konfiguracja 84, 90-91
- pliki BCL 6
- pliki CBCL 63
- pliki dziennika 59
- pliki filtrów 58, 65
- pliki InterOp 58, 65
- pliki rozpoznań nukleotydów 9, 58, 65
- płytki 58
- podkładki 29
- pojedynczy odczyt 53
- połączenie internetowe 14
- pomoc techniczna 114
- ponowne uruchamianie 90-91
- port Ethernet 4
- porty USB 4
- protokoły 81
- przebiegi
 - parametry 58
- przedział materiałów eksploatacyjnych 3
- przejście przez filtr (PF) 63
- przełącznik 4, 89
- przesuwanie 4
- przycisk zasilania 3, 89

R

- ręczne aktualizacje oprogramowania 81
- rozcieńczanie bibliotek 9
- rozmiar przebiegu 80
- rozpoznawanie nukleotydów 5
- RunInfo.xml 65

S

- sekwencjonowanie dwukanałowe 62
- Sequencing Analysis Viewer 58, 61
- sparowane końce 53
- specyfikacje chłodziarki 30
- specyfikacje zamrażarki 30

- status przebiegów 6
- strony pomocy technicznej 81
- subskrypcja Enterprise 14
- system operacyjny 89

Ś

- ścieżki UNC 53
- śledzenie materiałów eksploatacyjnych 1

T

- tabele jakości 64
- tacka ociekowa
 - podkładki 29
- terminy ważności 84

U

- Universal Copy Service 5, 81
- ustawienia audio 21
- ustawienia dźwięków 21
- usuwanie przebiegów 6, 80
- utracone połączenia 89

W

- wartości intensywności 61
- wentylatory 84
- Windows
 - logowanie 89
 - wyłączanie 89
 - wyłączanie i ponowne włączanie aparatu 86
 - wyniki jakościowe 63-64

Z

- zamiennik buforu RSB 28
- zarządzanie procesem 80
- zasilanie prądem przemiennym
 - wejście 4
- zbiory 59-60
- zestaw testowy 29

zestawy 28

numery katalogowe 29

zmiana wersji oprogramowania na niższą 90-
91

Pomoc techniczna

W celu uzyskania pomocy technicznej należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy Illumina.

Witryna: www.illumina.com

Adres e-mail: techsupport@illumina.com

Numery telefonów do działu pomocy technicznej firmy Illumina

Region	Bezpłatny	Międzynarodowy
Australia	+61 1800 775 688	
Austria	+43 800 006249	+43 1 9286540
Belgia	+32 800 77 160	+32 3 400 29 73
Chiny		+86 400 066 5835
Dania	+45 80 82 01 83	+45 89 87 11 56
Filipiny	+63 180016510798	
Finlandia	+358 800 918 363	+358 9 7479 0110
Francja	+33 8 05 10 21 93	+33 1 70 77 04 46
Hiszpania	+34 800 300 143	+34 911 899 417
Holandia	+31 800 022 2493	+31 20 713 2960
Hongkong, Chiny	+852 800 960 230	
Indie	+91 8006500375	
Indonezja		0078036510048
Irlandia	+353 1800 936608	+353 1 695 0506
Japonia	+81 0800 111 5011	
Kanada	+1 800 809 4566	
Korea Południowa	+82 80 234 5300	
Malezja	+60 1800 80 6789	
Niemcy	+49 800 101 4940	+49 89 3803 5677
Norwegia	+47 800 16 836	+47 21 93 96 93
Nowa Zelandia	+64 800 451 650	

Region	Bezpłatny	Międzynarodowy
Singapur	1 800 5792 745	
Stany Zjednoczone	+1 800 809 4566	+1 858 202 4566
Szwajcaria	+41 800 200 442	+41 56 580 00 00
Szwecja	+46 2 00883979	+46 8 50619671
Tajlandia	+66 1800 011 304	
Tajwan, Chiny	+886 8 06651752	
Wielka Brytania	+44 800 012 6019	+44 20 7305 7197
Wietnam	+84 1206 5263	
Włochy	+39 800 985513	+39 236003759

Karty charakterystyki – dostępne na stronie firmy Illumina pod adresem support.illumina.com/sds.html.

Dokumentacja produktu jest dostępna do pobrania w witrynie support.illumina.com.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122, USA

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (poza Ameryką Północną)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Tylko do celów badawczych. Nieprzeznaczone do procedur diagnostycznych.

© 2021 Illumina, Inc. Wszelkie prawa zastrzeżone.

illumina[®]