

NextSeq 500

Руководство по системе



Настоящий документ и его содержание являются собственностью компании Illumina, Inc. и ее филиалов (далее — Illumina) и предназначены для использования исключительно в рамках договора с потребителем при эксплуатации изделия (-ий), описанного (-ых) в настоящем документе, и ни для какой иной цели. Настоящий документ и его содержание не подлежат использованию или распространению не по назначению и (или) передаче, раскрытию или воспроизведению каким-либо способом без предварительного письменного согласия компании Illumina. Посредством настоящего документа компания Illumina не передает какую-либо лицензию на патент, товарный знак, авторское право или права, регулируемые общим правом, или аналогичные права какой-либо третьей стороне.

Инструкции, изложенные в настоящем документе, должны строго и точно соблюдаться квалифицированным и прошедшим соответствующее обучение персоналом для обеспечения правильной и безопасной эксплуатации изделия (-ий), описанного (-ых) в настоящем документе. Перед началом эксплуатации изделий убедитесь, что вы полностью прочитали и поняли содержание настоящего документа.

НЕВЫПОЛНЕНИЕ ТРЕБОВАНИЙ ПО ПОЛНОМУ ПРОЧТЕНИЮ И ТОЧНОМУ ВЫПОЛНЕНИЮ ВСЕХ ИНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ, МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ИЗДЕЛИЯ (-ИЙ), ТРАВМАМ (ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ ИЛИ ИНЫХ ЛИЦ) И ПОВРЕЖДЕНИЮ ИМУЩЕСТВА И ПРИВЕДЕТ К ОТМЕНЕ ЛЮБЫХ ГАРАНТИЙНЫХ ОБЯЗАТЕЛЬСТВ, ПРИМЕНИМЫХ К ИЗДЕЛИЮ (-ЯМ).

КОМПАНИЯ ILLUMINA НЕ НЕСЕТ НИКАКОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТИ, ВОЗНИКАЮЩЕЙ ВСЛЕДСТВИЕ НЕНАДЛЕЖАЩЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЗДЕЛИЯ (-ИЙ), ОПИСАННОГО (-ОХ) В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ (ВКЛЮЧАЯ ИХ ЧАСТИ ИЛИ ЧАСТИ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ).

© Illumina, Inc., 2019 г. Все права защищены.

Все товарные знаки являются собственностью компании Illumina, Inc. или их соответствующих владельцев. Информацию о конкретных товарных знаках см. на веб-сайте по адресу www.illumina.com/company/legal.html.

История редакций

Документ	Дата	Описание изменений
Материал № 20006818 Документ № 15046563, версия 06	Июнь 2019 г.	Добавлена информация о рабочей группе для настройки запуска в службе BaseSpace Sequence Hub. Добавлена информация о пути UNC к выходной папке. Добавлена информация об устранении ошибок сетевого хранения. Добавлено разъяснение о том, что указания на воздушных фильтрах предназначены для приборов, фильтр которых расположен на задней панели. Обновлено расположение файлов, находившихся в корневой директории, для запуска конкретных папок в выходной папке.

Документ	Дата	Описание изменений
<p>Материал № 20006818 документ № 15046563, версия 05</p>	<p>Декабрь 2018 г.</p>	<p>Обновлены описания программного обеспечения, страницы экранов и рабочий процесс для управляющего программного обеспечения NextSeq (NCS) 4.0. Обновлено следующая дополнительная информация для NCS 4.0.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Добавлена информация о программном обеспечении Local Run Manager. • Обновлено информация о BaseSpace в BaseSpace Sequence Hub. В новой версии отсутствуют вкладки BaseSpace Prep (Подготовка BaseSpace) и BaseSpace Onsite (Локальная установка BaseSpace). • Добавлены инструкции относительно выбора режима Local Run Manager или ручного режима выполнения запуска. Ручной режим заменяет автономный режим с небольшими изменениями. • Добавлена опция проверки обновления программного обеспечения прибора через BaseSpace Sequence Hub. • К описанию пакета System Suite добавлены службы Local Run Manager, Universal Copy Service и драйвер непосредственного доступа к памяти Direct Memory Access. Удалены службы BaseSpace Broker и SAV. • Служба Run Copy Service теперь называется Universal Copy Service. • Добавлена возможность использовать самостоятельно создаваемые наборы параметров при загрузке картриджа с реактивами. • Убрано описание изображения проточной кюветы при мониторинге хода выполнения запуска. • Убран выбор запуска в режиме терминала или в режиме Windows. • Добавлены инструкции по техническому обслуживанию для приборов, дополнительно оснащенных воздушными фильтрами. • Добавлены новые значки для привлечения внимания оператора, информирования оператора и свертывания окна NCS. • Обновлено инструкции по пользовательской настройке параметров запуска и системы. • Обновлено опция передачи данных производительности прибора • Обновлено значки передачи данных. • Разъяснено, что в случае сканирования для файлов, ожидающих передачи в очереди, отсутствует лимит по времени. • Исправлены ссылки на BSF в информации о проверке движений (теперь это ссылки на механизм подачи буфера Buffer Straw Mechanism). <p>Добавлены метанол ЧДА или спектрофотометрической чистоты, или изопропиловый спирт (99%-ный) для технического обслуживания прибора.</p>

Документ	Дата	Описание изменений
Материал № 20006818 Документ № 15046563, версия 04	Май 2018 г.	Добавлена поддержка для реактивов NextSeq v2.5. Обновлена информация о транспортировке комплектов реактивов NextSeq v2.5 при температуре окружающей среды. Условия хранения проточных кювет NextSeq в. 2.5 остаются прежними. Добавлены сведения относительно необходимости обновления программного обеспечения до версии 2.2 для использования комплектов реактивов NextSeq в. 2.5. Добавлено примечание относительно загрузочных концентраций для комплекта со средним выходом. Добавлено примечание относительно сохранения проточных кювет. Добавлено примечание о том, что для системных проверок используются проточные кюветы с высоким выходом.
Материал № 20006818 Документ № 15046563, версия 03	Март 2018 г.	Удалены используемые по умолчанию имя и пароль пользователя, необходимые для входа в операционную систему. Компания Illumina рекомендует использовать особые пароли и имена пользователей для каждой лаборатории. Добавлена информация о службе мониторинга Illumina Proactive в раздел «Выбор конфигурации BaseSpace». Обновлены ссылки на программное обеспечение RTA в. 2 как на RTA2.
Материал № 20006818 Документ № 15046563, версия 02	Март 2016 г.	Добавлен раздел «Замечания по индексированию». Удалены шаги, описывающие осмотр проточной кюветы. На этапе, описывающем загрузку библиотек в картридж с реактивами, добавлены значения объема и концентрации, необходимых при загрузке.
Материал № 20001879 Документ № 15046563, версия 01	Октябрь 2015 г.	Указано, что эквивалентом раствора NaOCl рекомендуемого поставщика является эквивалентный раствор лабораторного класса. Добавлены рекомендации по ежегодному профилактическому техническому обслуживанию. Пересмотрена информация в главах «Обзор» и «Начало работы». Добавлены инструкции по пользовательской настройке системы. Из главы «Поиск и устранение неисправностей» удалены инструкции по использованию справки Live Help. Данная функция удалена из управляющего программного обеспечения.
Номер по каталогу 15046563, ред. I	Май 2015 г.	Исправлено описание подготовленных емкостей в картридже с реактивами.
Номер по каталогу 15046563, ред. H	Май 2015 г.	Исправлен объем средства твин 20 в промывочном растворе для ручной промывки. Изменена структура информации о вариантах конфигурации системы. Информация о программном обеспечении анализа в реальном времени перенесена в приложение A.

Документ	Дата	Описание изменений
Номер по каталогу 15046563, ред. G	Февраль 2015 г.	<p>Обновлены описания программного обеспечения для управляющего программного обеспечения NextSeq версии 1.4.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Добавлены опции промывки вручную: быстрая промывка и промывка после запуска, выполняемая вручную. • Добавлено описание характеристик пользовательской настройки запуска для слива расходных материалов в конце запуска и пропуска подтверждения проверки перед запуском. • Добавлена функция отмены и перезапуска проверки перед запуском. • Добавлена функция активации мониторинга запуска в автономном режиме. • Удалено описание файлов смещения и файлов фазирования, которые больше не записываются в папку запуска. • Обновлено изображение графика рассеяния, на котором показано более равномерное распределение распознанных нуклеотидов при использовании программного обеспечения системы версии 1.4. • Добавлено описание службы копирования запусков Run Copy Service. • Добавлена возможность работы с праймером пользовательского индекса 2, которая появляется при работе с комплектом NextSeq 500 версии 2. Дополнительную информацию см. в документе «Руководство по пользовательским праймерам NextSeq» (документ № 15057456). <p>Обновлена инструкция по подготовке реактивов для использования комплекта NextSeq 500 версии 2: убраны шаги, требующие добавления гипохлорита натрия и праймеров двойного индексирования в картридж для реактивов вручную. Данные реактивы предварительно добавлены в картридж с реактивами версии 2. Дополнительную информацию см. в справочном руководстве по комплекту NextSeq 500/550 версии 2 (документ № 15058065).</p> <p>Добавлен раздел «Расходные материалы для секвенирования», в котором перечислены версии комплектов, совместимые версии NCS, а также название и номер по каталогу справочного руководства соответствующего комплекта.</p> <p>К информации о расходных материалах, приобретаемых пользователем, добавлено применение раствора NaOCl для функции ручной промывки, которая введена в программном обеспечении NCS v1.4.</p> <p>Требования к количеству кластеров, проходящих через фильтр, исправлены на распознавание в первых 25 циклах не более 1 основания с чистотой ниже определенного значения. В инструкцию по проверке системы добавлен объем воды лабораторного класса, равный 120 мл.</p>

Документ	Дата	Описание изменений
Номер по каталогу 15046563, ред. F	Сентябрь 2014 г.	Исправлены описания функций для управляющего программного обеспечения NextSeq версии 1.3. Обновлен URL для паспортов безопасности (SDS) — support.illumina.com/sds.html . В маркировке продукции NextSeq символ ™ заменен символом ®.
Номер по каталогу 15046563, ред. E	Август 2014 г.	Обновлены описания программного обеспечения для управляющего программного обеспечения NextSeq версии 1.3. <ul style="list-style-type: none"> • Обновлены описания команд настройки системы и обновлений программного обеспечения на экране управления прибором. • Обновлены описания на экране проверки перед запуском секвенирования, в которых проверяемые элементы списка объединены в 4 категории, допускающие расширение. • Обновлены инструкции по интерактивной справке (Live Help) для доступа к ней с использованием URL. Значок на главной странице отсутствует в NCS версии 1.3. • Добавлена процедура регбридизации на приборе для регбридизации праймера 1 считывания. Возможность регбридизации проточной кюветы совместима с NCS версии 1.3 или более поздней и требует нового картриджа с реактивами и картриджа с буфером. К списку дополнительных ресурсов добавлено «Руководство по пользовательским праймерам NextSeq» (документ № 15057456).
Номер по каталогу 15046563, ред. D	Июнь 2014 г.	Добавлены инструкции по загрузке BP13 в положение 18 картриджа для реактивов при выполнении циклов секвенирования с двойным индексированием. Исправлен цикл, в котором появляются параметры плотности кластеров (цикл 25). Исправлены позиции в картридже реактивов для пользовательских праймеров в положение 7 (1 считывание), 8 (2 считывание) и положение 9 (1 индексирование). Добавлено примечание о потенциальном повреждении прибора в результате переустановки на другое место после монтажа. Перед тем как переносить прибор с места на место, обязательно свяжитесь с представителем компании Illumina. Обновлен URL для паспортов безопасности (SDS) — support.illumina.com/sds.ilmn .

Документ	Дата	Описание изменений
Номер по каталогу 15046563, ред. С	Апрель 2014 г.	<p>Обновлены описания программного обеспечения для управляющего программного обеспечения NextSeq версии 1.2 и RTA версии 2.1.</p> <ul style="list-style-type: none">• Добавлено имя набора параметров NextSeq Mid для использования с комплектом среднего выхода NextSeq 500.• Удалены инструкции о добавлении раствора NaOCl в картридж для промывочного буфера для проведения ручной промывки.• Исправлен объем NaOCl на 3 мл для положения 28 картриджа с реактивами, что требуется для автоматической промывки после запуска.• Отмечено, что длинные названия запусков появляются в поле прокрутки на экране настройки запусков.• Отмечено, что RTA вер. 2 не применяет коррекции фазирования и предварительного фазирования к считыванию индекса.• Добавлено описание файлов журналов к списку файлов, используемых для поиска и устранения неисправностей.• Добавлены инструкции по опорожнению заполненного контейнера с использованными реактивами во время цикла.• Добавлено описание папок набора параметров, включая местоположение пользовательских наборов параметров.• Добавлено описание термических проверок для вентиляторов и термических датчиков.

Документ	Дата	Описание изменений
<p>Номер по каталогу 15046563, ред. В</p>	<p>Февраль 2014 г.</p>	<p>Обновлены описания программного обеспечения для управляющего программного обеспечения NextSeq версии 1.1.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Добавлена функция поиска на экране подготовки запуска, позволяющая отфильтровать список доступных запусков. • Добавлено, что доступные наборы параметров, включая NextSeq High или NextSeq Mid, зависят от типа проточной кюветы. • Указано, что обновления программного обеспечения включают лицензионное соглашение, информацию о версиях и список программных продуктов, подлежащих обновлению. • Добавлено описание сообщения об ошибке RAID. • Отмечено, что кнопка Exit (Выход) закрывает NSS и перезапускает NCS автоматически после окончания проверки системы. <p>Добавлена информация о том, что при температуре 4 °C реактив может храниться до 1 недели.</p> <p>Обновлено содержание этикетки картриджа с реактивом для емкости № 10 — теперь текст имеет вид Load Library Here (Место загрузки библиотеки).</p> <p>Обновлен список расходных материалов, поставляемых пользователем, для указания 3–6%-ного гипохлорита натрия и списка каталожных номеров поставщика.</p> <p>Обновлены инструкции по приготовлению 0,06%-ного разбавления NaOCl для промывки прибора, указаны уменьшение объема до 2 мл и исходная концентрация 3–6 %.</p> <p>Добавлены иллюстрации правильного и неправильного положения защелок на проточной кювете.</p> <p>В главу об анализе в реальном времени (RTA) включены обзор RTA вер. 2, структура папки выходных данных и процесс распознавания нуклеотидов.</p> <p>В главу о поиске и устранении неисправностей добавлены ошибки RTA вер. 2 и в список файлов для поиска и устранения неисправностей включен файл RunParameters.xml.</p>
<p>Номер по каталогу 15046563, ред. А</p>	<p>Январь 2014 г.</p>	<p>Первый выпуск.</p>

Содержание

Глава 1. Обзор	1
Введение	1
Дополнительные ресурсы	1
Компоненты прибора	2
Обзор расходных материалов для секвенирования	6
Глава 2. Начало работы	10
Включение и начало работы прибора	10
Пользовательские настройки системы	10
Пользовательская настройка запуска	12
Расходные материалы и оборудование, приобретаемые пользователем	13
Глава 3. Секвенирование	15
Введение	15
Создание запуска с помощью программного обеспечения Local Run Manager	16
Создание запуска в NSC	16
Подготовка картриджа с реактивами	17
Подготовка проточной кюветы	17
Подготовка библиотек к секвенированию	18
Подготовка запуска секвенирования	19
Отслеживание выполнения запуска	26
Автоматическая промывка после запуска	28
Глава 4. Техническое обслуживание	29
Введение	29
Выполнение ручной промывки	29
Замена воздушного фильтра	32
Обновление программного обеспечения	34
Выключение прибора	35
Приложение А. Поиск и устранение неисправностей	36
Введение	36
Файлы поиска и устранения неисправностей	36
Исправление ошибок автоматической проверки	38
Контейнер с использованными реактивами заполнен	39
Рабочий процесс регибридизации	39
Пользовательские наборы параметров и папки наборов параметров	42
Проверка системы	42
Сообщение об ошибке RAID	44
Ошибка сетевого хранения	44
Конфигурирование настроек системы	45

Приложение В. Анализ в режиме реального времени	48
Обзор программного обеспечения для анализа в режиме реального времени	48
Рабочий процесс анализа в реальном времени	49
Выходные файлы секвенирования	53
Плитки проточной кюветы	54
Структура папки выходных данных	57
Алфавитный указатель	58
Техническая помощь	62

Глава 1. Обзор

Введение	1
Дополнительные ресурсы	1
Компоненты прибора	2
Обзор расходных материалов для секвенирования	6

Введение

Система Illumina® NextSeq™ 500 сочетает мощь высокопроизводительного секвенирования с простотой настольного секвенатора.

Характеристики

- ▶ **Высокопроизводительное секвенирование** — прибор NextSeq 500 позволяет секвенировать экзомы, полные геномы и транскриптомы, а также поддерживает библиотеки TruSeq™, TruSight™ и Nextera™.
- ▶ **Типы проточных кювет** — проточные кюветы доступны в конфигурациях для высокой и средней производительности. Каждый тип проточной кюветы оснащен совместимым предварительно заполненным картриджем для реактивов.
- ▶ **Анализ в реальном времени (RTA)** — встроенное программное обеспечение для анализа обеспечивает выполнение анализа данных на приборе, включая анализ изображений и распознавание оснований. На приборе NextSeq используется версия RTA (RTA версии 2), в которой имеются существенные отличия в части архитектуры и функциональности. Дополнительную информацию см. в разделе *Анализ в режиме реального времени на стр. 48*.
- ▶ **Облачный анализ с BaseSpace™ Sequence Hub** — рабочий процесс секвенирования интегрирован в приложение BaseSpace Sequence Hub, облачную вычислительную среду компании Illumina, предназначенную для мониторинга запусков, анализа данных, их хранения и совместной работы. По мере выполнения запуска выходные файлы в режиме реального времени передаются в BaseSpace Sequence Hub для анализа.
- ▶ **Анализ данных на приборе.** Программное обеспечение Local Run Manager анализирует данные запуска в соответствии с модулем анализа, указанным для данного запуска.

Дополнительные ресурсы

Следующую информацию можно загрузить с веб-сайта компании Illumina.

Ресурс	Описание
<i>«Руководство по подготовке рабочего места системы NextSeq» (документ № 15045113)</i>	Содержит технические характеристики, касающиеся лабораторного пространства, требований к электроснабжению и рекомендаций по условиям окружающей среды.
<i>«Руководство по безопасности и соответствию системы NextSeq» (документ № 15046564)</i>	Содержит рекомендации по эксплуатационной безопасности, сведения о положениях соответствия и маркировке прибора.
<i>«Руководство пользователя считывающего устройства RFID — модель № TR-001-44» (документ № 15041950)</i>	Содержит сведения о считывателе RFID, установленном в приборе, сертификатах соответствия и рекомендации по безопасности.

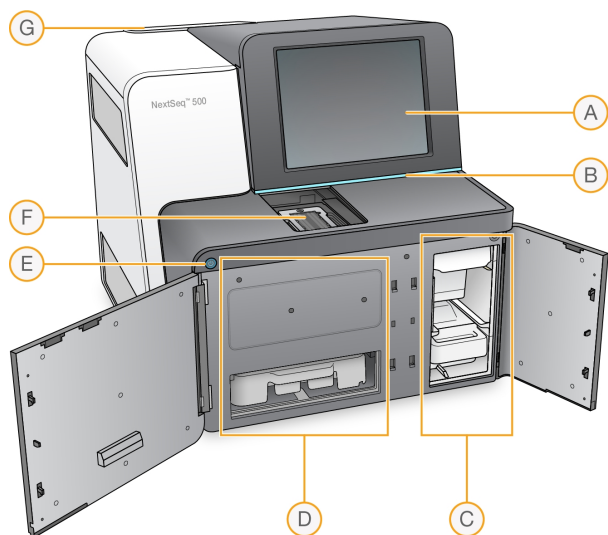
Ресурс	Описание
<i>Денатурация и разведение библиотек для системы NextSeq (документ № 15048776)</i>	Содержит инструкции по денатурированию и разбавлению подготовленных для запуска секвенирования библиотек, а также по подготовке дополнительного контроля PhiX. Этот этап применяется для библиотек большинства типов.
<i>Руководство по пользовательским праймерам NextSeq (документ № 15057456)</i>	Содержит информацию об использовании самостоятельно изготовленных праймеров секвенирования вместо праймеров, изготовленных компанией Illumina.
<i>Справка по BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Содержит информацию по использованию среды BaseSpace™ Sequence Hub и доступные варианты анализа.
<i>Руководство по программному обеспечению Local Run Manager (документ № 100000002702)</i>	Содержит обзор программного обеспечения Local Run Manager и инструкции по пользованию функциями ПО.

Посетите страницу поддержки прибора [NextSeq 500](#) на веб-сайте компании Illumina, чтобы получить доступ к документации, загрузкам программного обеспечения, обучению онлайн и часто задаваемым вопросам.

Компоненты прибора

В системе NextSeq 500 имеются монитор с сенсорным экраном, строка состояния и четыре отсека.

Рисунок 1. Компоненты прибора



- A **Монитор с сенсорным экраном** позволяет осуществлять конфигурирование и настройки с помощью интерфейса управляющего программного обеспечения непосредственно на приборе.
- B **Строка состояния** — указывает на следующие состояния прибора: идет обработка (голубой цвет), требуется внимание (оранжевый), готов к секвенированию (зеленый) — или на то, что в течение следующих 24 часов необходимо выполнить промывку (желтый).
- C **Буферный отсек** — место размещения картриджа с буфером и контейнера с использованными реактивами.
- D **Отсек реактивов** — место размещения картриджа с реактивами.
- E **Кнопка питания** — подает питание на прибор, включает и выключает компьютер и прибор.
- F **Отсек визуализации** — здесь находится проточная кювета в ходе цикла секвенирования.

- G Отсек воздушного фильтра** — здесь находится воздушный фильтр для приборов, оборудованных фильтром, расположенным на задней панели.

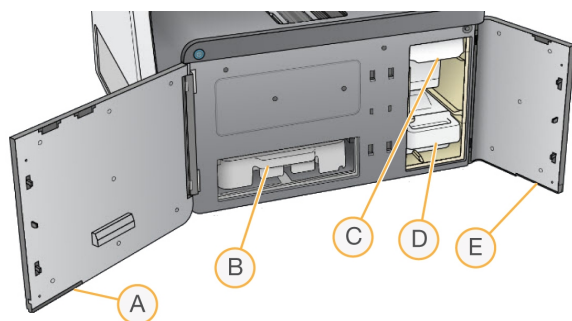
Отсек визуализации

Отсек визуализации содержит площадку с тремя направляющими штырями для установки проточной кюветы. После загрузки проточной кюветы дверцы отсека визуализации автоматически закрываются, перемещая все компоненты в нужное положение.

Отсеки реактива и буфера

Подготовка к выполнению цикла секвенирования на устройстве NextSeq 500 требует наличия доступа к отсеку реактивов и буферному отсеку, чтобы загрузить в них расходные материалы для цикла и опорожнить контейнер для использованных реактивов.

Рисунок 2. Отсеки реактива и буфера



- A Дверца отсека реактивов** — закрывает отсек реактивов, имеет защелку, расположенную в правом нижнем углу дверцы. В отсеке реактивов находится картридж с реактивами. Реактивы перекачиваются по сипперным трубкам и жидкостной системе в проточную кювету.
- B Картридж с реактивом** — картридж с реактивом заранее заполнен одноразовыми расходными материалами.
- C Картридж с буфером** — картридж с буфером заранее заполнен одноразовыми расходными материалами.
- D Контейнер с использованными реактивами** — использованные реактивы накапливаются для последующей утилизации после каждого цикла.
- E Дверца буферного отсека** — закрывает буферный отсек, имеет защелку, расположенную в левом нижнем углу дверцы.

Отсек воздушного фильтра

В отсеке воздушного фильтра находится воздушный фильтр для приборов, оборудованных фильтром, расположенным на задней панели. Заменять воздушный фильтр следует раз в 90 дней. Информацию о том, как заменять фильтр, см. в разделе [Замена воздушного фильтра на стр. 32](#).

Программное обеспечение NextSeq







Программное обеспечение прибора включает встроенные приложения, которые выполняют запуски секвенирования.

- ▶ **Управляющее программное обеспечение NextSeq Control Software (NCS)** — управляет работой прибора и позволит вам шаг за шагом выполнить подготовку к запуску секвенирования.
 - ▶ Программное обеспечение заранее установлено на NextSeq и работает на приборе. Программное обеспечение NCS выполняет запуск в соответствии с параметрами, указанными в программном модуле Local Run Manager или в NCS.
 - ▶ Прежде чем вы приступите к запуску секвенирования, выберите запуск, который вы создали в модуле Local Run Manager или в NCS. Программное обеспечение NCS проведет вас пошагово через процесс загрузки проточной кюветы и реактивов.
 - ▶ Во время запуска программное обеспечение отвечает за эксплуатацию площадки проточной кюветы, распределяет реактивы, контролирует струйную автоматику, задает температуру, получает изображения кластеров на проточной кювете и отображает визуальную сводку статистики качества. Выполнение запуска можно отслеживать в NCS или в Local Run Manager.
 - ▶ Во время запуска, который вы можете отслеживать либо в NCS, либо в Local Run Manager, программное обеспечение NCS выполняет следующие функции:
 - ▶ эксплуатирует площадку проточной кюветы;
 - ▶ распределяет реактивы;
 - ▶ контролирует струйную автоматику;
 - ▶ задает температуру;
 - ▶ делает изображения кластеров на проточной кювете;
 - ▶ отображает визуальную сводку статистики качества
- ▶ **Программное обеспечение Local Run Manager** — встроенная программная технология для создания запуска и анализа результатов (вторичный анализ). Это программное обеспечение также обеспечивает отслеживание образцов и может контролировать права пользователей.
- ▶ **Программа анализа в реальном времени (RTA)** — RTA выполняет анализ изображений и распознавание нуклеотидных оснований во время запуска. В приборе NextSeq 500 используется RTA версии 2, которая отличается от более ранних версий важными изменениями в архитектуре и функциональности. Дополнительную информацию см. в разделе [Анализ в режиме реального времени на стр. 48](#).
- ▶ **Служба Universal Copy Service** — копирует выходные файлы секвенирования в папку выходных данных и в BaseSpace Sequence Hub (если эта служба используется), через которые пользователь может получить к ним доступ.

Программное обеспечение Real-Time Analysis (RTA) и служба Universal Copy Service работают только в фоновом режиме.

Значки состояния


Значок состояния в верхнем правом углу экрана интерфейса управляющего программного обеспечения сигнализирует о любых изменениях состояния во время настройки или выполнения запуска.

Значок состояния	Название состояния	Описание
	Нормальное состояние	Система в обычном состоянии.
	Обработка	Система выполняет обработку.
	Предупреждение	Появляется предупреждение. Предупреждения не останавливают запуск и не требуют обязательных действий перед продолжением работы.
	Ошибка	Появляется ошибка. Ошибки требуют принятия определенных мер до перехода к выполнению запуска.
	Внимание	Пришло уведомление, требующее внимания оператора. Прочтите сообщение, чтобы получить дополнительную информацию.
	Информация	Чисто информационное сообщение. Другие действия не требуются.

При изменении состояния значок мигает для привлечения внимания. Выберите значок для просмотра описания состояния. Выберите опцию **Acknowledge** (Подтвердить) и подтвердите получение сообщения или выберите опцию **Close** (Закрыть), чтобы закрыть диалоговое окно.

Значок навигационной панели

Значок свертывания NCS находится в правом верхнем углу интерфейса управляющего программного обеспечения.

Значок доступа	Название значка	Описание
	Свернуть NCS	Нажмите, чтобы свернуть NCS и получить доступ к приложениям Windows и к папкам.

Кнопка питания

Кнопка питания на передней стороне прибора NextSeq включает питание самого прибора и его компьютера. Кнопка питания выполняет следующие действия в зависимости от состояния питания прибора.

Состояние питания	Действие
Питание прибора выключено	Кратковременно нажмите кнопку для включения питания.
Питание прибора включено	Кратковременно нажмите кнопку для выключения питания. На экране появится диалоговое окно для подтверждения нормального выключения прибора.
Питание прибора включено	Нажмите и удерживайте кнопку питания в течение 10 секунд, чтобы вызвать принудительную перезагрузку прибора и его компьютера. Пользуйтесь этим методом только для отключения прибора в том случае, если он не отвечает на действия оператора.

**ПРИМЕЧАНИЕ**

Выключение прибора во время цикла секвенирования немедленно останавливает цикл.

Остановка цикла является окончательной. В этом случае продолжить использовать расходные материалы цикла невозможно, а данные секвенирования цикла не сохраняются.

Требования к паролю Windows

Операционная система требует менять пароль Windows каждые 180 дней. Получив соответствующее приглашение, поменяйте пароль Windows. Если для анализа вы используете Local Run Manager, также смените пароль для учетной записи Windows в Local Run Manager. См. раздел «Настройки учетной записи службы» в *Руководстве к программному обеспечению Local Run Manager (документ № 100000002702)*.

Обзор расходных материалов для секвенирования

Содержимое и хранение

Расходные материалы для цикла секвенирования на приборе NextSeq поставляются отдельно в комплектах одноразового использования. Каждый комплект включает в себя одну проточную кювету, картридж реактивов, картридж с буфером и буферный раствор для разбавления библиотеки. При получении комплекта NextSeq 500:

- ▶ Не вскрывайте упаковку проточной кюветы, сделанную из фольги, пока не получите прямое указание сделать это.
- ▶ чтобы гарантировать надлежащее качество работы, своевременно закладываете компоненты на хранение при указанных температурах;
- ▶ храните картриджи таким образом, чтобы этикетки на упаковках были направлены вверх.

Расходный материал	Количество	Температура хранения	Описание
Картридж с реактивами	1	От -25 до -15 °C	Содержит реактивы для кластеризации и секвенирования
Картридж с буфером	1	От 15 до 30 °C	Содержит буферный и промывочный растворы
НТ1	1	От -25 до -15 °C	Гибридизационный буфер
Проточная кювета	1	От 2 до 8 °C *	Одноразовая проточная кювета

* Комплекты реактивов для NextSeq v. 2.5 поставляются при комнатной температуре.

Реактивы чувствительны к свету. Храните картриджи с реактивом и с буфером в темном месте, защищенном от действия света.

Для проточной кюветы, картриджа с реактивом и картриджа с буфером используется радиочастотная идентификация (RFID), целью которой является точное отслеживание расходных материалов и проверка совместимости.

Все другие комплекты содержат праймеры секвенирования с двойным индексированием и NaOCl в предварительно заполненном картридже. Дополнительные этапы не требуются.





ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

Для работы с комплектами NextSeq v2.5 требуется NCS версии 2.2 или более поздней версии. Убедитесь в том, что выполнены все обновления программного обеспечения, прежде чем вы подготовите образцы и расходные материалы.

Маркировка и совместимость комплекта

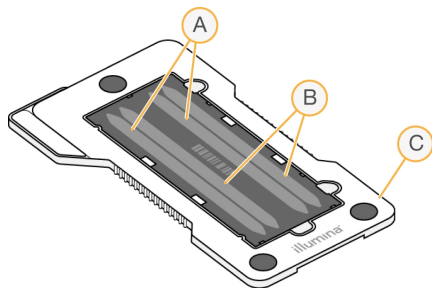
Компоненты комплекта промаркированы индикаторами с цветовым кодированием, которые указывают на совместимость проточных кювет и картриджей с реактивами. Используйте только совместимые картридж с реактивами и проточную кювету. Картридж с буфером универсален.

Каждая проточная кювета и картридж с реактивами промаркированы отметками **High** (Высокий выход) или **Mid** (Средний выход). Всегда проверяйте бирку при подготовке расходных материалов к циклу.

Тип комплекта	Отметка на бирке
Компоненты комплекта высокого выхода	
Компоненты комплекта среднего выхода	

Обзор проточной кюветы

Рисунок 3. Картридж проточной кюветы



- A Пара дорожек A — дорожки номер один и три
- B Пара дорожек B — дорожки номер два и четыре
- C Каркас картриджа проточной кюветы

Проточная кювета — это субстрат на основе стекла, на котором происходит генерация кластеров и выполняется реакция секвенирования. Проточная кювета заключена в картридж проточной кюветы.

Проточная кювета содержит четыре дорожки, визуализируемые парами.

- ▶ Дорожки номер один и три (пара дорожек A) визуализируются одновременно.
- ▶ Дорожки номер два и четыре (пара дорожек B) визуализируются, когда завершится получение изображения пары дорожек A.

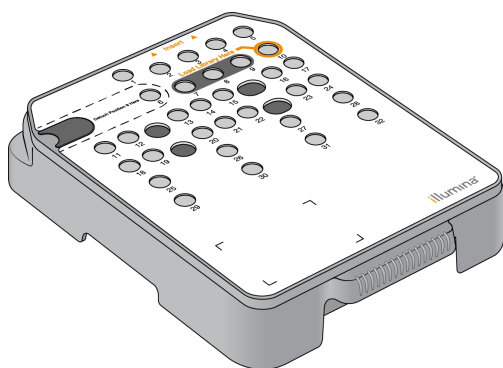
Хотя проточная кювета содержит четыре дорожки, на проточной кювете секвенируется только одна библиотека или набор объединенных библиотек. Библиотеки загружаются в картридж с реактивами из единого резервуара и автоматически переносятся в проточную кювету на все четыре дорожки.

Каждая дорожка визуализируется в небольших областях визуализации, называемых плитками. Дополнительную информацию см. в разделе *Плитки проточной кюветы* на стр. 54.

Обзор картриджа с реактивами

Картридж с реактивами представляет собой одноразовый расходный материал с меткой RFID, содержащий запаянные фольгой емкости, предварительно заполненные реактивами для кластеризации и секвенирования.

Рисунок 4. Картридж с реактивами



Картридж с реактивами содержит специальную емкость для загрузки подготовленных библиотек. После начала цикла библиотеки автоматически переносятся из емкости в проточную кювету.

Несколько емкостей зарезервированы для автоматической промывки после цикла. Промывочный раствор выкачивается из картриджа с буфером в зарезервированные емкости, прокачивается через систему и подается в контейнер для использованных реактивов.

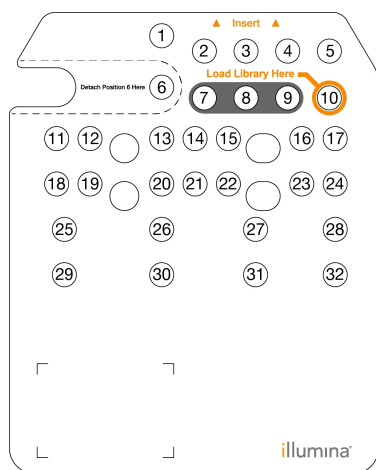


ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Этот комплект реактивов содержит потенциально опасные химические вещества. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Используйте соответствующие опасности средства индивидуальной защиты, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат. К использованным реактивам нужно относиться как к химическим отходам и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, национальными и местными законодательными и нормативными актами. Подробную информацию об окружающей среде, охране здоровья и технике безопасности см. в паспорте безопасности на веб-сайте support.illumina.com/sds.html.

Зарезервированные емкости

Рисунок 5. Пронумерованные емкости



Положение	Описание
7, 8 и 9	Подготовлены для дополнительных пользовательских праймеров
10	Загрузка библиотек

Дополнительную информацию пользовательских праймерах см. в документе «Руководство по пользовательским праймерам NextSeq» (документ № 15057456).

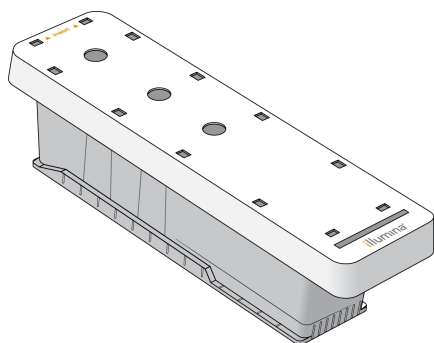
Съемная емкость в положении № 6

Предварительно заполненный картридж с реактивами в положении 6 содержит реактив для денатурирования, в состав которого входит формамид. Для обеспечения безопасной утилизации неиспользованного реактива после запуска емкость в положении номер шесть является съемной. Дополнительную информацию см. в разделе [Удаление использованной емкости из положения № 6](#) на стр. 25.

Обзор картриджа с буфером

Картридж с буфером представляет собой одноразовый расходный материал, содержащий три емкости, предварительно заполненные буферным и промывочным раствором. Содержимого картриджа с буфером хватит для секвенирования одной проточной кюветы.

Рисунок 6. Картридж с буфером



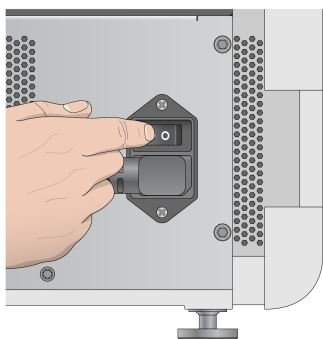
Глава 2. Начало работы

Включение и начало работы прибора	10
Пользовательские настройки системы	10
Пользовательская настройка запуска	12
Расходные материалы и оборудование, приобретаемые пользователем	13

Включение и начало работы прибора

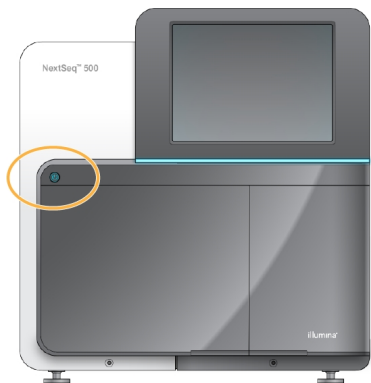
Переведите сетевой выключатель в положение I (вкл.).

Рисунок 7. Переключатель питания расположен на задней панели прибора



- 1 Нажмите кнопку питания над отсеком реактивов. Кнопка питания включает питание прибора и запускает встроенный компьютер и программное обеспечение прибора.

Рисунок 8. Кнопка питания расположена на передней панели прибора



- 2 Дождитесь окончания загрузки операционной системы.
Управляющее программное обеспечение NextSeq (NCS) автоматически запускает и инициализирует систему. По завершении шага инициализации откроется главная страница.
- 3 Если система настроена для запроса учетных данных при входе, дождитесь загрузки системы, а затем выполните вход в операционную систему. При необходимости свяжитесь с системным администратором, чтобы узнать имя пользователя и пароль для входа в систему.

Пользовательские настройки системы

Управляющее программное обеспечение включает изменяемые пользователем настройки для следующих элементов. Чтобы изменить настройки конфигурации сети, обратитесь к разделу *Конфигурирование настроек системы* на стр. 45.

- ▶ Настройки идентификатора прибора (аватар и пользовательское название)
- ▶ Настройка опции клавиатуры и звукового индикатора
- ▶ Настройка пользовательских наборов параметров
- ▶ Настройка проверки обновлений программного обеспечения через BaseSpace Sequence Hub.
- ▶ Настройка передачи данных о производительности прибора

Настройки аватара и пользовательского названия прибора

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Выберите опцию **System Customization** (Настройка системы).
- 3 Чтобы назначить предпочтительное изображение (аватар) для прибора, выберите **Browse** (Обзор) и перейдите к изображению.
- 4 В поле NickName (Пользовательское название прибора) введите желаемое название для прибора.
- 5 Выберите **Save** (Сохранить), чтобы сохранить настройки и перейти к следующему экрану. Изображение и название будут отображаться в левом верхнем углу каждого экрана.

Настройка опции клавиатуры и звукового индикатора

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Выберите опцию **System Customization** (Настройка системы).
- 3 Отметьте поле **Use on-screen keyboard** (Использовать экранную клавиатуру), чтобы активировать экранную клавиатуру для ввода данных в прибор.
- 4 Установите отметку для **Play audio** (Воспроизводить звук), чтобы включить звуковую индикацию для следующих событий:
 - ▶ инициализация прибора;
 - ▶ начало цикла;
 - ▶ возникновение определенных ошибок;
 - ▶ необходимость вмешательства пользователя;
 - ▶ окончание цикла.
- 5 Выберите **Save** (Сохранить), чтобы сохранить настройки и перейти к следующему экрану.

Настройка пользовательских наборов параметров

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Выберите опцию **System Customization** (Настройка системы).
- 3 Поставьте отметку в поле **Enable Custom Recipes** (Включить пользовательские наборы параметров), чтобы можно было выбрать также и пользовательский набор параметров при загрузке картриджей с реактивами. Дополнительную информацию вы можете найти в разделе *Пользовательские наборы параметров и папки наборов параметров на стр. 42*.
- 4 Выберите **Save** (Сохранить), чтобы сохранить настройки и перейти к следующему экрану.

Настройка проверки обновлений программного обеспечения через BaseSpace

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).

- 2 Выберите опцию **System Customization** (Настройка системы).
- 3 Поставьте отметку в поле **Automatically check for new software updates on BaseSpace** (Автоматически проверять новые обновления программного обеспечения на BaseSpace) для включения автоматических проверок обновлений службы BaseSpace Sequence Hub. Автоматическая проверка обновлений выполняется каждые 24 часа. Когда появляется обновление, в следующих местах появятся уведомления.
 - ▶ На странице экрана Manage Instrument (Управление прибором) на кнопке Software Update (Обновление ПО).
 - ▶ На кнопке Manage Instrument (Управление прибором), находящейся на главной странице экрана.
- 4 Выберите **Save** (Сохранить), чтобы сохранить настройки и перейти к следующему экрану.

Настройка передачи данных о производительности прибора

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Выберите опцию **System Customization** (Настройка системы).
- 3 Выберите **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Отправить данные производительности прибора предприятию Illumina), чтобы включить службу мониторинга Illumina Proactive. Название настройки в интерфейсе программного обеспечения может отличаться от названия в настоящем руководстве, в зависимости от используемой версии NCS.

При включении этой настройки на предприятие Illumina будут отправляться данные о производительности прибора. Эти данные помогают предприятию Illumina в поиске и устранении неисправностей и в распознавании потенциальных сбоев, позволяя выполнять профилактическое техническое обслуживание и увеличивать продолжительность работоспособности прибора. Дополнительную информацию о пользе такого обслуживания см. в документе «*Техническая записка компании Illumina о профилактическом обслуживании (Illumina Proactive Technical Note)*» (документ №1000000052503)

Данная служба:

- ▶ не отправляет данные секвенирования;
 - ▶ требует подключения прибора к сети с доступом в интернет;
 - ▶ по умолчанию включена. Чтобы отказаться от использования этой службы, снимите флажок **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Отправить данные производительности прибора предприятию Illumina).
- 4 Выберите **Save** (Сохранить), чтобы сохранить настройки и перейти к следующему экрану.

Пользовательская настройка запуска

Управляющее программное обеспечение предоставляет возможность пользовательской настройки предпочтительных вариантов настроек запуска, а также параметров слива неиспользованных реактивов.

Настройка параметров подготовки запуска

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Выберите опцию **System Customization** (Настройка системы).

- Установите флажок **Use Advanced Load Consumables** (Использовать функцию расширенной загрузки расходных материалов), чтобы загружать все расходные материалы для цикла через один экран.
- Выберите опцию **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Пропустить подтверждение проверки перед запуском), чтобы секвенирование начиналось автоматически после успешной проверки автоматике.
- Выберите **Save** (Сохранить), чтобы сохранить настройки и выйти из экрана.

Настройка функции автоматического слива

- На главной странице экрана выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- Выберите опцию **System Customization** (Настройка системы).
- Установите флажок **Purge Consumables at End of Run** (Сливать расходные материалы в конце запуска), чтобы неиспользованные реактивы из картриджа с реактивами автоматически сливались в контейнер с использованными реактивами после запуска.



ПРИМЕЧАНИЕ

Выполнение слива расходных материалов автоматически увеличивает продолжительность рабочего процесса.

- Выберите **Save** (Сохранить), чтобы сохранить настройки и выйти из экрана.

Расходные материалы и оборудование, приобретаемые пользователем

Для работы прибора NextSeq 500 используются следующие расходные материалы и оборудование.

Расходные материалы для запусков секвенирования, приобретаемые пользователем

Расходный материал	Поставщик	Цель
1 Н NaOH (гидроксид натрия)	Основной поставщик лаборатории	Денатурирование библиотеки, разбавляется до 0,2 Н
200 мМ трис-HCl, pH 7	Основной поставщик лаборатории	Денатурирование библиотеки
Спиртовые салфетки, 70-процентный изопропиловый спирт или 70-процентный этиловый спирт	VWR № по каталогу: 95041-714 (или эквивалент). Основной поставщик лаборатории	Очистка проточной кюветы; общего назначения
Низковорсные лабораторные салфетки	VWR № по каталогу: 21905-026 (или эквивалент)	Очистка проточной кюветы

Расходные материалы для технического обслуживания прибора, приобретаемые пользователем

Расходный материал	Поставщик	Цель
Раствор NaOCl, 5-процентный (гипохлорит натрия)	Sigma-Aldrich, № по каталогу 239305 (или эквивалент лабораторного класса)	Мытье прибора с использованием ручной промывки прибора после запуска; разбавленный до 0,12 %
Твин 20	Sigma-Aldrich, № по каталогу P7949	Мытье прибора с использованием ручной промывки; разбавленный до 0,05 %
Вода лабораторного класса	Основной поставщик лаборатории	Мытье прибора (ручная промывка)
Метанол, чистый для анализа или для спектрофотометрического анализа, или изопропиловый спирт (99%-ный), бутылка 100 мл	Основной поставщик лаборатории	Периодическая оценка оптических компонентов и обслуживание картриджа для очистки объектива
Воздушный фильтр	Illumina, № по каталогу: 20022240	Для приборов, доступ к воздушным фильтрам которых осуществляется с задней панели. Очистка воздуха, который поступает в прибор для охлаждения.

Указания в отношении воды лабораторного класса

При работе с прибором используйте только воду лабораторного класса или деионизированную воду. Запрещается использовать водопроводную воду. Разрешается использовать только воду следующих классов (или эквивалентного качества):

- ▶ деионизированная вода;
- ▶ очищенная вода Illumina PW1;
- ▶ вода с сопротивлением 18 МОм (мегаом);
- ▶ вода Milli-Q;
- ▶ вода Super-Q;
- ▶ вода для молекулярно-биологических задач.

Оборудование, приобретаемое пользователем

Позиция	Источник
Морозильная камера, не требующая размораживания, с температурой от -25 до -15 °C	Основной поставщик лаборатории
Емкость для льда	Основной поставщик лаборатории
Холодильник, от 2 до 8 °C	Основной поставщик лаборатории

Глава 3. Секвенирование

Введение	15
Создание запуска с помощью программного обеспечения Local Run Manager	16
Создание запуска в NSC	16
Подготовка картриджа с реактивами	17
Подготовка проточной кюветы	17
Подготовка библиотек к секвенированию	18
Подготовка запуска секвенирования	19
Отслеживание выполнения запуска	26
Автоматическая промывка после запуска	28

Введение

Чтобы выполнить запуск секвенирования на NextSeq 500, подготовьте картридж с реактивами и проточную кювету. Затем следуйте приглашениям программного обеспечения для настройки запуска и начала его выполнения. Генерация кластеров и секвенирование выполняются на приборе. После выполнения запуска автоматически начнется промывка прибора с использованием компонентов, уже загруженных для проведения запуска.

Генерация кластеров

Во время генерации кластеров отдельные молекулы ДНК связываются с поверхностью проточной кюветы, затем происходит амплификация для формирования кластеров.

Секвенирование

Кластеры визуализируются с использованием химических реакций для двухканального секвенирования и комбинации фильтров, специфичной для каждого прерывающего цепь нуклеотида с флуоресцентной меткой. После завершения визуализации плитки проточной кюветы выполняется визуализация следующей плитки. Процесс повторяется для каждого цикла в цикле секвенирования. После анализа изображений программное обеспечение выполняет распознавание оснований, фильтрацию и оценку качества.

Отслеживайте ход выполнения запуска и его статистические показатели в следующих местоположениях:

- ▶ интерфейсе NCS;
- ▶ BaseSpace Sequence Hub;
- ▶ Local Run Manager;
- ▶ Через соединенный с сетью компьютер, пользующийся программным обеспечением Sequencing Analysis Viewer (SAV). См. раздел *Средство просмотра анализов секвенирования* на стр. 28.

Анализ

По мере выполнения запуска управляющее программное обеспечение автоматически переносит файлы распознанных оснований (BCL) в BaseSpace Sequence Hub, Local Run Manager или в другое указанное место для выходных данных, где может быть проведен их вторичный анализ.

В зависимости от используемого приложения доступны несколько методов анализа. Дополнительную информацию об этом можно найти в разделе справки по *BaseSpace* (help.basespace.illumina.com) или в «Руководстве по программному обеспечению *Local Run Manager*» (документ № 100000002702).

Продолжительность запуска секвенирования

Общая продолжительность запуска секвенирования зависит от количества выполняемых в нем циклов. Максимальную продолжительность имеет запуск с секвенированием парных концевых фрагментов по 150 циклов в каждом считывании (2 x 150) и дополнительно до восьми циклов в каждом из 2 считываний индекса.

Информация об ожидаемой продолжительности запусков и другие характеристики системы приведены на странице технических характеристик системы [NextSeq 500](#) на веб-сайте компании Illumina.

Число циклов в одном считывании

Количество циклов, выполненных в одном считывании во время цикла секвенирования, превышает количество проанализированных циклов на один. Например, для цикла секвенирования парных концевых фрагментов в 150 циклах выполняется 151-цикловое считывание (2 x 151), общее число циклов составляет 302. В конце цикла секвенирования будет проанализировано 2 x 150 циклов. Для расчетов, касающихся предварительного и основного фазирования, необходим еще один дополнительный цикл.

Создание запуска с помощью программного обеспечения *Local Run Manager*

Процесс настройки запуска и параметры анализа в программном обеспечении *Local Run Manager* отличаются в зависимости от того, какой модуль рабочих процессов анализа вы используете. Конкретные указания о том, как создать запуск, приводятся в руководстве эксплуатации модуля *Local Run Manager*.

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Edit Runs** (редактировать запуски).
- 2 Выберите опцию **Create Run** в окне информационной панели *Local Run Manager*, затем выберите модуль анализа.
- 3 Введите название запуска, укажите образцы, входящие в программу запуска и импортируйте декларации, если они есть.
- 4 Сохраните запуск и закройте окно информационной панели *Local Run Manager*.

Чтобы создать запуск в NCS, то есть без применения *Local Run Manager*, воспользуйтесь ручным режимом проведения запуска. См. разделы *Создание запуска в NCS* на стр. 16 и *Режимы запусков* на стр. 19.

Создание запуска в NCS

Если вы создаете запуск с помощью NCS (в ручном режиме запуска), параметры запуска и анализа вводятся непосредственно перед тем, как будет загружена проточная кювета.

- 1 Ознакомьтесь с тем, какие параметры запуска и анализа вам понадобятся, в разделе *Ввод параметров запуска и анализа в NCS (ручной режим выполнения запуска)* на стр. 21.

- 2 Определите параметры запуска и анализа сразу, чтобы не задерживать начало запуска секвенирования.

Подготовка картриджа с реактивами

- 1 Извлеките картридж с реактивами из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.
- 2 Поместите картридж на водяную баню комнатной температуры до размораживания (~60 минут). Не погружайте картридж в воду.
- 3 Осторожно постучите картриджем по поверхности стола, чтобы удалить воду с основания картриджа, затем просушите основание.



ПРИМЕЧАНИЕ

[Альтернативный метод.] Оставьте реактивы для размораживания при температуре от 2 до 8 °C на ночь. Для размораживания реактивов требуется не менее 18 часов. При такой температуре реактивы остаются стабильными до 1 недели.

- 4 Переверните картридж пять раз для перемешивания реактивов.
- 5 Убедитесь, что реактивы в позициях 29, 30, 31 и 32 оттаяли.
- 6 Осторожно постучите картриджем по поверхности стола, чтобы уменьшить количество пузырьков воздуха.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Этот комплект реактивов содержит потенциально опасные химические вещества. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Используйте соответствующие опасности средства индивидуальной защиты, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат. К использованным реактивам нужно относиться как к химическим отходам и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, национальными и местными законодательными и нормативными актами. Подробную информацию об окружающей среде, охране здоровья и технике безопасности см. в паспорте безопасности на веб-сайте support.illumina.com/sds.html.

Подготовка проточной кюветы

- 1 Извлеките упаковку с новой проточной кюветой из места хранения с температурой от 2 до 8 °C.
- 2 Оставьте невскрытую упаковку проточной кюветы при комнатной температуре на 30 минут.

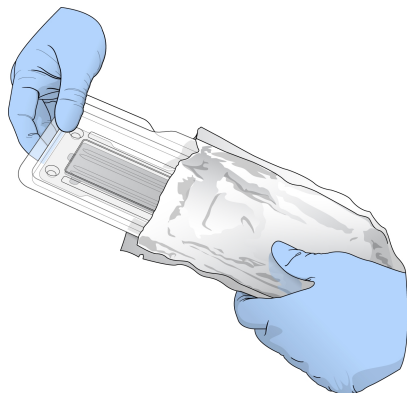


ПРИМЕЧАНИЕ

Если упаковка из фольги не повреждена, проточная кювета может находиться при комнатной температуре до 12 часов. Избегайте повторного охлаждения и нагревания проточной кюветы.

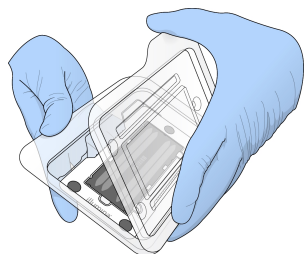
- 3 Извлеките проточную кювету из упаковки из фольги.

Рисунок 9. Извлечение из упаковки из фольги



- Откройте прозрачную пластмассовую коробку и достаньте проточную кювету.

Рисунок 10. Извлечение из пластмассовой коробки



- Очистите стеклянную поверхность проточной кюветы безворсовой спиртовой салфеткой. Протрите стекло низковорсной лабораторной салфеткой.

Подготовка библиотек к секвенированию

Объем библиотеки и ее загрузочная концентрация отличаются в зависимости от того, какие версии NCS у вас установлены.

Версия управляющего программного обеспечения	Объем библиотеки	Концентрация библиотеки
NCS версии 1.3 или более поздней	1,3 мл	1,8 пМ
NCS версии 1.2 или более ранней	3 мл	3 пМ

Денатурация и разбавление библиотек

Денатурируйте ваши библиотеки и разбавьте их до указанных ниже загрузочных объемов и концентраций.

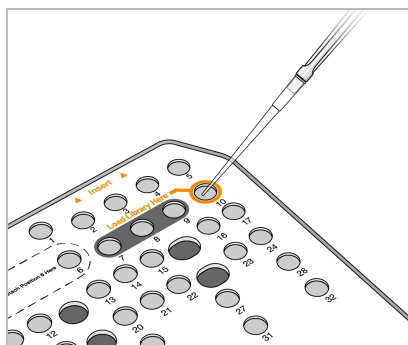
Тип комплекта	Загрузочный объем	Загрузочная концентрация
Высокий выход	1,3 мл	1,8 пМ
Средний выход	1,3 мл	1.5 пмоль/л

На практике концентрация при загрузке может колебаться в зависимости от методик подготовки библиотеки и количественного определения. Инструкции см. в разделе «Руководство по денатурации и разбавлению библиотек системы NextSeq» (документ № 15048776).

Загрузка библиотек на картридж с реактивами

- 1 Протрите крышку из фольги, закрывающую емкость № 10 с маркировкой **Load Library Here** (Место загрузки библиотеки), салфеткой из маловорсовой ткани.
- 2 Проколите крышку чистым наконечником пипетки на 1 мл.
- 3 Загрузите 1,3 мл подготовленных библиотек концентрацией 1,8 пМ в емкость номер 10 с маркировкой Load Library Here (**Место загрузки библиотеки**). Не касайтесь крышки из фольги во время распределения библиотек.

Рисунок 11. Загрузка библиотек



Подготовка запуска секвенирования

- 1 На главной странице выберите опцию **Experiment** (Эксперимент).
- 2 На странице экрана Select Assay (Выбор метода анализа) выберите **Sequence** (Секвенирование).
В результате выполнения команды Sequence (Секвенирование) откроется дверца отсека визуализации, будут выведены расходные материалы, оставшиеся от предыдущего запуска, и откроется серия экранов подготовки запуска. Короткая задержка является нормальной.

Режимы запусков

При настройке запуска секвенирования вы выбираете один из следующих режимов запуска для того, чтобы определить, где будет вводиться информация о запуске и как будут анализироваться данные.

Режим выполнения запуска	Информация о запуске	Анализ данных*
Local Run Manager	Ввод в Local Run Manager.	Программное обеспечение сохраняет данные в указанную папку выходных данных для дальнейшего автоматического анализа в Local Run Manager.
Вручную	Ввод в NCS.	Программное обеспечение сохраняет данные в указанную выходную папку для последующего анализа вне прибора.

* Для целей анализа можно соединить BaseSpace Sequence Hub с любым режимом выполнения запуска. Когда в качестве режима выполнения запуска задан Local Run Manager с настроенным приложением BaseSpace Sequence Hub, данные будут анализироваться в обоих приложениях.

Local Run Manager — это режим выполнения запуска, устанавливаемый по умолчанию, и он обеспечивает наиболее беспроблемный рабочий процесс. Вы создаете и сохраняете запуски в программе Local Run Manager. Затем информация перенаправляется в управляющее программное обеспечение, где вы выбираете запуск и продолжаете его настройку. После секвенирования Local Run Manager автоматически выполняет анализ данных. Отдельные протоколы анализов и приложения для анализа в этом случае не нужны.



ПРИМЕЧАНИЕ

Local Run Manager не является функцией управляющего программного обеспечения. Это встроенное программное обеспечение, в котором можно записывать образцы для секвенирования, указывать параметры запуска и выполнять анализ данных.

Служба BaseSpace Sequence Hub (дополнительно)

При настройке запуска секвенирования можно выбрать одну из следующих опций работы службы BaseSpace Sequence Hub.


Параметр	Описание и требования
Run Monitoring and Storage (Мониторинг и хранение данных запуска)	Отправляет файлы InterOp, файлы журналов и данные запуска в BaseSpace Sequence Hub для дистанционного мониторинга и анализа. Требуются учетная запись BaseSpace Sequence Hub, интернет-соединение и протокол анализа.
Run Monitoring Only (Только мониторинг запуска)	Направляет файлы InterOp и файлы журнала в BaseSpace Sequence Hub для дистанционного мониторинга запуска. Эта опция включена по умолчанию. Требует наличия учетной записи BaseSpace Sequence Hub и подключения к интернету.

Выбор режима выполнения запуска и BaseSpace Sequence Hub

- 1 На странице экрана Run Setup (Подготовка запуска) выберите один из указанных ниже режимов выполнения запуска.
 - ▶ Local Run Manager
 - ▶ Вручную
- 2 **[Дополнительно]** Нажмите **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Использовать настройку BaseSpace Sequence Hub) и выберите один из следующих вариантов.
 - ▶ Run Monitoring and Storage (Мониторинг запуска и хранение)
 - ▶ Run Monitoring Only (Только мониторинг запуска)
 Введите имя пользователя BaseSpace Sequence Hub и пароль.
 Если будет предложено, выберите рабочую группу, чтобы загрузить в нее данные о запуске. Предложение будет показано только тем пользователям, которые относятся к нескольким рабочим группам.
- 3 Нажмите **Next** (Далее).

Выбор запуска (выполнение запуска в режиме Local Run Manager)

- 1 Выберите название запуска из списка доступных запусков. Используйте стрелки вверх и вниз для прокрутки списка или введите название запуска в поле Search (Искать).
- 2 Подтвердите параметры запуска.
 - ▶ **Run Name** (Название запуска) — название запуска, присвоенное в Local Run Manager.

- ▶ **Library ID** (Идентификатор библиотеки) — название объединенных библиотек, присвоенное в Local Run Manager.
 - ▶ **Recipe** (Набор параметров) — название набора параметров: либо **NextSeq High**, либо **NextSeq Mid** — в зависимости от того, какой картридж с реактивами используется для запуска.
 - ▶ **Read Type** (Тип считывания) — для одного считывания или парный концевой фрагмент
 - ▶ **Read Length** (Длина считывания) — количество циклов в каждом считывании.
 - ▶ **[Дополнительно]** — пользовательские праймеры, если они имеются.
- 3 **[Необязательно]** Нажмите на значок **Edit**  (Редактировать) для изменения параметров запуска. По окончании нажмите **Save** (Сохранить).
- ▶ **Run parameters** (Параметры запуска) — изменение количества считываний или циклов в считывании.
 - ▶ **Custom primers** (Пользовательские праймеры) — изменение настроек пользовательских праймеров. Дополнительную информацию см. в документе «Руководство по пользовательским праймерам NextSeq» (документ № 15057456).
 - ▶ **Purge consumables for this run** (Сливать расходные материалы в данном запуске) — изменение настройки для включения автоматического слива расходных материалов после текущего запуска.
- 4 Нажмите **Next** (Далее).

Ввод параметров запуска и анализа в NCS (ручной режим выполнения запуска)

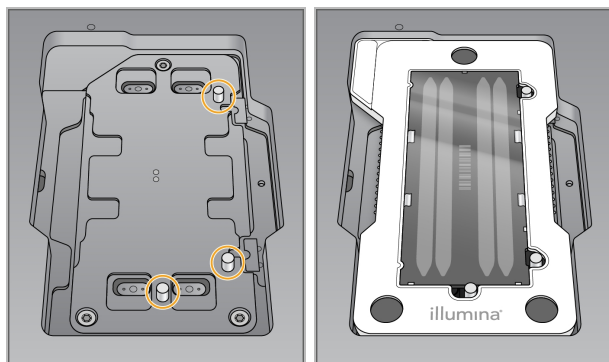
- 1 Введите предпочитаемое вами название запуска.
- 2 **[Дополнительно]** Введите предпочтительный идентификатор библиотеки.
- 3 Из выпадающего списка Recipe (Набор параметров) выберите набор параметров. В списке перечисляются только совместимые наборы параметров.
- 4 Выберите тип считывания — **для одного считывания** или **парный концевой фрагмент**.
- 5 Введите число циклов для каждого считывания в запуске секвенирования.
 - ▶ **Read 1** (Считывание 1) — введите значение до 151 цикла.
 - ▶ **Read 2** (Считывание 2) — введите значение до 151 цикла. Обычно здесь устанавливается такое же число циклов, какое выбрано для Read 1 (Считывание 1).
 - ▶ **Index 1** (Индекс 1) — введите количество циклов, необходимое для праймера Index 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** (Индекс 2) — введите количество циклов, необходимое для праймера Index 2 (i5).
 Управляющее программное обеспечение подтверждает, что введенные данные удовлетворяют следующим критериям.
 - ▶ Общее число циклов не превышает максимально допустимое число циклов.
 - ▶ Количество циклов считывания 1 превышает 5 циклов, используемых для создания шаблона.
 - ▶ Число циклов считывания индекса не превышает число циклов считывания 1 и считывания 2.
- 6 **[Дополнительно.]** Если используются пользовательские праймеры, поставьте отметки для используемых праймеров. Дополнительную информацию см. в документе «Руководство по пользовательским праймерам NextSeq» (документ № 15057456).
 - ▶ **Read 1** (Считывание 1) — пользовательский праймер для считывания 1.

- ▶ **Read 2** (Считывание 2) — пользовательский праймер для считывания 2.
 - ▶ **Index 1** (Индекс 1) — пользовательский праймер для индекса 1.
 - ▶ **Index 2** (Индекс 2) — пользовательский праймер для индекса 2.
- 7 Настройте папки сохранения выходных данных для текущего запуска. Выберите **Browse** (Обзор), чтобы переместиться к желаемому сетевому местоположению. Информацию о требованиях к выходным папкам см. раздел *Настройка расположения выходной папки на стр. 47*.
 - 8 Выберите **Browse** (Обзор), чтобы перейти к протоколу анализа. Для систем, настроенных на ручной режим мониторинга цикла и хранения в BaseSpace Sequence Hub, требуется протокол.
 - 9 Выберите **Purge consumables for this run** (Удаление расходных материалов этого запуска) Данная функция автоматически удаляет расходные материалы после запуска.
 - 10 Нажмите **Next** (Далее).
 - 11 **[Необязательно]** Нажмите на значок Edit (Редактировать) для изменения параметров запуска.
 - 12 Нажмите **Next** (Далее).

Загрузка проточной кюветы

- 1 Извлеките проточную кювету, использованную в предыдущем цикле.
- 2 Воспользуйтесь направляющими штырями, чтобы установить проточную кювету на площадке.

Рисунок 12. Загрузка проточной кюветы



- 3 Нажмите **Load** (Загрузка). Дверца автоматически закроется, на экране появится идентификационный номер проточной кюветы, и будет выполняться проверка датчиков.
- 4 Нажмите **Next** (Далее).

Опорожнение контейнера с использованными реактивами

- 1 Снимите контейнер с использованными реактивами и утилизируйте содержимое согласно применимым стандартам.

Рисунок 13. Извлечение контейнера с использованными реактивами



ПРИМЕЧАНИЕ

Извлекая контейнер, поддерживайте его снизу второй рукой.

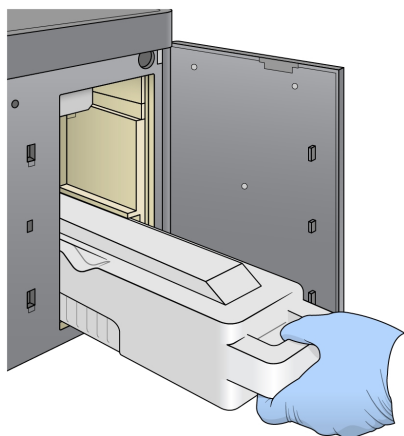


ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Этот комплект реактивов содержит потенциально опасные химические вещества. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Используйте соответствующие опасности средства индивидуальной защиты, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат. К использованным реактивам нужно относиться как к химическим отходам и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, национальными и местными законодательными и нормативными актами. Подробную информацию об окружающей среде, охране здоровья и технике безопасности см. в паспорте безопасности на веб-сайте support.illumina.com/sds.html.

- 2 Вставьте пустой контейнер для использованных реактивов в буферный отсек до упора. Отчетливый щелчок указывает на то, что контейнер установлен на место.

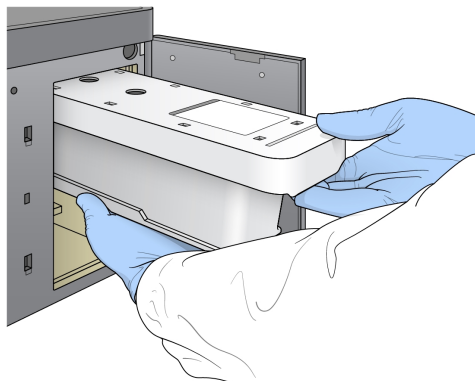
Рисунок 14. Загрузка пустого контейнера для использованных реактивов



Загрузка картриджа с буфером

- 1 Извлеките использованный картридж с буфером из верхнего отсека.
- 2 Вставьте новый картридж с буфером в буферный отсек до упора. Отчетливый щелчок укажет на то, что картридж установлен на место, идентификационный номер картриджа с буфером появится на экране, и будет выполнена проверка датчика.

Рисунок 15. Загрузка картриджа с буфером



- 3 Закройте дверцу буферного отсека и выберите **Next** (Далее).

Загрузка картриджа с реактивами

- 1 Извлеките использованный картридж с реактивом из отсека реактивов. Утилизируйте неизрасходованное содержимое в соответствии с применимыми стандартами.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Этот комплект реактивов содержит потенциально опасные химические вещества. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Используйте соответствующие опасности средства индивидуальной защиты, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат. К использованным реактивам нужно относиться как к химическим отходам и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, национальными и местными законодательными и нормативными актами. Подробную информацию об окружающей среде, охране здоровья и технике безопасности см. в паспорте безопасности на веб-сайте support.illumina.com/sds.html.

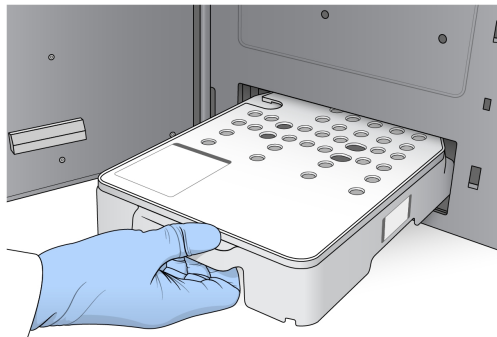


ПРИМЕЧАНИЕ

Для облегчения безопасной утилизации неиспользованного реактива емкость в положении 6 является съемной. Дополнительную информацию см. в разделе *Удаление использованной емкости из положения № 6* на стр. 25.

- 2 Установите картридж с реактивом в отсек реактивов до упора, затем закройте дверцу отсека реактивов.

Рисунок 16. Загрузка картриджа с реактивами

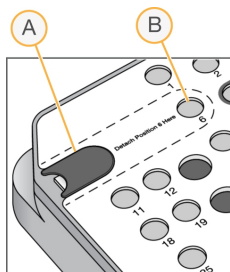


- 3 Нажмите **Load** (Загрузка).
Программное обеспечение автоматически переместит картридж на место (~30 секунд), на экране появится идентификационный номер картриджа с реактивом, и будет выполнена проверка датчиков.
- 4 Нажмите **Next** (Далее).

Удаление использованной емкости из положения № 6

- 1 После того как вы извлечете **использованный** картридж с реактивами из прибора, снимите защитное резиновое покрытие с отверстия, расположенного рядом с положением № 6.

Рисунок 17. Сменное положение № 6







- A Защитное резиновое покрытие
- B Положение № 6



- 2 Надавите на прозрачный пластмассовый язычок влево, чтобы извлечь емкость.
- 3 Утилизируйте емкость в соответствии с применимыми стандартами.


Обзор автоматической проверки

Программное обеспечение выполняет автоматическую проверку системы. Во время проверки на экране появляются следующие индикаторы.

- ▶  **Отметка серого цвета** — эта проверка еще не производилась.
- ▶ **Значок выполнения**  — идет проверка.
- ▶  **Отметка зеленого цвета** — эта проверка выполнена успешно.

- ▶ **Красный значок**  — проверка выявила неисправности. Перед продолжением работы следует выполнить необходимые действия для любого элемента, не прошедшего проверку. См. раздел *Исправление ошибок автоматической проверки* на стр. 38.

Чтобы остановить выполнение автоматической проверки, нажмите на значок  в правом нижнем углу. Чтобы снова запустить проверку, нажмите на значок . Проверка возобновляется с момента первой незавершенной или невыполненной проверки.

Для просмотра результата каждой отдельной проверки в категории выберите значок  и разверните категорию.



ПРИМЕЧАНИЕ

При первом запуске секвенирования в NCS версии 4.0 или более поздней регистрация проточной кюветы может занять более 15 минут в ходе автоматической проверки системы.

Начало выполнения запуска

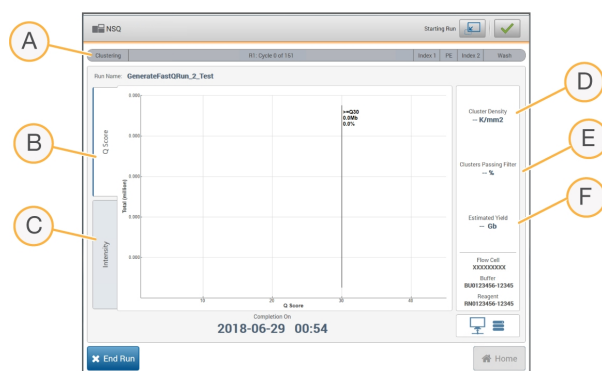
После завершения автоматической проверки нажмите **Start** (Пуск). Начнется запуск секвенирования.

Сведения по настройке системы на автоматическое выполнение запуска после успешной проверки см. в разделе *Настройка параметров подготовки запуска* на стр. 12.

Отслеживание выполнения запуска

- 1 Отслеживание выполнения запуска, интенсивности и баллы за качество отображаются на экране в виде числовых показателей запуска.

Рисунок 18. Выполнение и числовые показатели запуска секвенирования



- A **Run progress** (Выполнение запуска) — отображает текущий этап и количество завершенных циклов для каждого считывания. Изменение индикатора выполнения непропорционально скорости выполнения каждого этапа запуска. Для оценки реального времени, оставшегося до завершения, используйте счетчик времени в правом верхнем углу.
- B **Q-Score** (Баллы качества) — показывает распределение оценок качества (Q-score). См. раздел *Оценка качества* на стр. 52.
- C **Intensity** (Интенсивность) — служит для отображения значения интенсивностей кластера 90-го перцентиля для каждой плитки. Цвета на графике соответствуют основаниям: A —

красного цвета, С — зеленого цвета, G — синего цвета и T — черного цвета. Цвета совпадают с индикаторами оснований в программном обеспечении для анализа секвенирования Sequencing Analysis Software (SAV).

- D **Cluster Density (K/mm²)** (Плотность кластеров [K/мм²]) — показывает количество кластеров, обнаруженных во время цикла.
- E **Clusters Passing Filter (%)** (Кластеры, проходящие фильтр [%]) — показывает долю кластеров, проходящих фильтр. См. раздел *Кластеры, проходящие фильтр на стр. 52*.
- F **Estimated Yield (Gb)** (Оценка выхода [Гб]) — показывает число оснований, распознанных в цикле секвенирования.



ПРИМЕЧАНИЕ

После выбора Home (Главная страница) вернуться для просмотра числовых показателей цикла секвенирования невозможно. Однако числовые показатели запуска остаются доступны в BaseSpace Sequence Hub. Их также можно просмотреть на автономном компьютере, используя программу Sequencing Analysis Viewer (SAV).

Циклы для числовых показателей запуска

Числовые показатели отображаются на разных этапах запуска.

- ▶ На этапах генерации кластеров числовые показатели не отображаются.
- ▶ Первые пять циклов отводятся для создания шаблона.
- ▶ Числовые показатели запуска появляются после 25-го цикла и включают плотность кластеров, количество кластеров, проходящих через фильтр, выход и баллы качества.

Передача данных

В зависимости от выбранной конфигурации анализа на экране во время выполнения запуска появляются различные значки, указывающие на состояние передачи данных.

Состояние	Local Run Manager	Папка выходных данных	Illumina BaseSpace
Подключено			
Подключено и идет передача данных			
Отключено			
Выключено			

Если передача данных во время цикла прерывается, данные временно сохраняются на компьютере прибора. Когда соединение восстанавливается, передача данных возобновляется автоматически. Если подключение не восстанавливается до окончания цикла, вручную извлеките данные из компьютера прибора до запуска следующего цикла.

Служба универсального копирования Universal Copy Service

В комплект программного обеспечения системы NextSeq входит служба универсального копирования Universal Copy Service. Программа RTA версии 2 отправляет в службу запрос на копирование файлов из исходного местоположения в целевое местоположение, и служба обрабатывает запросы на копирование в порядке получения. Если имеет место исключение, в файл посылается повторный запрос на копирование, исходя из количества файлов в очереди на копирование.

Средство просмотра анализов секвенирования

Программное обеспечение Sequencing Analysis Viewer служит для просмотра показателей секвенирования, созданных во время запуска. Числовые показатели отображаются в виде графиков, графов и таблиц, основанных на данных, созданных RTA и записанных в файлы InterOp. Числовые показатели обновляются по мере выполнения запуска. Для просмотра обновленных числовых показателей нажмите опцию **Refresh** (Обновить) в любой момент выполнения запуска. Для получения более подробной информации см. «Руководство пользователя программного обеспечения Sequencing Analysis Viewer» (№ по каталогу: 15020619).

Программное обеспечение Sequencing Analysis Viewer входит в комплект программного обеспечения, установленного на компьютере прибора. Программное обеспечение Sequencing Analysis Viewer также можно установить на другом компьютере, входящем в общую с прибором сеть, для удаленного мониторинга числовых показателей запуска.

Автоматическая промывка после запуска

Когда запуск секвенирования завершается, программное обеспечение инициирует автоматическую промывку после запуска. В ходе промывки после запуска используется промывочный раствор, находящийся в буферном картридже, и NaOCl, находящийся в картридже с реактивами.

По завершении цикла секвенирования программное обеспечение запускает автоматическую промывку после цикла с использованием промывочного раствора, содержащегося в картридже с буфером, и раствора NaOCl, содержащегося в картридже с реактивами.

Автоматическая промывка после запуска занимает около 90 минут. По завершении промывки кнопка Home (Главная страница) становится активной. Во время промывки результаты секвенирования по-прежнему отображаются на экране.

После промывки

После промывки сипперные трубки остаются в нижнем положении во избежание попадания воздуха в систему. Не снимайте картриджи до следующего запуска.

Глава 4. Техническое обслуживание

Данная секция описывает процедуры, необходимые для поддержания системы в исправном состоянии, в том числе профилактическую промывку и обновление программного обеспечения. Необходимо своевременно обновлять управляющее программное обеспечение для установки всех последних исправлений и компонентов системы, что обеспечит оптимальную производительность.

Введение

К процедурам технического обслуживания относятся ручная промывка прибора, замена воздушного фильтра и обновление программного обеспечения системы (если обновление доступно).

- ▶ **Промывка прибора** — проведение автоматической промывки после каждого цикла секвенирования позволяет поддерживать эффективность работы прибора. Однако при определенных обстоятельствах требуется периодическая промывка вручную. См. раздел *Выполнение ручной промывки на стр. 29*.
- ▶ **Обновления программного обеспечения** — когда доступна обновленная версия программного обеспечения системы, вы можете установить ее автоматически одним из следующих двух методов:
 - ▶ путем подключения к BaseSpace Sequence Hub;
 - ▶ вручную после загрузки установщика с веб-сайта компании Illumina. См. раздел *Обновление программного обеспечения на стр. 34*.
- ▶ **Замена воздушного фильтра** — если прибор оснащен воздушным фильтром, расположенным на задней панели, его регулярная замена гарантирует надлежащий поток воздуха через прибор.

Профилактическое техническое обслуживание

Компания Illumina рекомендует запланировать ежегодное проведение профилактического технического обслуживания. Если у вас нет контракта на обслуживание, свяжитесь с территориальным специалистом по работе с клиентами или со службой технической поддержки компании Illumina и организуйте платный сеанс профилактического технического обслуживания.

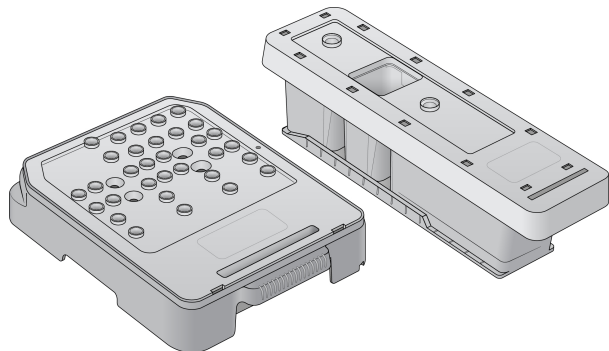
Выполнение ручной промывки

Ручные промывки запускаются с главной страницы. Опции промывки включают быструю промывку и промывку после запуска, выполняемую вручную.

Типы промывки	Описание
Быстрая промывка Длительность: 20 минут	Промывка системы с использованием приобретаемого пользователем промывочного раствора, который состоит из воды лабораторного класса и твина 20 (картридж для промывочного буфера). Требуется проводить через каждые 14 дней простоя прибора, а также после останова прибора.
Ручная промывка после запуска Длительность: 90 минут	Промывка системы с использованием приобретаемого пользователем промывочного раствора, который состоит из воды лабораторного класса и твина 20 (в картридже для промывочного буфера) и 0,12 %-ного раствора гипохлорита натрия (в картридже для промывочного реактива). Требуется проводить в случае невыполнения автоматической промывки после запуска.

Ручная промывка требует использования картриджа для промывочного реактива и картриджа для промывочного буфера, поставляемых с прибором, а также использованной проточной кюветы. Для промывки прибора использованную проточную кювету можно применять до 20 раз.

Рисунок 19. Картридж для промывочного реактива и картридж для промывочного буфера



Подготовка к ручной промывке после запуска

Расходные материалы, приобретаемые пользователем	Объем и описание
<ul style="list-style-type: none"> • NaOCl 	1 мл, разбавленный до 0,12 %. Загружается в картридж для промывочного реактива (позиция № 28).
<ul style="list-style-type: none"> • 100%-ный твин 20 • Вода лабораторного класса 	Используется для приготовления 125 мл промывочного раствора, содержащего 0,05 % твина 20. Загружается в картридж промывочного буфера (центральную емкость).

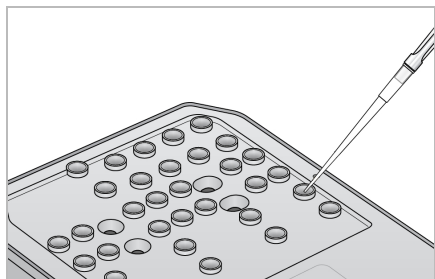


ПРИМЕЧАНИЕ

Используйте только свежеразбавленный раствор NaOCl, приготовленный в течение последних **24 часов**. Если объем приготовленного раствора превышает 1 мл, храните остаток раствора при температуре от 2 до 8 °C и используйте его в течение 24 часов. Если это невозможно, утилизируйте оставшийся разбавленный NaOCl.

- 1 Смешайте в пробирке для микроцентрифуги следующие количества веществ, чтобы получить 1 мл 0,12%-ного раствора NaOCl:
 - ▶ 5 %-ный раствор NaOCl (24 мкл);
 - ▶ вода лабораторного класса (976 мкл).
- 2 Переверните пробирку, чтобы перемешать содержимое.
- 3 Добавьте 1 мл 0,12%-го раствора NaOCl в картридж для промывочного реактива. Правильная емкость эквивалентна положению № 28 в предварительно заполненном картридже.

Рисунок 20. Загрузите NaOCl



- 4 Смешайте следующие объемы растворов для получения 0,05%-ного промывочного раствора твин 20:
 - ▶ 100%-ный твин 20 (62 мкл);
 - ▶ вода лабораторного класса (125 мл).
- 5 Добавьте 125 мл промывочного раствора в центральную емкость картриджа для промывочного буфера.
- 6 Выберите опцию **Perform Wash** (Выполнение промывки), а затем выберите опцию **Manual Post-Run Wash** (Ручная промывка после запуска).

Подготовка к быстрой промывке

Расходные материалы, приобретаемые пользователем	Объем и описание
<ul style="list-style-type: none"> • 100%-ный твин 20 • Вода лабораторного класса 	Используется для приготовления 40 мл промывочного раствора, содержащего 0,05 % твина 20. Загружается в картридж промывочного буфера (центральную емкость).

- 1 Смешайте следующие объемы растворов для получения 0,05%-ного промывочного раствора твин 20:
 - ▶ 100%-ный твин 20 (20 мкл);
 - ▶ вода лабораторного класса (40 мл).
- 2 Добавьте 40 мл промывочного раствора в центральную емкость картриджа для промывочного буфера.
- 3 Выберите опцию **Perform Wash** (Выполнение промывки), а затем выберите опцию **Quick Wash** (Быстрая промывка).

Загрузка использованной проточной кюветы и картриджей для промывки

- 1 Если использованная проточная кювета не установлена, загрузите использованную проточную кювету. Выберите опцию **Load** (Загрузить), а затем — **Next** (Далее).
- 2 Снимите контейнер с использованными реактивами и утилизируйте содержимое согласно применимым стандартам.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Этот комплект реактивов содержит потенциально опасные химические вещества. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Используйте соответствующие опасности средства индивидуальной защиты, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат. К использованным реактивам нужно относиться как к химическим отходам и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, национальными и местными законодательными и нормативными актами. Подробную информацию об окружающей среде, охране здоровья и технике безопасности см. в паспорте безопасности на веб-сайте support.illumina.com/sds.html.

- 3 Вставьте пустой контейнер для использованных реактивов в буферный отсек до упора.
- 4 Извлеките использованный картридж с буфером, если он остался после выполнения предыдущего цикла.
- 5 Загрузите картридж для промывочного буфера, содержащий промывочный раствор.
- 6 Извлеките использованный картридж с реактивом, если он остался после выполнения предыдущего запуска.
- 7 Загрузите картридж для промывочных реактивов.
- 8 Нажмите **Next** (Далее). Автоматически начнется предпромывочная проверка.

Запуск промывки

- 1 Нажмите **Start** (Пуск).
- 2 По завершении промывки выберите **Home** (Главная страница).

После промывки

После промывки сипперные трубки остаются в нижнем положении во избежание попадания воздуха в систему. Не снимайте картриджи до следующего запуска.

Замена воздушного фильтра

В приборах, оснащенных воздушным фильтром, расположенным на задней панели, воздушный фильтр обеспечивает поток воздуха через прибор. Каждые 90 дней программное обеспечение отображает уведомление о необходимости сменить воздушный фильтр. Получив соответствующее приглашение, выберите опцию **Remind in 1 day** (Напомнить через 1 день) или же выполните приведенную ниже процедуру и выберите опцию **Filter Changed** (Фильтр заменен). 90-дневный отсчет обнуляется после того, как вы выберете **Filter Changed** (Фильтр заменен).

- 1 Извлеките новый воздушный фильтр из упаковки и запишите на его рамке дату установки фильтра.

- Надавите книзу на верхнюю часть лотка для воздушного фильтра, расположенного в задней части прибора, чтобы выдвинуть лоток.
- Возьмитесь за верхнюю часть лотка для фильтра и потяните вверх, чтобы полностью извлечь его из прибора.
- Выньте и утилизируйте старый фильтр.
- Вставьте новый воздушный фильтр в лоток.

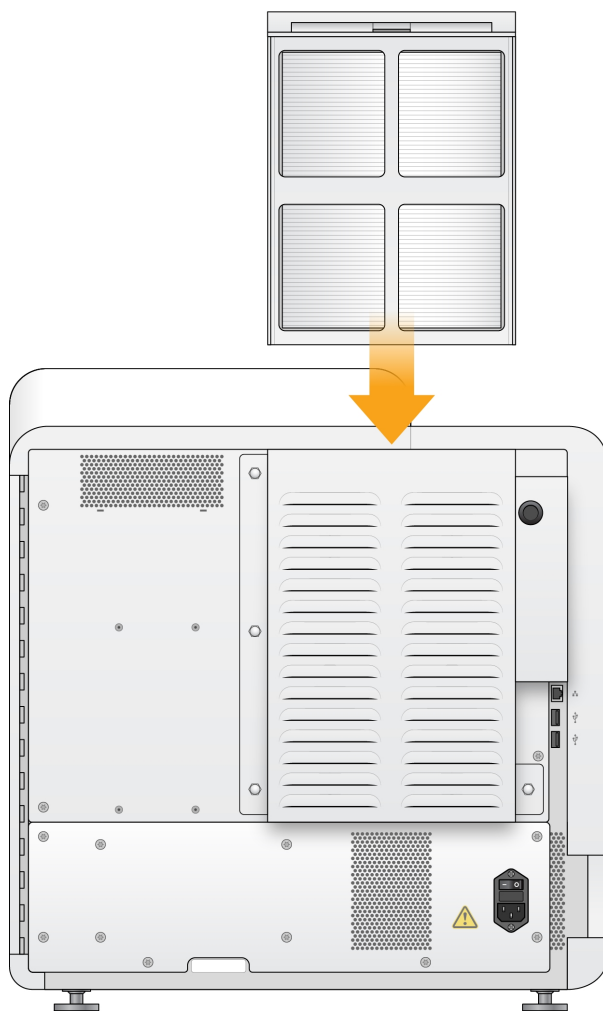


ПРИМЕЧАНИЕ

Вставленный задом наперед воздушный фильтр не будет правильно работать. Обязательно вставьте воздушный фильтр в лоток так, чтобы вы видели зеленую стрелку с надписью Up (Вверх) и не видели этикетку с предупреждением. Стрелка должна указывать на ручку лотка для фильтра.

- Вставьте лоток для фильтра в прибор. Нажмите на верхнюю часть лотка для фильтра так, чтобы он встал на место со щелчком.

Рисунок 21. Установка воздушного фильтра




Обновление программного обеспечения

Обновления программного обеспечения упакованы в пакет программного обеспечения под названием System Suite, включающий следующее программное обеспечение.

- ▶ Управляющее программное обеспечение NextSeq (NCS)
- ▶ Наборы параметров NextSeq
- ▶ Программное обеспечение Local Run Manager
- ▶ RTA2
- ▶ Сервисное программное обеспечение NextSeq (NSS)
- ▶ Служба универсального копирования Universal Copy Service
- ▶ Драйвер Direct Memory Access (DMA)

Обновления программного обеспечения можно устанавливать автоматически с использованием подключения к сети интернет или вручную, указав расположение в сети или на USB-носителе.

- ▶ **Automatic updates** (Автоматическое обновление): для приборов, подключенных к сети с доступом в интернет — при появлении обновления на кнопке Manage Instrument (Управление прибором), расположенной на главной странице, появится предупреждающий  значок.
- ▶ **Manual updates** (Обновление вручную) — скачайте программу установки системного программного обеспечения со [страницы поддержки NextSeq 500](#) на веб-сайте компании Illumina. Если вы планируете выполнить обновление вручную, обязательно завершите его, прежде чем вы начнете готовить образцы и расходные материалы для запуска секвенирования.

Автоматическое обновление программного обеспечения

- 1 Выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Выберите опцию **Software Update** (Обновление программного обеспечения).
- 3 Выберите опцию **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Установить обновление, уже загруженное из BaseSpace).
- 4 Выберите опцию **Update** (Обновить), чтобы обновить программное обеспечение. Откроется диалоговое окно для подтверждения команды.
- 5 Следуйте инструкциям, выводимым мастером установки:
 - a примите лицензионное соглашение;
 - b просмотрите информацию о версии;
 - c просмотрите список программ, включенных в обновление.

Когда обновление программного обеспечения завершится, управляющее программное обеспечение автоматически перезапустится.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если в пакет обновления входит обновление микропрограмм, потребуется автоматический перезапуск системы после обновления микропрограмм.

Обновление программного обеспечения вручную

- 1 Скачайте программу установки системного ПО с сайта компании Illumina и сохраните ее в сетевой папке.
Также можно скопировать файл установки программного обеспечения на съемный USB-носитель.
- 2 Выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 3 Выберите опцию **Software Update** (Обновление программного обеспечения).
- 4 Выберите опцию **Manually install the update from the following location** (Установить обновление вручную из указанного расположения).
- 5 Выберите опцию **Browse** (Обзор), чтобы переместиться в место расположения папки с файлом установки программного обеспечения, затем выберите **Update** (Обновить).
- 6 Следуйте инструкциям, выводимым мастером установки:
 - a примите лицензионное соглашение;
 - b просмотрите информацию о версии;
 - c просмотрите список программ, включенных в обновление.

Когда обновление программного обеспечения завершится, управляющее программное обеспечение автоматически перезапустится.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если в пакет обновления входит обновление микропрограмм, потребуется автоматический перезапуск системы после обновления микропрограмм.

Выключение прибора

- 1 Выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Нажмите **Shutdown options** (Опции выключения).
- 3 Нажмите **Shutdown** (Выключение).
В результате выполнения команды Shut Down (Выключить) будет безопасно выключено программное обеспечение и отключено питания прибора. Подождите не менее минуты, прежде чем снова включать прибор.



ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ

Запрещается перемещать прибор. Ненадлежащее перемещение прибора может повлиять на центровку оптических систем и отрицательно сказаться на достоверности данных. При необходимости перемещения прибора свяжитесь с представителем компании Illumina.

Приложение А. Поиск и устранение неисправностей

Введение	36
Файлы поиска и устранения неисправностей	36
Исправление ошибок автоматической проверки	38
Контейнер с использованными реактивами заполнен	39
Рабочий процесс регибридации	39
Пользовательские наборы параметров и папки наборов параметров	42
Проверка системы	42
Сообщение об ошибке RAID	44
Ошибка сетевого хранения	44
Конфигурирование настроек системы	45

Введение

С вопросами технического характера обращайтесь к следующим страницам поддержки системы NextSeq 500 на веб-сайте компании Illumina. Страницы поддержки обеспечивают доступ к документации, загрузкам и часто задаваемым вопросам.

Войдите в учетную запись MyIllumina для доступа к информационным сообщениям службы поддержки.

В случае проблем с качеством или показателями работы цикла обращайтесь в отдел технической поддержки компании Illumina. См. раздел *Техническая помощь* на стр. 62.

Для упрощения поиска и устранения неисправностей службе технической поддержки компании Illumina можно предоставить ссылку на сводку запуска в BaseSpace Sequence Hub. Вы также можете помочь в поиске и устранении неисправностей, включив сервис упреждающего мониторинга Illumina. Дополнительную информацию об этом сервисе можно найти в разделе *Настройка передачи данных о производительности прибора* на стр. 12.

Файлы поиска и устранения неисправностей

Представитель отдела технической поддержки компании Illumina может запросить у вас копии файлов, относящихся к определенному запуску или определенному сканированию, чтобы провести поиск и устранение неисправностей. Как правило, для поиска и устранения неисправностей используются следующие файлы. Файлы расположены в папках соответствующих запусков, находящихся в выходной папке.

Основной файл	Подпапка	Описание
Файл с информацией о цикле (RunInfo.xml)	<Название папки запуска>	Содержит следующие сведения: <ul style="list-style-type: none"> • название запуска; • число циклов в запуске; • число циклов в каждом считывании; • выполняется ли считывание индекса в конкретном считывании; • число полос и плиток в проточной кювете.
Файл параметров запуска (RunParameters.xml)	<Название папки запуска>	Содержит информацию о параметрах и компонентах запуска. В информацию входят RFID, серийный номер, номер по каталогу и дата истечения срока годности.
Конфигурационный файл RTA (RTAConfiguration.xml)	Data\Intensities	Содержит настройки конфигурации RTA для запуска. Файл RTAConfiguration.xml создается в начале запуска.
Файлы InterOp (*.bin)	InterOp	Двоичные файлы отчета, используемые программой Sequencing Analysis Viewer. Файлы InterOp обновляются по мере выполнения запуска.
Файлы журнала	Журналы	Файлы журналов описывают каждый шаг, выполненный прибором для каждого цикла, и содержат список версий программного и аппаратного обеспечения, использовавшихся для выполнения запуска. Файл с именем [НазваниеПрибора]_CurrentHardware.csv содержит список серийных номеров компонентов прибора.
Файлы журнала ошибок (*ErrorLog*.txt)	Журналы RTA	Журнал ошибок RTA. Файлы журнала ошибок обновляются каждый раз после возникновения ошибки.
Файлы глобальных журналов (*GlobalLog*.tsv)	Журналы RTA	Журнал всех событий в RTA. Файлы глобальных журналов обновляются по мере выполнения запуска.
Файлы журнала дорожки (*LaneLog*.txt)	Журналы RTA	Регистрируют события, возникшие в связи с обработкой. Файлы журналов дорожки обновляются по мере выполнения запуска.

Ошибки RTA

Для поиска и исправления ошибок RTA вначале проверьте журнал ошибок RTA, хранящийся в папке RTALogs. Данный файл отсутствует для успешных циклов. Файлы расположены в папках соответствующих запусков, находящихся в выходной папке. Обращаясь в отдел технической поддержки компании Illumina в случае проблем, включите в сообщение отчет об ошибках.

Исправление ошибок автоматической проверки

Если во время автоматической проверки возникают ошибки, примите следующие рекомендуемые меры по их устранению.

В случае сбоя проверки перед циклом радиочастотная идентификация (RFID) картриджа с реактивами не блокируется и может быть использована для последующего цикла. Однако RFID картриджа с реактивами блокируется после прокола колпачков из фольги.

Проверки, выполняемые системой	Рекомендованное действие
Doors closed (Дверцы закрыты)	Убедитесь, что дверцы отсеков закрыты.
Consumables loaded (Расходные материалы загружены)	Датчики расходных материалов не выполняют регистрацию. Убедитесь, что все расходные материалы загружены надлежащим образом. На экранах подготовки запуска выберите опцию Back (Назад), чтобы вернуться к этапу загрузки, и повторите этапы подготовки запуска.
Необходимое программное обеспечение	Критические компоненты программного обеспечения отсутствуют. Выполните обновление программного обеспечения вручную, чтобы восстановить все компоненты программного обеспечения.
Дисковое пространство прибора	На жестком диске прибора недостаточно свободного места для выполнения запуска. Возможно, что данные предыдущего запуска остались неперенесенными. Удалите данные запуска с жесткого диска прибора.
Соединение с сетью	Сетевое соединение было нарушено. Проверьте состояние сети и наличие физического соединения с сетью.
Дисковое пространство в сети	Учетная запись BaseSpace или сетевой сервер заполнены.
Temperature (Температура)	Рекомендованное действие
Temperature (Температура)	Обратитесь в службу технической поддержки Illumina.
Temperature sensors (Датчики температуры)	Обратитесь в службу технической поддержки Illumina.
Fans (Вентиляторы)	Обратитесь в службу технической поддержки Illumina.
Imaging System (Система визуализации)	Рекомендованное действие
Imaging limits (Пределы визуализации)	Обратитесь в службу технической поддержки Illumina.
Z Steps-and-Settle (Передвижения и остановки по оси Z)	Обратитесь в службу технической поддержки Illumina.
Bit error rate (Частота ошибок по битам)	Обратитесь в службу технической поддержки Illumina.
Flow cell registration (Регистрация проточной кюветы)	Возможно, проточная кювета установлена неправильно. <ul style="list-style-type: none"> На экранах подготовки цикла выберите опцию Back (Назад), чтобы вернуться к этапу загрузки проточной кюветы. Откроется дверца отсека визуализации. Извлеките и вновь установите проточную кювету, чтобы убедиться в правильности ее размещения.

Reagent Delivery (Подача реактивов)	Рекомендованное действие
Valve response (Работа клапана)	Обратитесь в службу технической поддержки Illumina.
Pump (Насос)	Обратитесь в службу технической поддержки Illumina.
Buffer Mechanism (Буферный механизм)	Обратитесь в службу технической поддержки Illumina.
Spent Reagents Empty (Удалите использованные реактивы)	Удалите использованные реактивы из контейнера и повторно загрузите пустой контейнер.

Контейнер с использованными реактивами заполнен

Всегда начинайте запуск с пустым контейнером для использованных реактивов.

Если начать запуск, не опорожнив контейнер с использованными реактивами, датчики системы подадут программному обеспечению сигнал о приостановке выполнения запуска в случае заполнения контейнера. Датчики системы не иницируют приостановку выполнения запуска во время кластеризации, ресинтезирования парных концевых фрагментов или автоматической промывки после запуска.

Если выполнение запуска будет приостановлено, откроется диалоговое окно с предложением поднять сипперные трубки и опорожнить полный контейнер.

Опорожнение контейнера с использованными реактивами

- 1 Выберите опцию **Raise Sippers** (Поднять сипперные трубки).
- 2 Извлеките контейнер с использованными реактивами и утилизируйте содержимое надлежащим образом.
- 3 Установите пустой контейнер обратно в буферный отсек.
- 4 Выберите опцию **Continue** (Продолжать). Запуск возобновится автоматически.

Рабочий процесс регибридизации

Если числовые показатели, созданные в первые несколько циклов, указывают на интенсивности менее 2500, может потребоваться выполнение цикла регибридизации. Некоторые библиотеки с низким уровнем разнообразия могут характеризоваться интенсивностями менее 1000; это ожидаемое явление, которое не может быть устранено выполнением регибридизации.



ПРИМЕЧАНИЕ

Команда End Run (Завершить цикл) является окончательной. После ее использования нельзя восстановить цикл, нельзя повторно использовать расходные материалы цикла, данные секвенирования из цикла не сохраняются.

При завершении цикла пользователем программное обеспечение выполняет следующие шаги, прежде чем цикл завершится.

- ▶ Переводит проточную кювету в безопасное состояние.
- ▶ Производит разблокировку RFID проточной кюветы для последующего цикла.
- ▶ Присваивает проточной кювете дату истечения срока годности регибридизации.
- ▶ Записывает журналы цикла секвенирования для завершенных циклов. Задержка при этом — нормальное явление.
- ▶ Пропускает автоматическую промывку после цикла.

При запуске пользователем цикла регибридизации программное обеспечение выполняет следующие шаги, прежде чем начнется выполнение цикла.

- ▶ Создает папку цикла с соответствующим уникальным названием цикла.
- ▶ Проверяет, не истек ли срок действия регибридизации проточной кюветы.
- ▶ Выполняет заливку реактивов. Задержка при этом — нормальное явление.
- ▶ Пропускает этап создания кластеров.
- ▶ Удаляет предыдущий праймер считывания 1.
- ▶ Гибридизирует свежий образец праймера для считывания 1.
- ▶ Продолжает считывание 1 и выполняет остальной цикл секвенирования в соответствии с указанными параметрами.

Моменты завершения цикла для выполнения регибридизации

Последующая регибридизация возможна только в случае завершения цикла в следующие моменты времени.

- ▶ **После цикла номер 5:** значения интенсивности появляются после регистрации шаблона, для чего необходимы первые пять циклов секвенирования. Несмотря на то что завершение секвенирования после 1 цикла безопасно, рекомендуется завершение после 5 циклов. Не завершайте запуск во время генерации кластеров.
- ▶ **Считывание 1 или считывание индексирования 1:** завершите цикл секвенирования **до** начала ресинтезирования парных концевых фрагментов. После того как начнется ресинтезирование парных концевых фрагментов, сохранить проточную кювету для последующей регибридизации будет нельзя.

Требуемые расходные материалы

Для выполнения запуска регибридизации требуются новый картридж с реактивами NextSeq и картридж с буфером вне зависимости от того, когда был остановлен запуск.

Завершение текущего цикла

- 1 Выберите опцию **End Run** (Завершение цикла). При появлении сообщения с просьбой подтвердить команду выберите **Yes** (Да).
- 2 При появлении сообщения с просьбой сохранить проточную кювету выберите **Yes** (Да). Сохранение проточной кюветы не гарантирует возможность восстановления текущего запуска. При проведении регибридизации обратите внимание на дату истечения срока годности.
- 3 Извлеките сохраненную проточную кювету и храните ее при температуре от 2 до 8 °C, пока не наступит время ее регибридизации.



ПРИМЕЧАНИЕ

Проточную кювету можно хранить в пластиковом футляре до 7 дней при температуре от 2 до 8 °C **без** осушителя. Для получения наилучших результатов регибридизируйте сохраненную проточную кювету в течение 3 дней.

Выполнение ручной промывки

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Perform Wash** (Выполнение промывки).
- 2 На экране Wash Selection (Выбор промывки) выберите **Manual Post-Run Wash** (Ручная промывка после запуска). См. раздел *Выполнение ручной промывки на стр. 29*.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если картридж реактивов и картридж буферов, оставшиеся от остановленного запуска, еще не извлечены, их можно использовать для ручной промывки. В противном случае выполните ручную промывку, используя картридж для промывочного реактива и картридж для промывочного буфера.

Настройка нового запуска через службу BaseSpace Sequence Hub

- 1 Если используется функция BaseSpace Sequence Hub, настройте новый запуск в ней с помощью тех же параметров, что и в исходном запуске.



ПОДСКАЗКА

Нажмите на вкладку Pools (Объединенные библиотеки), выберите соответствующий ID объединенной библиотеки для сохранения ранее заданных настроек цикла, а затем присвойте новому циклу секвенирования уникальное название.

Подготовка запуска на приборе

- 1 Подготовьте новый картридж с реактивами.
- 2 Если сохраненная проточная кювета была помещена в хранилище, дайте ей нагреться до комнатной температуры (15–30 минут).
- 3 Очистите и загрузите сохраненную проточную кювету.
- 4 Извлеките контейнер с использованными реактивами и утилизируйте содержимое надлежащим образом, а затем снова вставьте пустой контейнер в отсек.
- 5 На странице экрана Run Setup (Подготовка запуска) выберите один из указанных ниже режимов выполнения запуска.
 - ▶ Local Run Manager
 - ▶ Вручную
- 6 **[Дополнительно]** Нажмите **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Использовать настройку BaseSpace Sequence Hub) и выберите один из следующих вариантов.
 - ▶ Run Monitoring and Storage (Мониторинг запуска и хранение)
 - ▶ Run Monitoring Only (Только мониторинг запуска)Введите имя пользователя BaseSpace Sequence Hub и пароль.
- 7 Загрузите новый картридж с буфером и новый картридж с реактивами.
- 8 Выберите опцию **Next** (Далее), чтобы выполнить проверку перед запуском и начать его выполнение.

Пользовательские наборы параметров и папки наборов параметров

Не изменяйте оригинальные наборы параметров. Обязательно создавайте копию исходного набора параметров с новым именем. При изменении исходного набора параметров средство обновления ПО перестает распознавать набор параметров для применения последующих обновлений, и новые версии не устанавливаются.

Сохраняйте пользовательские наборы параметров в надлежащей папке наборов параметров. Папки наборов параметров имеют следующую структуру.

- 📁 **Custom** (Пользовательские)
 - 📁 **High** (Высокий) — настроенные пользователем наборы параметров, используемые с комплектом высокого выхода.
 - 📁 **Mid** (Средний) — настроенные пользователем наборы параметров, используемые с комплектом среднего выхода.
- 📁 **High** (Высокий) — исходные наборы параметров, используемые с комплектом высокого выхода.
- 📁 **Mid** (Средний) — исходные наборы параметров, используемые с комплектом среднего выхода.
- 📁 **Wash** (Промывка) — набор параметров ручной промывки.

Проверка системы

При обычной работе системы или при техническом обслуживании прибора выполнение проверки системы не требуется. Однако представитель отдела технической поддержки компании Illumina может попросить вас выполнить проверку системы для поиска и устранения неисправностей.

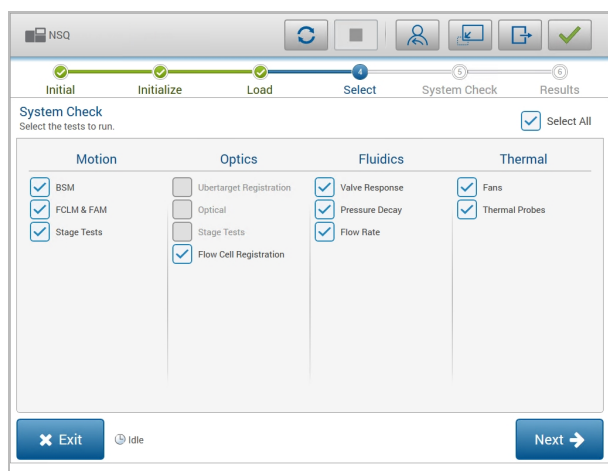


ПРИМЕЧАНИЕ

Если необходима промывка прибора, выполните промывку перед началом проверки системы.


Запуск проверки системы автоматически приводит к закрытию управляющего ПО и к запуску программного обеспечения обслуживания системы NextSeq (NSS). Запустится сервисная программа, которая откроет экран загрузки, сконфигурированный для использования функции расширенной загрузки.

Рисунок 22. Имеющиеся системные проверки



Недоступные для работы с ними поля опций на экране выбора означают, что соответствующие испытания могут быть проведены только при условии помощи выездного специалиста компании Illumina.

Выполнение проверки системы

- 1 На экране Manage Instrument (Управление прибором) выберите **System check** (Проверка системы). Когда появится указание закрыть управляющее программное обеспечение, выберите **Yes** (Да).
 - 2 Загрузите расходные материалы следующим образом.
 - a Если в приборе еще нет использованной проточной кюветы, загрузите использованную проточную кювету.
- 

ПРИМЕЧАНИЕ
Предприятие Illumina рекомендуется использовать для проверки системы проточные кюветы комплекта высокого выхода.
- b Опорожните контейнер с использованными реактивами и верните его в прибор.
 - c Загрузите картридж для промывочного буфера, содержащий 120 мл воды лабораторного класса в центральной емкости.
 - d Загрузите картридж для промывочных реактивов. Убедитесь, что картридж для промывочных реактивов пустой и чистый.
 - 3 Нажмите **Load** (Загрузка). Программное обеспечение переместит проточную кювету и картридж для промывочных реактивов в нужное положение. Нажмите **Next** (Далее).
 - 4 Нажмите **Next** (Далее). Начнется проверка системы.
 - 5 **[Дополнительно.]** По завершении проверки системы выберите опцию **View** (Просмотр) рядом с названием проверки, чтобы просмотреть значения для каждой проверки.
 - 6 Нажмите **Next** (Далее). Откроется отчет о проверке системы.
 - 7 Выберите опцию **Save** (Сохранить), чтобы сохранить отчет в архивированном файле. Перейдите к сетевому хранилищу для записи файла.
 - 8 По окончании нажмите **Exit** (Выход).
 - 9 Когда появится указание закрыть сервисное программное обеспечение и перезапустить управляющее программное обеспечение, выберите **Yes** (Да). Управляющее программное обеспечение перезапустится автоматически.

Проверки движения

Проверка системы	Описание
BSM	Проверяет усиление и расстояние механизма подачи буфера (Buffer Straw Mechanism, BSM) для подтверждения правильности работы модуля.
FCLM и FAM	Проверяет силу и расстояние для механизма загрузки проточной кюветы (Flow Cell Load Mechanism, FCLM) и модуля автоматизации работы с жидкостями (Fluid Automation Module, FAM) для подтверждения правильности работы модулей.
Stage Tests (Испытания этапов движения)	Проверяет пределы перемещения и производительность в горизонтальной плоскости и по 6 уровням в вертикальном направлении, по одному для каждой камеры.

Проверка оптики

Проверка системы	Описание
Flow cell registration (Регистрация проточной кюветы)	Измеряет наклон проточной кюветы в оптической плоскости, проверяет работу камеры, тестирует модуль визуализации и проверяет регистрацию проточной кюветы в правильном положении для визуализации.

Проверки струйной автоматки

Проверка системы	Описание
Valve response (Работа клапана)	Проверяет точность движений клапана и насоса, а также испытывает диапазон движения шприцевого насоса.
Pressure Decay (Падение давления)	Проверяет скорость утечки из герметизированной жидкостной системы, что подтверждает правильность установки проточной кюветы в положении для секвенирования.
Flow Rate (Скорость потока)	Проверяет функциональность датчиков пузырьков, используемых для выявления воздуха в линиях реактивов. Измеряет скорости потока для проверки наличия закупорок или утечек.

Проверки температуры

Проверка системы	Описание
Fans (Вентиляторы)	Проверяет скорость вентиляторов системы в импульсах в минуту (PPM) для подтверждения работы вентиляторов. Неисправные вентиляторы дают отрицательное значение.
Thermal Probes (Температурные датчики)	Проверяет среднюю температуру каждого температурного датчика. Неисправные температурные датчики дают отрицательное значение.

Сообщение об ошибке RAID

Компьютер прибора NextSeq оснащен двумя жесткими дисками. Если происходит сбой жесткого диска, система создает сообщение об ошибке RAID и предлагает обратиться в службу технической поддержки компании Illumina. Обычно в таком случае требуется замена жесткого диска.

Можно продолжить выполнение этапов подготовки цикла и эксплуатировать прибор как обычно. Цель появления этого сообщения состоит в напоминании о необходимости запланировать техническое обслуживание, чтобы предотвратить нарушения в ходе обычной работы прибора. Для продолжения работы нажмите **Acknowledge** (Принять), а затем **Close** (Закрыть).

Ошибка сетевого хранения

Ошибки сетевого хранения могут возникать по одной из следующих причин:

- ▶ **Недостаточно дискового пространства для выходной папки** — Увеличьте количество места на устройстве хранения или переместите выходную папку в место хранения с достаточным объемом дискового пространства.
- ▶ **Не получается связаться с сетевым хранилищем** — Проверьте правильность пути к выходной папке. См. раздел *Настройка расположения выходной папки на стр. 47*.

- ▶ **Система не может сохранить данные в сетевом хранилище** — Обратитесь к системному администратору для проверки прав доступа. Учетной записи Windows операционной системы прибора требуется право доступа к выходной папке для чтения и записи данных.

Учетной записи Windows в Local Run Manager также требуется право доступа к выходной папке для чтения и записи данных. См. раздел «Настройки учетной записи службы» в *Руководстве к программному обеспечению Local Run Manager (документ № 1000000002702)*.

Конфигурирование настроек системы

Конфигурирование системы осуществляется во время ее установки. Тем не менее, если требуется изменение настроек или реконфигурация системы, воспользуйтесь опциями конфигурации системы.

- ▶ **Network Configuration** (Конфигурация сети) — содержит опции для настройки IP-адреса, адреса сервера доменных имен (DNS), имени компьютера и доменного имени.
- ▶ **BaseSpace Sequence Hub** — если используется функция BaseSpace Sequence Hub, здесь указываются варианты мест, куда переносятся данные для хранения и анализа.
- ▶ **Output Folder Location** (Расположение выходной папки) — содержит опции выбора пути к выходной папке.

Настройка сетевой конфигурации

- 1 На экране Manage Instrument (Управление прибором) выберите **System configuration** (Конфигурация системы).
- 2 Выберите опцию **Network Configuration** (Конфигурация сети).
- 3 Выберите опцию **Obtain an IP address automatically** (Получать IP-адрес автоматически), чтобы получать IP-адрес от DHCP-сервера.



ПРИМЕЧАНИЕ

Протокол динамической настройки узла (Dynamic Host Configuration Protocol, DHCP) является стандартным сетевым протоколом, используемым IP-сетями для динамического распределения параметров конфигурации сети.

Или же выберите опцию **Use the following IP address** (Использовать следующий IP-адрес) для подключения прибора к другому серверу вручную следующим образом. Для получения адресов, используемых в конкретном учреждении, обратитесь к сетевому администратору.

- ▶ Введите IP-адрес. IP-адрес представляет собой серию чисел, разделенных точкой. Например, 168.62.20.37.
 - ▶ Введите маску подсети, являющейся частью сети IP.
 - ▶ Введите используемый по умолчанию шлюз, являющийся маршрутизатором сети, подключенной к Интернету.
- 4 Выберите **Obtain a DNS server address automatically** (Получить адрес сервера DNS автоматически), чтобы подключить прибор к серверу доменных имен, связанных с IP адресом. Также можно выбрать **Use the following DNS server addresses** (Использовать следующие адреса сервера DNS), чтобы подключить прибор к серверу доменных имен вручную следующим образом.
 - ▶ Введите желаемый адрес DNS. Адрес DNS — это название сервера, используемого для преобразования доменных имен в IP-адреса.

- ▶ Введите дополнительный адрес DNS. Дополнительный адрес используется, если желаемый DNS не преобразует конкретное доменное имя в IP-адрес.
- 5 Выберите опцию **Save** (Сохранить), чтобы перейти к следующему экрану Computer (Компьютер).



ПРИМЕЧАНИЕ

Имя компьютера прибора присваивается компьютеру прибора во время производства. Любые изменения имени компьютера могут повлиять на возможность подключения и требуют участия сетевого администратора.

- 6 Подключите компьютер прибора к домену или рабочей группе следующим образом.
- ▶ **Для приборов, подключенных к интернету**, выберите **Member of domain** (Член домена), затем введите название домена, относящееся к интернет-соединению учреждения. Для изменения домена требуется ввод имени пользователя и пароля сетевого администратора.
 - ▶ **Для приборов, не подключенных к интернету**, выберите **Member of work group** (Член рабочей группы) и введите название рабочей группы. Название рабочей группы уникально для учреждения.
- 7 Выберите **Save** (Сохранить).

Настройка конфигурации BaseSpace

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Выберите опцию **System Configuration** (Конфигурация системы).
- 3 Выберите опцию **BaseSpace Sequence Hub Configuration** (Конфигурирование BaseSpace Sequence Hub).
- 4 Выберите один из следующих вариантов, чтобы указать место, куда будут передаваться данные для анализа.
 - ▶ В списке **Hosting Location** (Местоположение хостинга) укажите, куда будут направляться данные.
 - ▶ Если у вас подписка уровня Enterprise, поставьте отметку в поле **Private Domain** (Частный домен) и введите доменное имя (URL), которое использовалось для единого входа в BaseSpace Sequence Hub.

Например, адрес может выглядеть так: <https://yourlab.basespace.illumina.com>.

- 5 Выберите **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Отправить данные производительности прибора предприятию Illumina), чтобы включить службу мониторинга Illumina Proactive. Название настройки в интерфейсе программного обеспечения может отличаться от названия в настоящем руководстве, в зависимости от используемой версии NCS.

При включении этой настройки на предприятие Illumina будут отправляться данные о производительности прибора. Эти данные помогают предприятию Illumina в поиске и устранении неисправностей и в распознавании потенциальных сбоев, позволяя выполнять профилактическое техническое обслуживание и увеличивать продолжительность работоспособности прибора. Дополнительную информацию о пользе такого обслуживания см. в документе «*Техническая записка компании Illumina о профилактическом обслуживании (Illumina Proactive Technical Note)*» (документ №1000000052503)

Данная служба:

- ▶ не отправляет данные секвенирования;

- ▶ требует подключения прибора к сети с доступом в интернет;
- ▶ по умолчанию включена. Чтобы отказаться от использования этой службы, снимите флажок **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Отправить данные производительности прибора предприятию Illumina).

6 Выберите **Save** (Сохранить).

Настройка расположения выходной папки

NextSeq требуется выходная папка для всех запусков. Используйте полный путь UNC к выходной папке. Путь UNC включает 2 обратные косые черты, названия сервера и директории, **но не** включает буквенное обозначение подключенного сетевого диска.

- ▶ Пути к выходной папке 1-го уровня вложенности должны содержать завершающую обратную косую черту.
 - ▶ Пример пути UNC: \\servername\directory1\
- ▶ Пути к выходной папке 2-го уровня вложенности или выше не требуют завершающей обратной косой черты.
 - ▶ Пример пути UNC: \\servername\directory1\directory2
- ▶ При указании пути к подключенному сетевому диску система выдаст ошибку. **Не использовать.**
 - ▶ Пример пути к подключенному сетевому диску: T:\sbsfiles

Для режима запуска Local Run Manager, укажите расположение выходной папки в программном обеспечении Local Run Manager. Дополнительную информацию см. в *Руководстве по программному обеспечению Local Run Manager (документ № 100000002702)*.

Приложение В. Анализ в режиме реального времени

Обзор программного обеспечения для анализа в режиме реального времени	48
Рабочий процесс анализа в реальном времени	49
Выходные файлы секвенирования	53
Плитки проточной кюветы	54
Структура папки выходных данных	57

Обзор программного обеспечения для анализа в режиме реального времени

Устройство NextSeq 500 использует вариант программного обеспечения RTA (анализа в реальном времени), так называемый RTA2. Программное обеспечение RTA2 работает на компьютере прибора и извлекает значения интенсивности из изображений, выполняет распознавание оснований и присваивает каждому распознаванию баллы качества. RTA2 и управляющее программное обеспечение обмениваются информацией через веб-интерфейс HTTP и через общие файлы памяти. Если прекратить работу программы RTA2, обработка не восстановится и данные запуска не будут сохранены.



ПРИМЕЧАНИЕ

Производительность демультимплексирования не вычисляется. Следовательно, данные во вкладку Index программы Sequencing Analysis Viewer (SAV) не вносятся.

Входные данные для RTA2

Для выполнения обработки RTA2 требует наличия следующих данных на входе:

- ▶ Изображения плиток, хранящиеся в локальной памяти системы.
- ▶ Файл **RunInfo.xml**, который генерируется автоматически в начале запуска. Файл содержит следующую информацию:
 - ▶ название запуска;
 - ▶ количество циклов в нем;
 - ▶ индексировано ли считывание;
 - ▶ число плиток в проточной кювете.
- ▶ **RTA.exe.config**, файл конфигурации программного обеспечения в формате XML.

RTA2 получает команды от управляющего программного обеспечения в отношении места расположения файла **RunInfo.xml** и относительно того, указано ли иное расположение папки для выходных данных.

Выходные файлы в RTA версии 2

Изображения по каждому каналу передаются в память в виде плиток. Плитки — это небольшие области визуализации проточной кюветы, определяемые как поле обзора камеры. Из этих изображений средствами программного обеспечения создаются выходные данные, представляющие собой файлы распознавания оснований с оценкой качества и файлы фильтра. Все остальные файлы поддерживают выходные файлы.

Тип файла	Описание
Файлы распознанных оснований	Каждая проанализированная плитка включается в объединенные файлы распознавания оснований (*.bcl) для каждой дорожки и каждого цикла. Объединенные файлы распознанных оснований содержат информацию о распознавании основания и соответствующей оценке качества распознавания для каждого кластера в этой дорожке.
Файлы фильтра	От каждой плитки получают информацию фильтра, собираемую в один файл фильтра (*.filter) для каждой дорожки. Файлы фильтра определяют кластер, прошедший через фильтры.
Файлы расположения кластера	Файлы расположения кластера (*.locs) содержат координаты X, Y каждого кластера в плитке. Во время создания шаблона для каждой дорожки создается файл расположения кластера.
Файлы индексов распознавания оснований	Для сохранения информации исходных плиток файл индекса распознавания оснований (*.bci) создается для каждой дорожки. Файл индекса содержит пары значений для каждой плитки (номер плитки и число кластеров в этой плитке).

Выходные файлы используются для последующего анализа в BaseSpace. Кроме того, можно использовать программное обеспечение конвертации bcl2fastq для преобразования FASTQ и применения сторонних средств анализа. Файлы NextSeq требуют ПО bcl2fastq версии 2.0 или более поздней. Последние по времени версии ПО bcl2fastq можно найти на странице [NextSeq — материалы для скачивания](#) на веб-сайте Illumina.

RTA версии 2 в режиме реального времени предоставляет числовые показатели для оценки качества запуска, они сохраняются как файлы InterOp. Файлы InterOp представляют собой двоичные выходные файлы, содержащие числовые характеристики уровня плитки, цикла и считывания. Они необходимы для просмотра числовых характеристик в режиме реального времени в приложении просмотра анализов секвенирования Sequencing Analysis Viewer (SAV). Последние по времени версии ПО SAV можно найти на странице [SAV — материалы для скачивания](#) на веб-сайте Illumina.

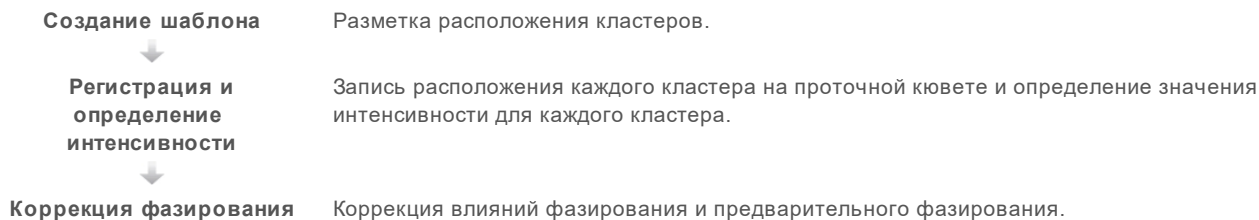
Обработка ошибок

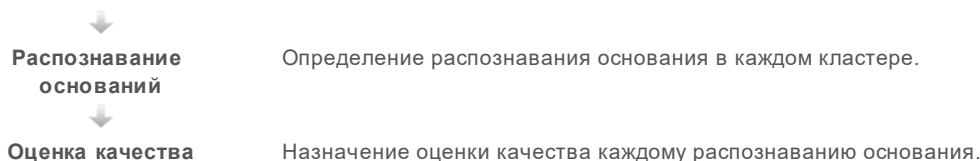
Программное обеспечение RTA2 создает файлы журнала и записывает их в папку RTALogs. Ошибки регистрируются в файле ошибок в формате *.tsv.

В конце обработки в окончательное место расположения выходных данных переносятся следующие файлы журнала и ошибок.

- ▶ *GlobalLog*.tsv содержит сводку важных событий в цикле.
- ▶ *LaneNLog*.tsv содержит события обработки для каждой дорожки.
- ▶ *Error*.tsv содержит список ошибок, возникших в ходе цикла.
- ▶ *WarningLog*.tsv содержит предупреждения, выданные в ходе цикла.

Рабочий процесс анализа в реальном времени





Создание шаблона

Первый этап рабочего процесса RTA заключается в создании шаблона, который определяет положение каждого кластера в плитке, используя координаты X и Y.

Для создания шаблона используются данные изображений, полученные в первых пяти циклах запуска. Шаблон создается после визуализации плиток последнего цикла формирования шаблона.



ПРИМЕЧАНИЕ

Для выявления кластера во время создания шаблона в первых **пяти** циклах необходимо хотя бы одно основание, отличное от G. Для индексированных последовательностей RTA версии 2 требует наличия не менее одного основания, отличного от G, в первых **двух** циклах.

Шаблон используется как эталон на последующих этапах регистрации и определения интенсивности. Положения кластеров для всей проточной кюветы записываются в файлы положения кластеров (*.locs), по одному файлу на дорожку.

Регистрация и определение интенсивности

Регистрация и определение интенсивности начинаются после создания шаблона.

- ▶ Регистрация совмещает изображения, полученные при каждом последующем цикле визуализации, с шаблоном.
- ▶ Определение интенсивности позволяет измерить значение интенсивности для каждого кластера в шаблоне для данного изображения.

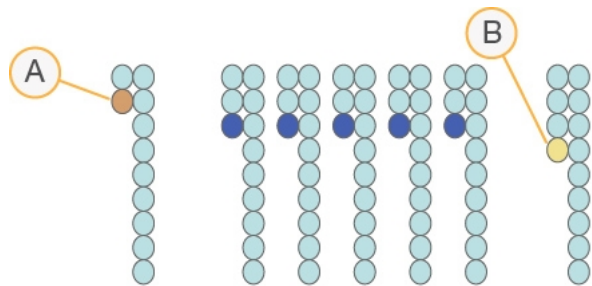
Если происходит ошибка регистрации для любого изображения в цикле, для этой плитки в данном цикле распознавание оснований не производится. Для изучения миниатюр изображений и выявления изображений, не прошедших регистрацию, используйте программу Sequencing Analysis Viewer (SAV).

Коррекция фазирования

Во время реакции секвенирования каждая нить ДНК в кластере удлиняется на одно основание в цикл. Фазирование и предварительное фазирование происходят, когда нить выбивается из фазы текущего цикла встраивания оснований.

- ▶ Фазирование происходит, когда длина цепочки оснований отстает.
- ▶ Предварительное фазирование происходит, когда к цепочке присоединяются лишние основания.

Рисунок 23. Фазируемое и предварительное фазируемое



- A Считывание с основанием в случае фазируемого.
- B Считывание с основанием в случае предварительного фазируемого

Программа RTA2 позволяет исправлять эффекты фазируемого и предварительного фазируемого, что повышает качество данных на каждом отдельном цикле на протяжении общего цикла секвенирования.

Распознавание оснований

В процессе распознавания оснований определяется основание (A, C, G или T) для каждого кластера данной плитки в указанном цикле. В системе NextSeq 500 используется двухканальное секвенирование, при котором нужны только два изображения для кодирования всех четырех оснований ДНК: одно изображение из красного канала и одно из зеленого.

Интенсивности, извлеченные из изображения, после сравнения с результатами другого изображения приводят к получению четырех разных популяций, каждая из которых соответствует отдельному нуклеотиду. Процесс распознавания нуклеотидных оснований определяет, к какой популяции принадлежит каждый кластер.

Рисунок 24. Визуализация интенсивностей кластера

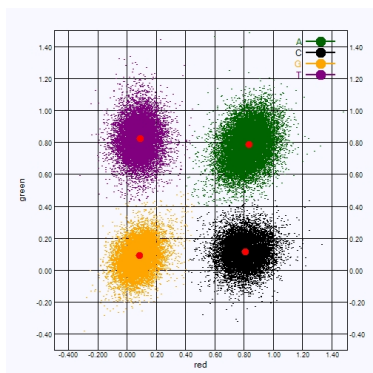


Таблица 1. Распознавание оснований при двухканальном секвенировании

Основание	Красный канал	Зеленый канал	Результат
A	1 (есть)	1 (есть)	Кластеры, дающие интенсивный сигнал и в красном, и в зеленом каналах.
C	1 (есть)	0 (нет)	Кластеры, дающие интенсивный сигнал только в красном канале.
G	0 (нет)	0 (нет)	Кластеры, не дающие интенсивного сигнала в известном положении кластера.
T	0 (нет)	1 (есть)	Кластеры, дающие интенсивный сигнал только в зеленом канале.

Кластеры, проходящие фильтр

Во время цикла RTA2 отфильтровывает исходные данные, удаляя результаты считывания, не соответствующие порогу качества данных. Перекрывающиеся кластеры и кластеры низкого качества удаляются.

Для двухканального анализа при определении чистоты распознавания нуклеотидов RTA2 использует систему на популяционной основе. Кластеры проходят фильтр (им присваивается категория PF), если не более одного основания в первых 25 циклах имеет показатель качества распознавания ниже 0,63. Если кластер не проходит фильтр, основания в нем не распознаются.

Замечания по индексированию

Процесс распознавания оснований в ходе считывания индекса отличается от распознавания оснований в ходе других считываний.

Считывание индекса должно начинаться в случае, когда в первых двух циклах обнаружено хотя бы одно основание, отличное от G. Если считывание индекса начинается с двух оснований, распознанных как G, интенсивность сигнала не генерируется. Чтобы обеспечить выполнение демультимплексирования, сигнал должен присутствовать хотя бы в одном из двух первых циклов.

Для повышения устойчивости демультимплексирования выбирайте индексированные последовательности, обеспечивающие сигнал хотя бы в одном канале (предпочтительно в обоих каналах) в каждом цикле. Следование этому правилу позволит избежать комбинаций индекса, состоящих только из оснований G в любом цикле.

- ▶ Красный канал — A или C
- ▶ Зеленый канал — A или T

Такой процесс распознавания оснований обеспечивает точность при анализе малоплексных образцов.

Оценка качества

Оценка качества, или Q-score, является прогнозом вероятности неточного распознавания основания. Чем выше балл Q-score, тем выше качество распознавания основания и тем вероятнее, что основание будет распознано правильно.

Величина Q-score представляет собой компактный способ описания низких вероятностей ошибки. Q (X) означает баллы по качеству, где X — это оценка в баллах. В приведенной ниже таблице показана связь между показателем качества и вероятностью ошибки.

Q-Score Q(X)	Вероятность ошибки
Q40	0,0001 (1 к 10 000)
Q30	0,001 (1 к 1000)
Q20	0,01 (1 к 100)
Q10	0,1 (1 к 10)



ПРИМЕЧАНИЕ

Оценка качества основана на модифицированной версии алгоритма Phred.

При оценке качества вычисляется набор предикторов для каждого распознавания оснований, а затем значения предикторов используются для определения Q-score по таблице качества. Таблицы качества были созданы для обеспечения оптимально точного прогноза качества для циклов секвенирования, выполняемых с использованием конкретных конфигураций платформ секвенирования и версий химических реакций.

После определения баллов Q-score результаты регистрируются в файлах распознанных оснований.

Выходные файлы секвенирования

Тип файла	Описание, место расположения и название файла
Файлы распознанных оснований	Каждая проанализированная плитка включается в файл распознанных оснований, с объединением в один файл данных по каждой дорожке для каждого цикла. Объединенные файлы содержат информацию о распознавании основания и закодированной оценке качества для каждого кластера в этой дорожке. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — файлы сохраняются в папках, по одной папке для каждой дорожки. [Цикл].bcl.bgzf , где [Цикл] означает четырехзначный номер цикла. Файлы распознанных оснований сжимаются с использованием алгоритма блочного сжатия gzip.
Файл индексов распознанных оснований	Для каждой дорожки в бинарном файле индекса перечисляется информация исходной плитки в форме пар значений для каждой плитки, представляющих номер плитки и номер кластеров в этой плитке. Файлы индекса распознанных оснований создаются при первом создании файла распознанных оснований этой дорожки. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — файлы сохраняются в папках, по одной папке для каждой дорожки. s_[Дорожка].bci
Файлы расположения кластера	Для каждой плитки координаты XY каждого кластера собираются в один файл расположения кластера по каждой дорожке. Файлы расположения кластера являются результатом генерирования шаблона. Data\Intensities\L00[X] — файлы сохраняются в папках, по одной папке для каждой дорожки. s_[Дорожка].locs
Файлы фильтра	Файлы фильтра определяют кластеры, прошедшие через фильтры. Информация о фильтрации собирается в один файл фильтра для каждой дорожки и считывания. Файлы фильтра создаются на 26-м цикле с использованием данных 25 циклов. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — файлы сохраняются в папках, по одной папке для каждой дорожки. s_[Дорожка].filter
Файлы InterOp	Двоичные файлы отчета, используемые программой Sequencing Analysis Viewer (SAV). Файлы InterOp обновляются по мере выполнения запуска. Папка InterOp

Тип файла	Описание, место расположения и название файла
Файл конфигурации RTA	Создается в начале запуска, в файле конфигурации RTA перечислены настройки запуска. <Название папки запуска>, RTAConfiguration.xml
Файл с информацией о запуске	Содержат название запуска, количество циклов для каждого считывания, указывают, выполняется ли считывание индекса, а также сообщают число полос и плиток проточной кюветы. Файлы сведений о запуске создаются в начале секвенирования. <Название папки запуска>, RunInfo.xml
Файлы миниатюр	Миниатюры изображений для каждого из цветовых каналов (красного и зеленого) для плиток 1, 6 и 12 с каждой из камер, с верхней и нижней поверхностей в каждом цикле процесса во время визуализации. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1] — файлы сохраняются в одной папке по каждой дорожке, с одной вложенной папкой по каждому циклу. s_[дорожка]_[плитка]_[канал].jpg — в имени файла плитка указана пятизначным номером, определяющим поверхность, полосу, камеру и плитку. Дополнительную информацию см. в разделах <i>Нумерация плиток на стр. 56</i> и <i>Наименование миниатюр изображений на стр. 56</i> .

Плитки проточной кюветы

Плитки — это небольшие области визуализации проточной кюветы, определяемые как поле обзора камеры. Общее количество плиток зависит от числа дорожек, полос и поверхностей, визуализируемых на проточной кювете, и того, как взаимодействуют между собой камеры, получающие изображения.

- ▶ Проточные кюветы с высоким выходом содержат 864 плитки.
- ▶ Проточные кюветы со средним выходом содержат 288 плиток.

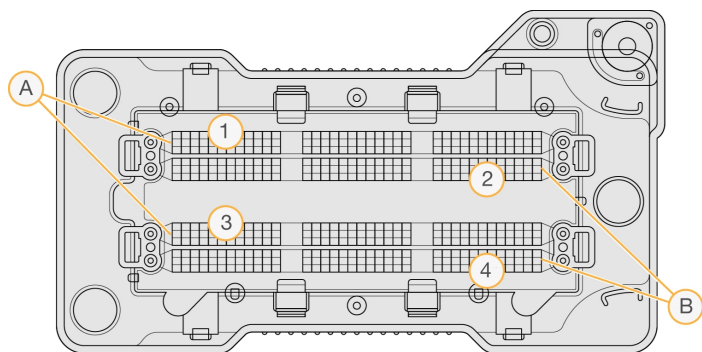
Таблица 2. Плитки проточной кюветы

Компонент проточной кюветы	Высокий выход	Средний выход	Описание
Дорожки	4	4	Дорожка — это физический канал с собственными портами входа и выхода.
Поверхности	2	2	Проточная кювета визуализируется по двум поверхностям: верхней и нижней. Вначале визуализируется верхняя поверхность 1 плитки, затем нижняя поверхность той же плитки, после этого осуществляется переход к следующей плитке.
Полос на дорожку	3	1	Полоса — это столбец плиток в дорожке.
Сегменты камеры	3	3	В приборе используется шесть камер для получения изображений проточной кюветы в трех сегментах по каждой дорожке.
Количество плиток на полосу на сегмент камеры	12	12	Плитка — это часть площади проточной кюветы, которую камера показывает как 1 изображение.
Всего плиток визуализировано	864	288	Общее количество плиток равно: дорожки × поверхности × полосы × сегменты камеры × плиток на полосу на сегмент.

Нумерация дорожек

Дорожки 1 и 3, называемые парой дорожек А, визуализируются одновременно. Дорожки 2 и 4, называемые парой дорожек В, визуализируются, когда завершится получение изображения пары дорожек А.

Рисунок 25. Нумерация дорожек



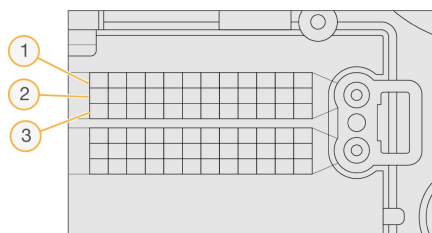
A Пара дорожек A — дорожки 1 и 3

B Пара дорожек B — дорожки 2 и 4

Нумерация полос

Каждая дорожка визуализируется в три полосы. Для проточных кювет с высоким выходом полосы нумеруются с 1 по 3.

Рисунок 26. Нумерация полос

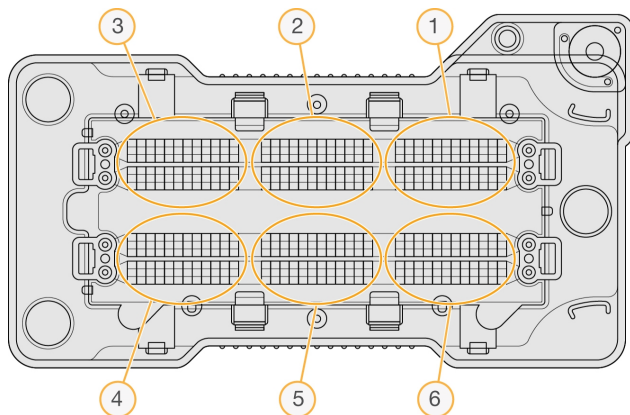


Нумерация камер

В приборе NextSeq 500 используется шесть камер для визуализации проточной кюветы.

Камеры пронумерованы от 1 до 6. Камеры 1–3 дают изображения дорожки номер один. Камеры 4–6 дают изображения дорожки номер три. После завершения визуализации дорожек 1 и 3 модуль визуализации сдвигается по оси X и начинает визуализировать дорожки 2 и 4.

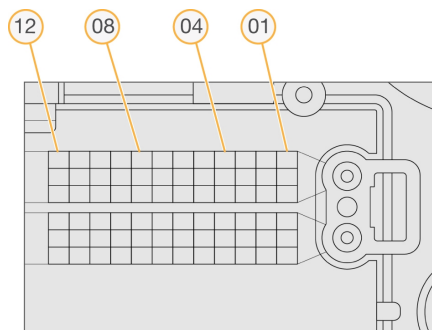
Рисунок 27. Нумерация камер и сегментов (показана проточная кювета с высоким выходом)



Нумерация плиток

В каждой полосе каждого сегмента камеры имеется 12 плиток. Плитки имеют номер с 01 по 12 в зависимости от номера полосы или сегмента камеры; номер плитки состоит из двух цифр.

Рисунок 28. Нумерация плиток



Полный номер плитки включает следующие 5 цифр, представляющих ее положение.

- ▶ **Surface** (Поверхность) — 1 означает верхнюю поверхность; 2 означает нижнюю поверхность
- ▶ **Swath** (Полоса) — 1, 2 или 3
- ▶ **Camera** (Камера) — 1, 2, 3, 4, 5 или 6
- ▶ **Tile** (Плитка) — 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 или 12

Пример. Номер плитки 12508 означает верхнюю поверхность, полосу 2, камеру 5 и плитку 8.

Полный пятизначный номер плитки используется в названии файла миниатюр изображений и файлов фактического фазирования. Дополнительную информацию см. в разделе *Выходные файлы секвенирования* на стр. 53.

Наименование миниатюр изображений

Миниатюры изображений для каждого из цветовых каналов (красного и зеленого) для плиток 1, 6 и 12 генерируются с каждой из камер, с верхней и нижней поверхностей в каждом цикле процесса во время визуализации. Файлы миниатюрных изображений создаются в формате JPG.

Каждое изображение получает название, содержащее номер плитки, созданное в соответствии со следующими принципами наименования, имеющее постоянный префикс s_:

- ▶ **Lane** (Дорожка) — 1, 2, 3 или 4;
- ▶ **Tile** (Плитка) — пятизначный номер плитки, указывающий поверхность, полосу, камеру и плитку;
- ▶ **Channel** (Канал) — красный или зеленый

Пример. Файл с названием `s_3_12512_green.jpg` указывает на принадлежность изображения дорожке 3, верхней поверхности, полосе 2, камере 5, плитке 12 и зеленому каналу.

Структура папки выходных данных

Управляющее программное обеспечение создает название папки выходных данных автоматически.

📁 Data

📁 Intensities

📁 BaseCalls

📁 **L001** — файлы распознанных оснований для дорожки номер 1; данные собираются в один файл за цикл.

📁 **L002** — файлы распознанных оснований для дорожки номер 2; данные собираются в один файл за цикл.

📁 **L003** — файлы распознанных оснований для дорожки номер 3; данные собираются в один файл за цикл.

📁 **L004** — файлы распознанных оснований для дорожки номер 4; данные собираются в один файл за цикл.

📁 **L001** — сводный файл *.locs для дорожки 1.

📁 **L002** — сводный файл *.locs для дорожки 2.

📁 **L003** — сводный файл *.locs для дорожки 3.

📁 **L004** — сводный файл *.locs для дорожки 4.

📁 Images

📁 Focus

📁 **L001** — изображения фокуса для дорожки 1.

📁 **L002** — изображения фокуса для дорожки 2.

📁 **L003** — изображения фокуса для дорожки 3.

📁 **L004** — изображения фокуса для дорожки 4.

📁 **InterOp** — бинарные файлы, используемые программой Sequencing Analysis Viewer (SAV).

📁 **Logs** — файлы журналов, описывающие этапы эксплуатации.

📁 **Recipe** — специфический для цикла секвенирования файл с набором параметров и идентификационным номером картриджа с реактивами.

📁 **RTALogs** — файлы журналов, описывающие этапы анализа.

📁 **Thumbnail_Images** — миниатюры изображений для плиток 1, 6 и 12 каждой полосы каждого цикла.

📄 RTAComplete.xml

📄 RTAConfiguration.xml

📄 RunInfo.xml

📄 RunNotes.xml

📄 RunParameters.xml

Алфавитный указатель

В

BaseSpace Sequence Hub 1, 20
 значки передачи 27
 конфигурирование 46
 логин 20, 41

И

InterOp 37, 54

L

Local Run Manager 20
 модули 19
 создание запуска 16

R

RTA v2
 обзор 48
 прекращение 48
RunInfo.xml 53

U

Universal Copy Service 28

W

Windows
 доступ 5
 пароль 6

A

алгоритм Phred 52
анализ
 выводимые файлы 53
 опции 19-20
анализ, первичный 52

Б

буферный отсек 2

В

визуализация, двухканальное
 секвенирование 51
воздушный фильтр 32
выводимые файлы 53
выключение прибора 35
выходные файлы, секвенирование 53

Г

гипохлорит натрия, промывка 31

Д

дверца отсека проточной кюветы 19
длина считывания 16
документация 1, 62

З

замечания по индексированию 52
запуски
 создать 16
значки
 ошибки и предупреждения 4
 свернуть NCS 5
 состояние 4

И

изображения миниатюр 54
имя и пароль системного пользователя 10
имя пользователя и пароль 10
интенсивности 51
использованные реактивы
 полный контейнер 39
 утилизация 22, 32

К

картридж с буфером 9, 24
картридж с реактивами
 емкость № 28 31
 обзор 8
 подготовка 17
кластеры, проходящие фильтр 52

кнопка питания 5, 10
 компоненты
 буферный отсек 2
 отсек визуализации 2-3
 отсек воздушного фильтра 2
 отсек для реактивов 2
 строка состояния 2

M

местоположение кластера
 создание шаблона 50
 местоположение папки 21
 модули, Local Run Manager 19

N

настройки конфигурации 45
 нумерация дорожек
 пары дорожек 54
 нумерация камер 55
 нумерация плиток 56
 нумерация полос 55

O

обновление программного обеспечения 34
 обучение онлайн 1
 отсек визуализации 2-3
 отсек воздушного фильтра 2-3
 отсек для реактивов 2
 оценки Q-score 52
 ошибка сетевого хранения 44
 ошибки
 вероятность 52
 ошибки и предупреждения 4

P

папка выходных данных 19
 параметры
 распознавание оснований 51
 параметры запуска
 редактировать параметры 20
 режим Local Run Manager 20
 ручной режим 21
 передача данных
 значки активности 27
 служба универсального копирования 28
 переключатель питания 10

подготовка запуска, расширенные опции 12
 поддержка клиентов 62
 поиск и устранение неисправностей
 контейнер с использованными
 реактивами 39
 проверка перед циклом 38
 проверка системы 42
 файлы, относящиеся к запуску 37
 числовые показатели плохого
 качества 39
 Поиск и устранение неисправностей
 опции контакта 36
 помощь, техническая 62
 предупреждения о состоянии 4
 прибор
 кнопка питания 5
 настройки конфигурирования 45
 пуск 10
 проверка перед запуском 25
 проверка перед циклом 38
 проверка системы 42
 программное обеспечение
 автоматическое обновление 34
 анализ изображений, распознавание
 оснований 3
 инициализация 10
 на приборе 3
 настройки конфигурации 45
 обновление вручную 35
 продолжительность запуска 16
 создание запуска 16
 программное обеспечение анализа в
 реальном времени 1, 3
 программное обеспечение анализа в
 реальном времени (RTA)
 результаты 53
 продолжительность запуска 16
 промывка
 автоматическая 28
 компоненты промывки 29
 промывка вручную 29
 расходные материалы, приобретаемые
 пользователем 29
 промывка после запуска 28
 промывка прибора 29
 проточная кювета
 визуализация 55
 наименование файлов изображений 56
 направляющие штыри 22
 нумерация дорожек 54
 нумерация плиток 56

- обзор 7
- очистка 17
- пары дорожек 7
- плитки 54
- регибридизация 39
- типы 1
- упаковка 17
- проточные кюветы
 - номер полосы 55
- профилактическое техническое обслуживание 29
- прохождение фильтра (ПФ) 52

Р

- рабочий процесс
 - Local Run Manager 20
 - NCS 20
 - гипохлорит натрия 31
 - дверца отсека проточной кюветы 19
 - замечания по индексированию 52
 - использованные реактивы 22
 - картридж с буфером 24
 - картридж с реактивами 17, 24
 - логин BaseSpace Sequence Hub 20, 41
 - подготовка проточной кюветы 17
 - проверка перед запуском 25
 - продолжительность запуска 16
 - проточная кювета 22
 - расширенные опции загрузки 12
 - режим Local Run Manager 20
 - ручной режим 21
 - секвенирование 49
 - числовые показатели запуска 26
- рабочий процесс секвенирования 49
- распознавание оснований 51
 - замечания по индексированию 52
- расположение кластера
 - файлы 53
- расходные материалы 9
 - вода лабораторного класса 14
 - запуски секвенирования 13
 - картридж с реактивами 8
 - проточная кювета 7
 - расходные материалы для промывки 29, 31
 - технической обслуживание прибора 14
- расходные материалы, приобретаемые пользователем 13-14
- расширенные опции загрузки 12

- реактивы
 - надлежащая утилизация 24
- регибридизация праймеров 39
- регибридизация, считывание 1 39
- режим выполнения запуска
 - Local Run Manager 20
 - вручную 20
 - ручной 21
- ручной режим
 - создание запуска 16

С

- секвенирование
 - расходные материалы, приобретаемые пользователем 13
 - слив расходных материалов 13
 - служба мониторинга Illumina Proactive 12, 46
- совместимость
 - отслеживание по RFID 8
- создание запуска 16
- создание шаблона 50
- сообщение об ошибке RAID 44
- справка
 - документация 1
- средство просмотра анализов секвенирования 15
- строка состояния 2

Т

- таблицы качества 52
- техническая поддержка 62
- техническое обслуживание прибора
 - расходные материалы 14
- техническое обслуживание, профилактическое 29

У

- указания в отношении воды лабораторного класса 14
- управление прибором
 - выключение 35
- управляющее программное обеспечение 3

Ф

- фазирование
 - предварительное фазирование 50
- файлы locs 53
- Файлы RunInfo.xml 37, 54
- файлы распознанных оснований 53
- файлы фильтра 53
- фильтр по качеству 52
- формамаид, положение № 6 25

Ц

- циклы в процессе считывания 16

Ч

- числовые показатели
 - циклы интенсивности 27
 - циклы плотности кластеров 27
- числовые показатели запуска 26
- чистота сигнала 52

Техническая помощь

Для получения технической помощи свяжитесь со службой технической поддержки компании Illumina.

Веб-сайт www.illumina.com
Электронная почта techsupport@illumina.com

Номера телефонов службы поддержки клиентов Illumina

Регион	Бесплатный звонок	Региональные отделения
Северная Америка	+1 800-809-45-66	
Австралия	+1 800-775-688	
Австрия	+43 800-00-62-49	+43 192-865-40
Бельгия	+32 800-771-60	+32 340-029-73
Китай	400 066-58-35	
Дания	+45 808-201-83	+45 898-711-56
Финляндия	+358 800-91-83-63	+358 974-79-01-10
Франция	+33 805-10-21-93	+33 170-77-04-46
Германия	+49 800-101-49-40	+49 893-803-56-77
Гонконг	800-96-02-30	
Ирландия	+353 180-093-66-08	+353 016-95-05-06
Италия	+39 800-98-55-13	+39 236-00-37-59
Япония	0800 111-50-11	
Нидерланды	+31 800-022-24-93	+31 207-13-29-60
Новая Зеландия	0800-45-16-50	
Норвегия	+47 800-168-36	+47 219-396-93
Сингапур	+1 800-579-27-45	
Южная Корея	+82 80 234 5300	
Испания	+34 911-89-94-17	+34 800-30-01-43
Швеция	+46 850-61-96-71	+46 200-88-39-79
Швейцария	+41 565-80-00-00	+41 800-20-04-42
Тайвань	0080 665-17-52	
Великобритания	+44 800-012-60-19	+44 207-305-71-97
Другие страны	+44 179-953-40-00	

Паспорта безопасности веществ (SDS) можно найти на сайте компании Illumina по адресу support.illumina.com/sds.html.

Документацию о продукции можно скачать в формате PDF с веб-сайта компании Illumina. Перейдите на веб-сайт support.illumina.com, выберите нужный продукт, затем нажмите на опцию **Documentation & Literature** (Документация и литература).



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 U. S. A. (США)
+1 800-809-ILMN (4566)
+1 858-202-45-66 (за пределами Северной Америки)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

Исключительно для использования в научно-исследовательских целях.
Не предназначено для использования в диагностических процедурах.

© Illumina, Inc., 2019. Все права защищены.

illumina®