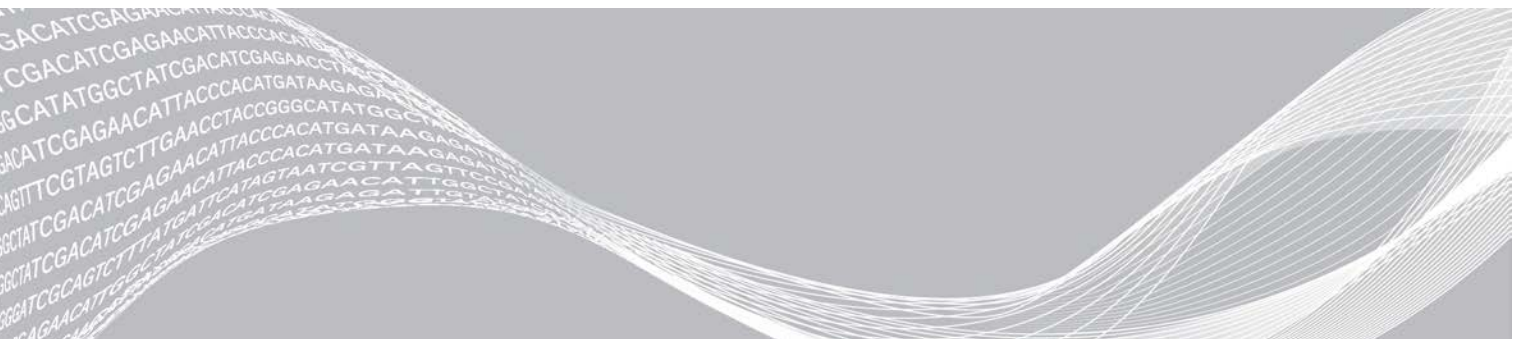


NextSeq 550

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., 2018. 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 № 20006831 документ № 15069765, версия 05	Декабрь 2018 г.	<p>Обновлены описания программного обеспечения, страницы экранов и рабочий процесс для управляющего программного обеспечения NextSeq (NCS) 4.0.</p> <p>Обновлена следующая дополнительная информация для NCS 4.0.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Добавлена информация о программном обеспечении Local Run Manager. • Обновлена 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. • Добавлен MethylationEPIC версии 1.0 в качестве совместимого типа чипов BeadChip. • Добавлены инструкции по техническому обслуживанию для приборов, оснащенных воздушными фильтрами. • Добавлены новые значки для привлечения внимания оператора, информирования оператора и свертывания окна NCS. • Обновлены инструкции по пользовательской настройке параметров запуска и системы. • Обновлена опция передачи данных производительности прибора. • Обновлены 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). • Добавлена информация о том, что пароль для Windows действителен в течение полугода. <p>Добавлены метанол ЧДА или спектрофотометрической чистоты, или изопропиловый спирт (99%-ный) для технического обслуживания прибора.</p>

Документ	Дата	Описание изменений
Материал № 20006831 Документ № 15069765, 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 v. 2.5 остаются прежними. Добавлены сведения относительно необходимости обновления программного обеспечения до версии 2.2 для использования комплектов реактивов NextSeq v. 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 № 20006831 Документ № 15069765, 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 v. 2 как на RTA2.
Материал № 20006831 Документ № 15069765, 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 № 20001843 Документ № 15069765, 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.
Часть № 15069765, ред. В	Май 2015 г.	Исправлено описание подготовленных емкостей в картридже с реактивами.
Часть № 15069765, ред. А	Май 2015 г.	Первый выпуск.

Содержание

Глава 1. Обзор	1
Введение	1
Дополнительные ресурсы	2
NextSeq 550Dx в режиме RUO (только для исследовательских целей)	2
Компоненты прибора	3
Обзор расходных материалов для секвенирования	7
Глава 2. Начало работы	11
Запуск прибора	11
Пользовательские настройки системы	12
Пользовательская настройка запуска	13
Расходные материалы и оборудование, приобретаемые пользователем	14
Глава 3. Секвенирование	16
Введение	16
Рабочий процесс секвенирования	17
Создание запуска с помощью программного обеспечения Local Run Manager	18
Создание запуска в NSC	19
Подготовка картриджа с реактивами	19
Подготовка проточной кюветы	19
Подготовка библиотек к секвенированию	20
Настройка запуска секвенирования	21
Отслеживание выполнения запуска	28
Автоматическая промывка после запуска	30
Глава 4. Сканирование	31
Введение	31
Рабочий процесс сканирования	32
Загрузка папки DMAP	32
Загрузка BeadChip в адаптер	33
Подготовка сканирования	34
Отслеживание хода сканирования	36
Глава 5. Техническое обслуживание	38
Введение	38
Выполнение ручной промывки	39
Замена воздушного фильтра	42
Обновления программного обеспечения	43
Завершение работы прибора	45
Приложение А. Поиск и устранение неисправностей	46
Введение	46
Файлы поиска и устранения неисправностей	46

Исправление ошибок автоматической проверки	48
Контейнер с использованными реактивами заполнен	51
Рабочий процесс регибридизации	52
Ошибки BeadChip и сканирования	54
Пользовательские наборы параметров и папки наборов параметров	56
Проверка системы	56
Сообщение об ошибке RAID	59
Конфигурирование настроек системы	59
Приложение В. Анализ в режиме реального времени	62
Обзор программного обеспечения для анализа в режиме реального времени	62
Рабочий процесс анализа в реальном времени	64
Приложение С. Файлы и папки выходных данных	68
Выходные файлы секвенирования	68
Структура папок выходных данных секвенирования	72
Выходные файлы сканирования	73
Структура папок выходных данных сканирования	74
Приложение D. Рекомендации относительно режима исследования для прибора NextSeq 550Dx	75
Введение	75
Совместимость расходных материалов для прибора NextSeq 550Dx	75
Начало работы с прибором NextSeq 550Dx	76
Индикаторы режимов работы прибора NextSeq 550Dx	77
Возможные варианты перезагрузки и завершения работы прибора NextSeq 550Dx	77
Алфавитный указатель	79
Техническая помощь	83

Глава 1. Обзор

Введение	1
Дополнительные ресурсы	2
NextSeq 550Dx в режиме RUO (только для исследовательских целей)	2
Компоненты прибора	3
Обзор расходных материалов для секвенирования	7

Введение

Система Illumina® NextSeq™ 550 представляет собой единое решение, обеспечивающее беспрепятственный переход от высокопроизводительного секвенирования к матричному сканированию и наоборот.

Отличительные особенности секвенирования

- ▶ **Высокопроизводительное секвенирование** — прибор NextSeq 550 позволяет секвенировать экзомы, полные геномы и транскриптомы, а также поддерживает библиотеки TruSeq™, TruSight™ и Nextera™.
- ▶ **Типы проточных кювет** — проточные кюветы доступны в конфигурациях для высокого и среднего выхода. 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. 62*.
- ▶ **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 запуска.

Отличительные особенности матричного сканирования

- ▶ **Функция матричного сканирования, встроенная в управляющее ПО**, — прибор NextSeq 550 позволяет вам переходить от матричного сканирования к высокопроизводительному секвенированию на одном и том же приборе с использованием одного и того же управляющего ПО.
- ▶ **Расширенная возможность визуализации** — система визуализации прибора NextSeq 550 включает модификацию столика и программы, которые позволяют визуализировать большую площадь поверхности и осуществлять сканирование с помощью устройства BeadChip.
- ▶ **Типы чипов BeadChip** — к совместимым чипам BeadChip относятся CytoSNP-12, CytoSNP-850K, MethylationEPIC версии v1.0 и Karyomap-12.
- ▶ **Адаптер BeadChip** — многоразовый адаптер BeadChip обеспечивает простоту загрузки чипа BeadChip в прибор.

- ▶ **Анализ данных** — воспользуйтесь программным обеспечением BlueFuse® Multi, чтобы проанализировать матричные данные.

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.
<i>Денатурация и разведение библиотек для системы NextSeq (документ № 15048776)</i>	Содержит инструкции по денатурированию и разбавлению библиотек, подготовленных для запуска секвенирования, 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>Справочное руководство к прибору NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)</i>	Содержит обзор программного обеспечения прибора и компонентов системы, инструкции по выполнению запуска секвенирования и методики надлежащего технического обслуживания прибора, а также способы поиска и устранения неисправностей.
<i>Руководство по программному обеспечению Local Run Manager (документ № 1000000002702)</i>	Содержит обзор программного обеспечения Local Run Manager и инструкции по использованию функций программного обеспечения.

Посетите страницу поддержки прибора [NextSeq 550](#) на веб-сайте компании Illumina, чтобы получить доступ к документации, загрузкам программного обеспечения, обучению онлайн и часто задаваемым вопросам.

NextSeq 550Dx в режиме RUO (только для исследовательских целей)

Инструкции, приведенные в этом справочнике, также применимы к прибору NextSeq 550Dx, работающему в режиме исследования с использованием последней по времени версии программного обеспечения RUO для прибора. Сводку исключений и другие рекомендации см. в разделе *Рекомендации относительно режима исследования для прибора NextSeq 550Dx на стр. 75*.

Компоненты прибора

В системе NextSeq 550 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** — место расположения проточной кюветы в процессе секвенирования или место расположения адаптера BeadChip для выполнения сканирования.
- G **Отсек воздушного фильтра** — служит для размещения воздушного фильтра, если прибор им оборудован. Доступ к фильтру осуществляется с задней стороны прибора.

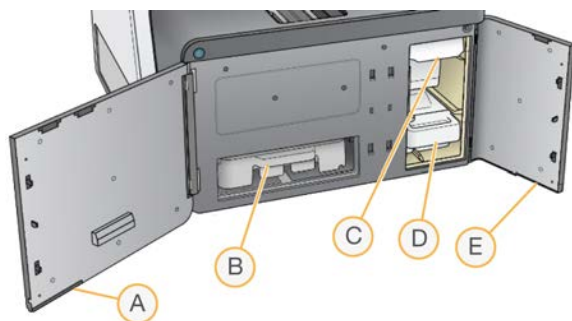
Отсек визуализации

Отсек визуализации содержит площадку с тремя направляющими штырями для установки проточной кюветы при выполнении секвенирования или адаптера BeadChip при выполнении сканирования. После загрузки проточной кюветы или адаптера устройства BeadChip дверцы отсека визуализации автоматически закрываются, перемещая все компоненты в нужное положение.

Отсеки реактива и буфера

Подготовка к выполнению запуска секвенирования на устройстве NextSeq 550 требует наличия доступа к отсеку реактивов и буферному отсеку, чтобы загрузить в них расходные материалы для запуска 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 запуска.
- E **Дверца буферного отсека** — закрывает буферный отсек на защелку, расположенную в левом нижнем углу дверцы.

Отсек воздушного фильтра

Если прибор оснащен воздушным фильтром, то фильтр находится в специально предназначенном для этого отсеке. Отсек располагается в задней части прибора. Заменять воздушный фильтр следует раз в 90 дней. Информацию о том, как заменять фильтр, см. в разделе [Замена воздушного фильтра на стр. 42](#).

Программное обеспечение NextSeq

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







- ▶ **Управляющее программное обеспечение NextSeq Control Software (NCS)** — управляет работой прибора и позволит вам шаг за шагом выполнить подготовку к запуску секвенирования или к матричному сканированию.
 - ▶ 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 выполнению запуска 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 выполнения запуска, которое вы можете отслеживать либо в NCS, либо в Local Run Manager, программное обеспечение NCS выполняет следующие функции:
 - ▶ эксплуатирует платформу 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)** — в запусках секвенирования RTA выполняет анализ изображений и распознавание нуклеотидных оснований во время запуска. В приборе NextSeq 550 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. 62.
- ▶ **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** (Заккрыть), 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 запуска секвенирования немедленно останавливает запуск. Остановка цикла является окончательной. В этом случае повторно использовать расходные материалы для запуска будет невозможно, а данные секвенирования, полученные в ходе запуска, не сохраняются.

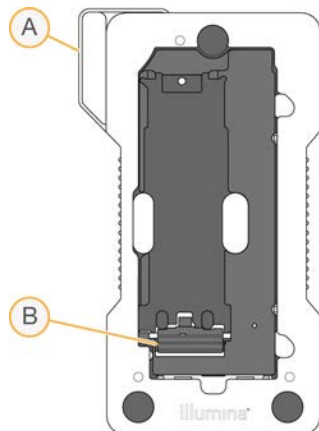
Требования к паролю Windows

Операционная система требует менять пароль Windows каждые 180 дней. Получив соответствующее приглашение, поменяйте пароль Windows.

Обзор многоцветного адаптера BeadChip

Многоцветный адаптер BeadChip удерживает чип BeadChip во время сканирования. Чип BeadChip закрепляется в углублении адаптера с помощью удерживающей защелки. После этого адаптер BeadChip загружается на столик в отсеке визуализации.

Рисунок 3 Многоцветный адаптер BeadChip



- A Адаптер BeadChip
- B Удерживающая защелка

Обзор расходных материалов для секвенирования

Содержимое и хранение

Расходные материалы для выполнения 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 500/550:

- ▶ 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
HT1	1	От -25 до -15 °C	Гибридационный буфер
Проточная кювета	1	От 2 до 8 °C *	Одноразовая проточная кювета

* Комплекты реактивов для NextSeq в. 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.





ОСТОРОЖНО!

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.

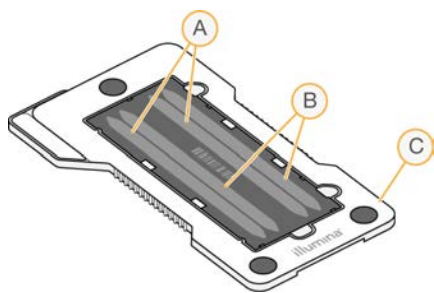
Каждая проточная кювета и картридж с реактивами промаркированы отметками **High** (Высокий выход) или **Mid** (Средний выход). Всегда проверяйте этикетку при подготовке расходных материалов к запуску.

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

Для работы приборов NextSeq 550Dx в режиме исследования имеются дополнительные ограничения по совместимости, которые нужно учитывать. См. раздел [Совместимость расходных материалов для прибора NextSeq 550Dx](#) на стр. 75.

Обзор проточной кюветы

Рисунок 4 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 4 дорожки, визуализируемые парами.

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

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. 69.

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 5 Картридж с реактивами



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

Несколько емкостей зарезервированы для автоматической промывки после запуска.

Промывочный раствор выкачивается из картриджа с буфером в зарезервированные емкости, прокачивается через систему и подается в контейнер для использованных реактивов.

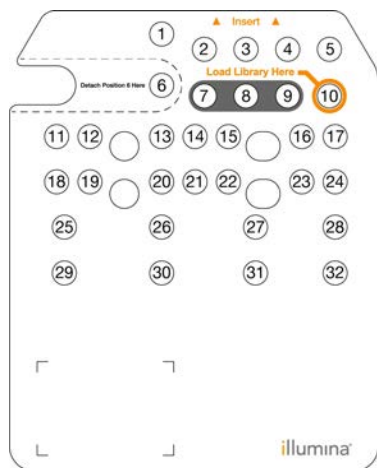


ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

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 6 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).

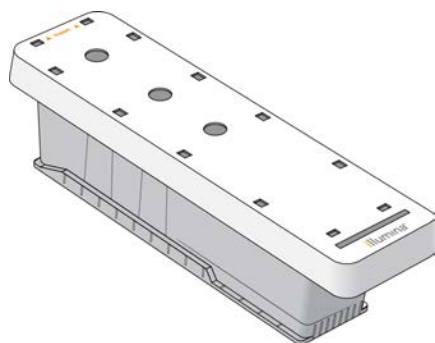
Съемная емкость в положении № 6

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. 27.

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 7 Картридж с буфером



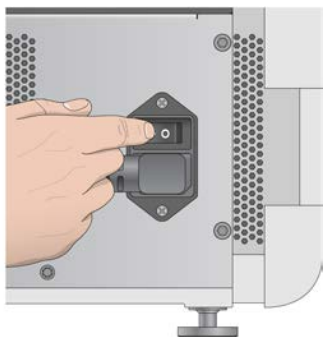
Глава 2. Начало работы

Запуск прибора	11
Пользовательские настройки системы	12
Пользовательская настройка запуска	13
Расходные материалы и оборудование, приобретаемые пользователем	14

Запуск прибора

Переведите сетевой выключатель в положение I (вкл.).

Рисунок 8 Переключатель питания расположен на задней панели прибора



ПРИМЕЧАНИЕ

Чтобы запустить прибор NextSeq 550Dx в режиме исследования, см. раздел *Начало работы с прибором NextSeq 550Dx* на стр. 76.

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

Рисунок 9 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. 59.

- ▶ Настройки идентификатора прибора (аватар и пользовательское название)
- ▶ Настройка опции клавиатуры и звукового индикатора
- ▶ Настройка пользовательских наборов параметров
- ▶ Настройка проверки обновлений программного обеспечения через BaseSpace Sequencing 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 запуска;
 - ▶ возникновение определенных ошибок;
 - ▶ необходимость вмешательства пользователя;
 - ▶ окончание запуска.
- 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. 56.

- 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 выполнения запуска, а также параметров слива неиспользованных реактивов.

Настройка параметров запуска

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Выберите опцию **System Customization** (Настройка системы).
- 3 Установите флажок **Use Advanced Load Consumables** (Использовать функцию расширенной загрузки расходных материалов), чтобы загружать все расходные материалы для запуска с одной и той же страницы экрана.
- 4 Установите флажок **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Пропуск подтверждения проверки перед запуском), чтобы автоматически начать секвенирование или сканирование после успешного завершения автоматической проверки.
- 5 Выберите **Save** (Сохранить), чтобы сохранить настройки и выйти из экрана.

Настройка функции автоматического слива

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Выберите опцию **System Customization** (Настройка системы).
- 3 Установите флажок **Purge Consumables at End of Run** (Сливать расходные материалы по окончании 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.

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

Расходные материалы и оборудование, приобретаемые пользователем

Для работы прибора NextSeq 550 используются следующие расходные материалы и оборудование.

Расходные материалы для запусков секвенирования, приобретаемые пользователем

Расходный материал	Поставщик	Цель
1 N NaOH (гидроксид натрия)	Основной поставщик лаборатории	Денатурирование библиотеки, разбавляется до 0,2 N
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; разбавленный до 0,05 % (с использованием функции ручной промывки)
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 очистка оптических компонентов и обслуживание картриджа для очистки объектива
Воздушный фильтр	Illumina, № по каталогу: 20022240	Для приборов, оснащенных воздушным фильтром. 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	16
Рабочий процесс секвенирования	17
Создание запуска с помощью программного обеспечения Local Run Manager	18
Создание запуска в NSC	19
Подготовка картриджа с реактивами	19
Подготовка проточной кюветы	19
Подготовка библиотек к секвенированию	20
Настройка запуска секвенирования	21
Отслеживание выполнения запуска	28
Автоматическая промывка после запуска	30

Введение

Чтобы выполнить запуск секвенирования на NextSeq 550, 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 секвенирования 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 запуске 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. 30.

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 550](#) на веб-сайте компании Illumina.

Число циклов в одном считывании

Количество циклов, выполненных в одном считывании во время запуска секвенирования, превышает количество проанализированных циклов на единицу. Например, в ходе запуска с секвенированием парных концевых фрагментов длиной 150 циклов происходит считывание 151 цикла (2 x 151), то есть общее число циклов составляет 302. В конце запуска секвенирования будет проанализировано 2 x 150 циклов. Один дополнительный цикл необходим для расчетов, касающихся предварительного фазирования и фазирования.

Рабочий процесс секвенирования

Убедитесь, что были выполнены все этапы рабочего процесса NextSeq 550 в указанном порядке. Этот рабочий процесс секвенирования действителен для режима выполнения запуска в *Local Run Manager*. Чтобы создать запуск без применения *Local Run Manager*, воспользуйтесь ручным режимом выполнения запуска. См. раздел [Создание запуска в NSC на стр. 19](#).



Создайте запуск в модуле программного обеспечения *Local Run Manager*.



Подготовьте новый картридж с реактивами: дайте ему разморозиться и осмотрите. Подготовьте новую проточную кювету: дайте ей нагреться до комнатной температуры, разверните и осмотрите.



Выполните денатурацию и разведение библиотек (применяется не ко всем типам библиотек). См. документ «Денатурация и разведение библиотек для системы NextSeq» (документ № 15048776).



Загрузите разбавленные библиотеки в картридж с реактивами в емкость № 10.



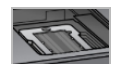
На главной странице выберите опцию **Experiment** (Эксперимент), а затем **Sequence** (Секвенирование).



Выберите режим выполнения запуска.
[Необязательно] Выберите BaseSpace Sequence Hub для мониторинга запуска и хранения данных.



Выберите запуск из списка



Загрузите проточную кювету.



Опорожните и перезагрузите контейнер с использованными реактивами.
 Загрузите картридж с буфером и картридж с реактивами.



Просмотрите результаты проверки перед запуском. Нажмите **Start** (Пуск).



Отслеживайте выполнение запуска через службу Local Run Manager и интерфейс управляющего программного обеспечения или через подключенный к сети компьютер с использованием приложений BaseSpace Sequence Hub или Sequencing Analysis Viewer.



Промывка прибора начинается автоматически после завершения секвенирования.

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 по эксплуатации модуля Local Run Manager.

- 1 На главной странице экрана выберите опцию **Edit Runs** (Редактировать запуски).
- 2 Нажмите **Create Run** (Создать запуск) на информационной панели программы Local Run Manager.
- 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. 19 и *Режимы выполнения запусков* на стр. 21.

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. 23.
- 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 и выдержите там 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.

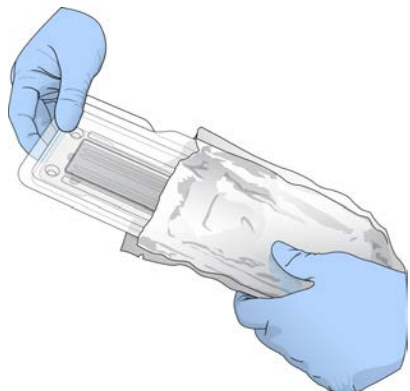


ПРИМЕЧАНИЕ

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

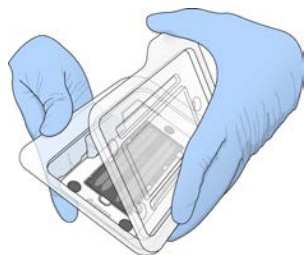
- 3 Извлеките проточную кювету из упаковки из фольги.

Рисунок 10 Извлечение из упаковки из фольги



- 4 Откройте прозрачную пластмассовую коробку и достаньте проточную кювету.

Рисунок 11 Извлечение из пластмассовой коробки



- 5 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.

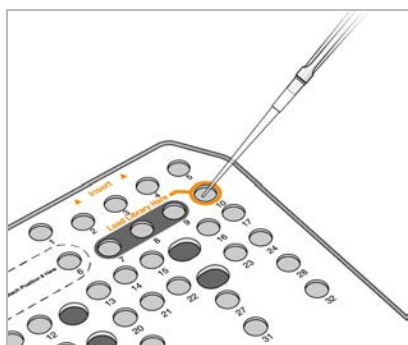
Тип комплекта	Загрузочный объем	Загрузочная концентрация
Высокий выход	1,3 мл	1,8 пМ
Средний выход	1,3 мл	1.5 пмоль/л

На практике концентрация при загрузке может колебаться в зависимости от методик подготовки библиотеки и количественного определения. Инструкции см. в разделе «Руководство по денатурированию 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 библиотек**). Не касайтесь крышки из фольги во время распределения библиотек.

Рисунок 12 Загрузка библиотек



Настройка 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, можно будет извлечь расходные материалы, оставшиеся от предыдущего запуска, и откроется серия экранов настройки запуска. Короткая задержка является нормальной.

Режимы выполнения 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 сочетать работу службы 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 вести учет образцов 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
Мониторинг и хранение данных запуска	Отправляет файлы InterOp, файлы журналов и данные запуска в BaseSpace Sequence Hub для дистанционного мониторинга и анализа. Требуется 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. Требуется наличия учетной записи BaseSpace Sequence Hub и подключения к Интернету.

Выбор режима выполнения запуска и BaseSpace Sequencing Hub

- 1 На странице экрана Run Setup (Подготовка запуска) выберите один из указанных ниже режимов выполнения запуска.
 - ▶ Local Run Manager
 - ▶ Вручную
- 2 **[Необязательно]** Нажмите **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Использовать настройку BaseSpace Sequence Hub) и выберите один из следующих вариантов.
 - ▶ Мониторинг и хранение данных запуска
 - ▶ Run Monitoring Only (Только мониторинг запуска)
 Введите имя пользователя BaseSpace Sequence Hub и пароль.
- 3 Нажмите **Next** (Далее).

Выбор запуска (выполнение запуска в режиме Local Run Manager)

- 1 Выберите название запуска секвенирования 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 секвенирования.
 - ▶ **Read Type** (Тип считывания) — Single Read (Одиночные считывания) или Paired End (Парные считывания).
 - ▶ **Read Length** (Длина считывания) — количество циклов в каждом считывании.
 - ▶ **[Необязательно]** — 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)

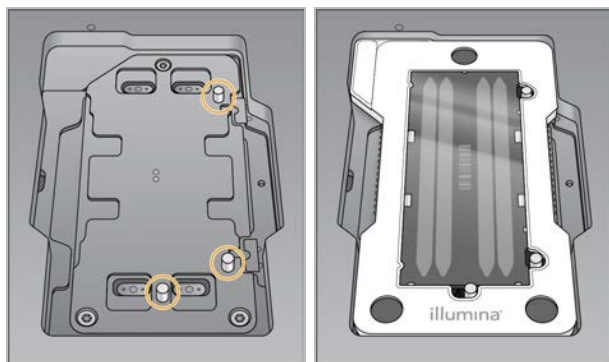
- 1 Введите предпочитаемое вами название запуска.
- 2 **[Необязательно]** Введите предпочтительный идентификатор библиотеки.
- 3 Из выпадающего списка Recipe (Набор параметров) выберите набор параметров. В списке перечисляются только совместимые наборы параметров.
- 4 Выберите тип считывания: **Single Read** (Одиночные считывания) или **Paired End** (Парные считывания).
- 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 для считывания 1 больше пяти (количество, необходимое для создания шаблона).
 - ▶ Число циклов считывания индекса не превышает число циклов считывания 1 и считывания 2.
- 6 **[Необязательно.]** 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.
 - ▶ **Output folder location** (Местоположение папки выходных файлов) — изменение местоположения сохранения выходных данных для текущего запуска секвенирования. Выберите **Browse** (Просмотреть), чтобы переместиться к желаемому месту, расположенному в сети.
 - ▶ **[Необязательно] Sample Sheet** (Протокол анализа) — Нажмите **Browse** (Обзор) для перехода к протоколу анализа (опционально).
 - ▶ **Purge consumables for this run** (Сливать расходные материалы в данном запуске) — изменение настройки для включения автоматического слива расходных материалов после текущего запуска.
- 7 Нажмите **Next** (Далее).
 - 8 **[Необязательно.]** Нажмите на значок Edit (Редактировать) для изменения параметров запуска.
 - 9 Нажмите **Next** (Далее).

Загрузка проточной кюветы

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

Рисунок 13 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 14 Извлечение контейнера с использованными реактивами



ПРИМЕЧАНИЕ

Извлекая контейнер, поддерживайте его снизу второй рукой.

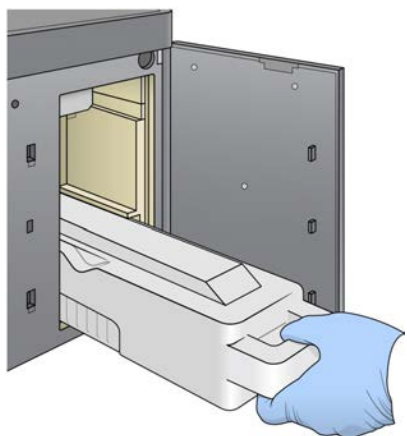


ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

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 15 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 16 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.

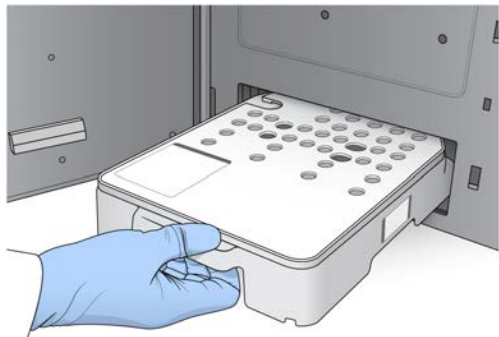


ПРИМЕЧАНИЕ

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. 27.

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

Рисунок 17 Загрузка картриджа с реактивами

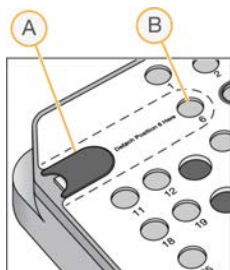


- 3 Нажмите **Load** (Загрузка).
Программное обеспечение автоматически переместит картридж на место (~30 секунд), на экране появится идентификационный номер картриджа с реактивом, и будет выполнена проверка датчиков.
- 4 Нажмите **Next** (Далее).

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 18 Съёмное 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. 48*.

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.

Начало выполнения запуска

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

Сведения по настройке системы на автоматическое начало выполнения запуска после успешной проверки см. в разделе *Настройка параметров запуска на стр. 14*.

Отслеживание выполнения запуска

- 1 Позволяет отслеживать выполнение запуска, интенсивность и баллы оценки качества по мере того, как числовые показатели запуска отображаются на экране.

Рисунок 19 Выполнение и числовые показатели запуска секвенирования



- A **Run progress** (Выполнение запуска) — отображает текущий этап и количество завершенных циклов для каждого считывания. Изменение длины индикатора выполнения не пропорционально 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. 66*.
- C **Intensity** (Интенсивность) — служит для отображения значения интенсивностей кластера 90-го перцентиля для каждой плитки. Цвета на графике соответствуют основаниям: A — красного цвета, C — 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 запуска.

- E **Clusters Passing Filter (%)** (Кластеры, проходящие фильтр [%]) — показывает долю кластеров, проходящих фильтр. См. раздел *Кластеры, проходящие фильтр* на стр. 66.
- F **Estimated Yield (Gb)** (Оценка выхода [Gb]) — показывает число оснований, планируемых к распознаванию в запуске секвенирования.



ПРИМЕЧАНИЕ

После выбора Home (Начальная страница) вернуться для просмотра числовых показателей запуска 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 секвенирования.

- ▶ На этапах генерации кластеров числовые показатели не отображаются.
- ▶ Первые пять циклов отводятся для создания шаблона.
- ▶ Числовые показатели запусков 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	BaseSpace Sequence Hub компании Illumina
Подключено			
Подключено и идет передача данных			
Отключено			
Выключено			

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

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 времени 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, с целью 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 промывной раствор, находящийся в буферном картридже, и NaOCl, находящийся в картридже с реактивами.

По завершении запуска секвенирования программное обеспечение запускает автоматическую промывку после запуска 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 (Начальная станция) 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. Оставьте картриджи на месте до следующего запуска.

Глава 4. Сканирование

Введение	31
Рабочий процесс сканирования	32
Загрузка папки DMAP	32
Загрузка BeadChip в адаптер	33
Подготовка сканирования	34
Отслеживание хода сканирования	36

Введение

Чтобы выполнить сканирование на приборе NextSeq 550, вам понадобится следующее.

- ▶ Гибридизированный и окрашенный чип BeadChip
- ▶ Многоцветный адаптер BeadChip
- ▶ Файлы карт дешифрования Decode Map (DMAP), соответствующие используемому чипу BeadChip
- ▶ Файл описания, соответствующий используемому чипу BeadChip
- ▶ Файл кластера, соответствующий используемому чипу BeadChip

Выходные файлы создаются во время сканирования и затем помещаются в очередь на перенос в указанную папку выходных данных.

Выполните анализ с использованием программного обеспечения BlueFuse Multi, с которым совместимы только данные сканирования в файловом формате распознавания генотипов (GTC). По умолчанию прибор NextSeq 550 генерирует нормализованные данные и ассоциированные с ними определения генотипа в файле формата GTC. По выбору можно настроить прибор таким образом, чтобы создавались дополнительные файлы данных интенсивности (IDAT).

Дополнительную информацию см. в разделе *Конфигурация сканирования BeadChip* на стр. 61.

Клиент для работы с файлами дешифрования (Decode File Client)

Папка DMAP содержит сведения, определяющие положение гранул на чипе BeadChip и представляющие собой количественную оценку сигнала, связанного с каждой гранулой. Папка DMAP уникальна для каждого штрихкода BeadChip.

Утилита Decode File Client (Клиент для работы с файлами дешифрования) позволяет загружать папки DMAP непосредственно с серверов компании Illumina с использованием стандартного протокола HTTP.

Чтобы получить доступ к клиенту для работы с файлами дешифрования, перейдите на [страницу поддержки Decode File Client](https://support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html) на веб-сайте компании Illumina (support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html). Установите Decode File Client на компьютер с доступом к местоположению папки DMAP в сети.

Дополнительную информацию см. в разделе *Загрузка папки DMAP* на стр. 32.

Файлы описания и файлы кластеров

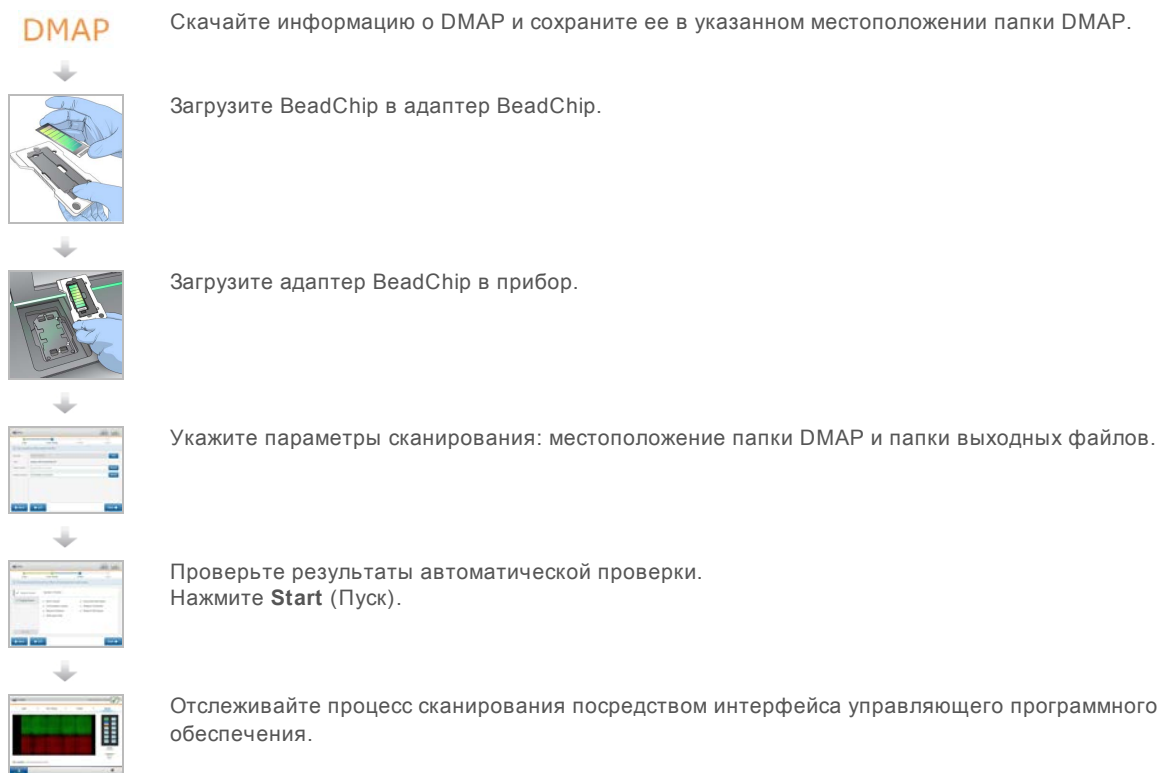
В программном обеспечении для каждого чипа BeadChip требуются файл описания и файл кластера. Каждый файл описания и кластера уникален для данного типа BeadChip. Убедитесь, что используются файлы кластеров, название которых содержит NS550. Эти файлы совместимы с системой NextSeq.

- ▶ **Manifest file** (Файл описания) — файлы описания содержат сведения о SNP или содержимом датчика на чипе BeadChip. Для файлов описания используется файловый формат *.bpm.
- ▶ **Cluster files** (Файлы кластеров) — файлы кластеров содержат описание положения кластеров на матрице генотипирования Illumina и используются при анализе данных для распознавания генотипа. Для файлов кластеров используется файловый формат *.egt.

Расположение файлов задается на экране BeadChip Scan Configuration (Конфигурация сканирования BeadChip). На главной странице ПО NCS выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором), **System Configuration** (Конфигурация системы), а затем выберите опцию **BeadChip Scan Configuration** (Конфигурация сканирования устройства BeadChip).

При установке прибора NextSeq 550 представитель компании Illumina скачает эти файлы и укажет путь к ним в управляющем программном обеспечении. Изменять эти файлы не требуется, за исключением случаев их утери или появления новой версии. Дополнительную информацию см. в разделе *Замена файлов описания и файлов кластеров на стр. 55*.

Рабочий процесс сканирования



Загрузка папки DMAP

Вы можете войти в папку DMAP через Decode File Client (Клиент для работы с файлами дешифрования), выбрав вариант с учетной записью или вариант с BeadChear (этот вариант просмотра выбран по умолчанию).

Доступ к папке DMAP через учетную запись

- 1 На основной вкладке клиента Decode File Client (Клиент для работы с файлами дешифрования) выберите опцию скачивания.
 - ▶ AutoPilot
 - ▶ All BeadChips not yet downloaded (Все чипы BeadChip, которые еще не были загружены)
 - ▶ All BeadChips (Все чипы BeadChip)
 - ▶ BeadChips by Purchase Order (Чипы BeadChip по номеру заявки на приобретение)
 - ▶ BeadChips by barcode (Чипы BeadChip по штрихкоду)
- 2 Введите требуемую информацию.
- 3 Найдите папку DMAP, которую требуется загрузить.
- 4 Убедитесь, что в каталоге загрузки имеется достаточно свободного места.
- 5 Запустите загрузку. Проверьте статус загрузки на вкладке Download Status and Log (Статус загрузки и журнал).
- 6 Сохраните папку DMAP в заданное для нее местоположение.

Доступ к папке DMAP через BeadChip

- 1 Идентифицируйте BeadChips с помощью каких-либо двух из указанных опций:
 - ▶ штрихкод BeadChip;
 - ▶ ID упаковки с чипами BeadChip;
 - ▶ номер заявки на приобретение;
 - ▶ номер заявки на продажу.
- 2 Найдите папку DMAP, которую требуется загрузить.
- 3 Убедитесь, что в каталоге загрузки имеется достаточно свободного места.
- 4 Запустите загрузку. Проверьте статус загрузки на вкладке Download Status and Log (Статус загрузки и журнал).
- 5 Сохраните папку DMAP в заданное для нее местоположение.

Загрузка BeadChip в адаптер

- 1 Нажмите на удерживающую защелку адаптера. Защелка слегка наклонится и откроется.
- 2 Возьмите чип BeadChip за края, поднесите его штрихкодом к удерживающей защелке и вставьте в углубление адаптера.

Рисунок 20 Загрузка чипа BeadChip в адаптер



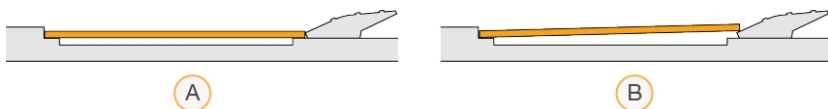
- 3 С помощью отверстий с какой-либо из сторон чипа BeadChip убедитесь, что BeadChip правильно установлен в углублении адаптера.

Рисунок 21 Установка и закрепление чипа BeadChip



- 4 Осторожно отпустите удерживающую защелку, чтобы закрепить BeadChip.
- 5 Осмотрите чип BeadChip сбоку, чтобы убедиться, что он плотно прилегает к адаптеру. При необходимости измените расположение чипа BeadChip.

Рисунок 22 Осмотр расположения чипа BeadChip



- A Правильное расположение — BeadChip плотно прилегает к адаптеру после того, как защелка отпущена.
- B Неправильное расположение — BeadChip неплотно прилегает к адаптеру после того, как защелка отпущена.

Подготовка сканирования

- 1 На главной странице выберите опцию **Experiment** (Эксперимент), а затем выберите **Scan** (Сканирование).
В результате выполнения команды Scan (Сканирование) откроется дверца отсека визуализации, можно будет извлечь расходные материалы, оставшиеся от предыдущего запуска, и откроется серия экранов настройки сканирования. Короткая задержка является нормальной.

Выгрузка расходных материалов для секвенирования

Если расходные материалы для секвенирования находятся в приборе при настройке сканирования, программное обеспечение даст указание выгрузить картридж с реактивом и картридж с буфером до перехода к следующему этапу.

- 1 При появлении соответствующего указания извлеките расходные материалы для секвенирования, использованные в ходе предыдущего запуска секвенирования.
 - a Извлеките картридж с реактивом из отсека реактивов. Утилизируйте неизрасходованное содержимое в соответствии с применимыми стандартами.
 - b Извлеките использованный картридж с буфером из буферного отсека.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

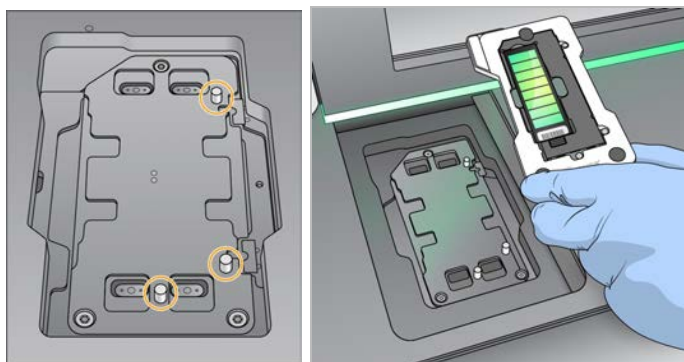
Этот комплект реактивов содержит потенциально опасные химические вещества. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Используйте соответствующие опасности средства индивидуальной защиты, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат. 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 Закройте дверцы отсека реактивов и буферного отсека.

Загрузка адаптера BeadChip

- 1 Воспользуйтесь направляющими штырями, чтобы установить адаптер BeadChip на площадке.

Рисунок 23 Загрузка адаптера BeadChip







- 2 Нажмите **Load** (Загрузка).
Дверца автоматически закроется, на экране появится идентификационный номер чипа BeadChip, и будет выполнена проверка датчиков. Короткая задержка является нормальной. Если штрихкод BeadChip будет невозможно считать, появится диалоговое окно, позволяющее ввести штрихкод вручную. См. раздел *Программному обеспечению не удается считать штрихкод BeadChip* на стр. 54.
- 3 Нажмите **Next** (Далее).



Настройка сканирования


- 1 На экране Scan Setup (Настройка сканирования) проверьте следующую информацию.
 - ▶ **Barcode** (Штрихкод) — при загрузке чипа BeadChip программным обеспечением считывается его штрихкод. Если штрихкод был введен вручную, появляется кнопка Edit (Редактировать) для внесения дальнейших изменений.
 - ▶ **Type** (Тип) — поле типа BeadChip заполняется автоматически на основе штрихкода BeadChip.
 - ▶ **DMAP Location** (Расположение DMAP) — местоположение папки DMAP задается на экране BeadChip Scan Configuration (Конфигурация сканирования BeadChip). Чтобы изменить расположение папки только для текущего сканирования, нажмите **Browse** (Обзор) и выберите верное местоположение.
 - ▶ **Output Location** (Расположение выходных данных) — местоположение выходных данных задается на экране BeadChip Scan Configuration (Конфигурация сканирования BeadChip). Чтобы изменить расположение папки только для текущего сканирования, нажмите **Browse** (Обзор) и выберите желаемое местоположение.
- 2 Нажмите **Next** (Далее).

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. 48*.

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.

Запуск сканирования

После завершения автоматической проверки нажмите **Start** (Запуск). Начнется сканирование. Сведения по настройке системы на автоматический запуск сканирования после автоматической проверки см. в разделе *Настройка параметров запуска на стр. 14*

Отслеживание хода сканирования

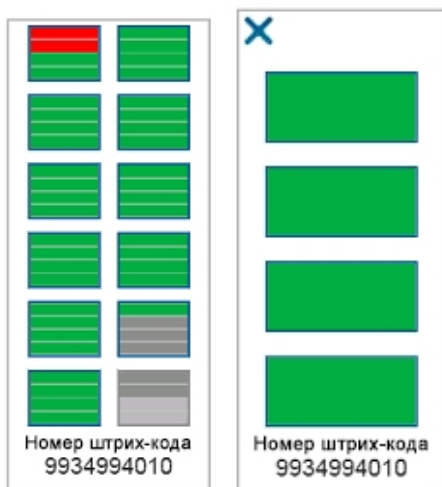
- 1 Отслеживайте ход выполнения сканирования посредством изображения BeadChip. Каждый цвет на изображении обозначает статус сканирования.
 - ▶ **Light gray** (Светло-серый) — не просканировано.
 - ▶ **Dark gray** (Темно-серый) — сканирование выполнено, но не зарегистрировано.

- ▶ **Green** (Зеленый) — сканирование и регистрация успешно выполнены.
- ▶ **Red** (Красный) — сканирование и регистрация завершились неудачей.

При сбое регистрации можно выполнить повторное сканирование образцов, содержащих неудачно отсканированные ячейки. См. раздел *Сбой сканирования с использованием BeadChip на стр. 54*.

- 2 Выберите изображение BeadChip, чтобы переключить представление выбранного образца с полноразмерного на детализированное.
 - ▶ В полноразмерном представлении отображаются образцы на чипе BeadChip и ячейки в пределах каждого образца.
 - ▶ В детализированном представлении отображается каждая ячейка выбранного образца.

Рисунок 24 Изображение устройства BeadChip: полноразмерный вид и вид в подробностях



ПРИМЕЧАНИЕ

Остановка сканирования является окончательной. Если остановить сканирование до его завершения, данные сканирования **не** сохранятся.

Передача данных

По завершении сканирования данные помещаются в очередь на передачу в папку выходных данных сканирования. Данные временно записываются в компьютер прибора. Временная папка удаляется с компьютера прибора автоматически при запуске последующего сканирования.

Время, необходимое на передачу данных, зависит от параметров подключения к сети. Перед началом последующего сканирования убедитесь, что данные были записаны в папку выходных данных. Чтобы это проверить, убедитесь, что файлы GTC присутствуют в папке штрихкодов. Дополнительную информацию см. в разделе *Структура папок выходных данных сканирования на стр. 74*.

Если соединение прерывается, передача данных возобновляется после восстановления соединения.

Глава 5. Техническое обслуживание

Введение	38
Выполнение ручной промывки	39
Замена воздушного фильтра	42
Обновления программного обеспечения	43
Завершение работы прибора	45

Введение

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

- ▶ **Промывки прибора** — проведение автоматической промывки после каждого запуска секвенирования позволяет поддерживать эффективность работы прибора. Однако при определенных обстоятельствах требуется периодическая промывка вручную. См. раздел *Выполнение ручной промывки на стр. 39*.
- ▶ **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 *Обновления программного обеспечения на стр. 43*.
- ▶ **Замена воздушного фильтра** — если прибор оснащен воздушным фильтром, регулярная его 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.

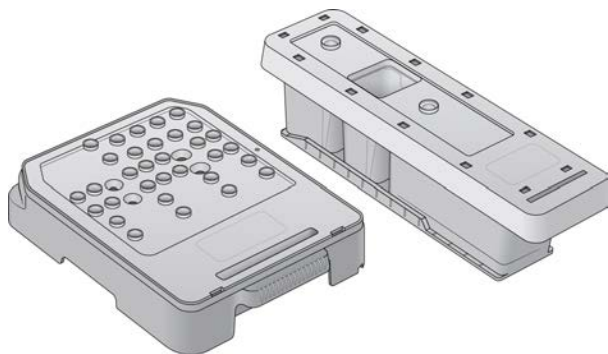
Выполнение ручной промывки

Запуск ручных промывок выполняется на главной странице. 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). <ul style="list-style-type: none"> • Требуется проводить через каждые 14 дней холостой работы прибора с установленными картриджем с реактивом и картриджем с буфером. • Требуется проводить через каждые 7 дней нахождения прибора в «сухом» состоянии (без картриджа с реактивом и картриджа с буфером). • Требуется проводить после выключения 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 % 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 25 Картридж для промывочного реактива и картридж для промывочного буфера



Подготовка к ручной промывке после запуска

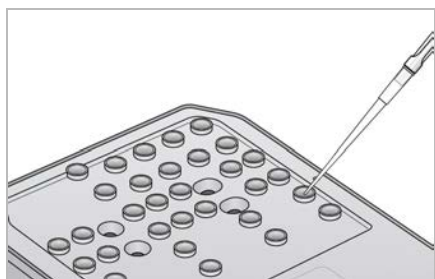
Расходные материалы, приобретаемые пользователем	Объем и описание
<ul style="list-style-type: none"> • NaOCl 	1 мл, разбавленный до 0,12 %. Загружается в картридж для промывочного реактива (позиция № 28).
<ul style="list-style-type: none"> • 100-процентный твин 20 • Вода лабораторного класса 	Используется 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-процентного раствора NaOCl:
 - ▶ 5 % раствор NaOCl (24 мкл);
 - ▶ вода лабораторного класса (976 мкл).
- 2 Переверните пробирку, чтобы перемешать содержимое.
- 3 Добавьте 1 мл 0,12-процентного раствора NaOCl в картридж для промывочного реактива. Правильная емкость эквивалентна положению № **28** в предварительно заполненном картридже.

Рисунок 26 Загрузите NaOCl



- 4 Смешайте следующие объемы растворов для получения 0,05-процентного промывочного раствора твин 20:
 - ▶ 100 % 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-процентный 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-процентного промывочного раствора твин 20:
 - ▶ 100-процентный 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 запуска.
- 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** (Начальная страница).

После промывки

После промывки сипперные трубки остаются в нижнем положении во избежание попадания воздуха в систему. Оставьте картриджи на месте до следующего запуска.

Замена воздушного фильтра

Если прибор оснащен воздушным фильтром, этот узел 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.
- 2 Надавите книзу на верхнюю часть лотка для воздушного фильтра, расположенного в задней части прибора, чтобы выдвинуть лоток.
- 3 Возьмитесь за верхнюю часть лотка для фильтра и потяните вверх, чтобы полностью извлечь его из прибора.
- 4 Выньте и утилизируйте старый фильтр.
- 5 Вставьте новый воздушный фильтр в лоток.

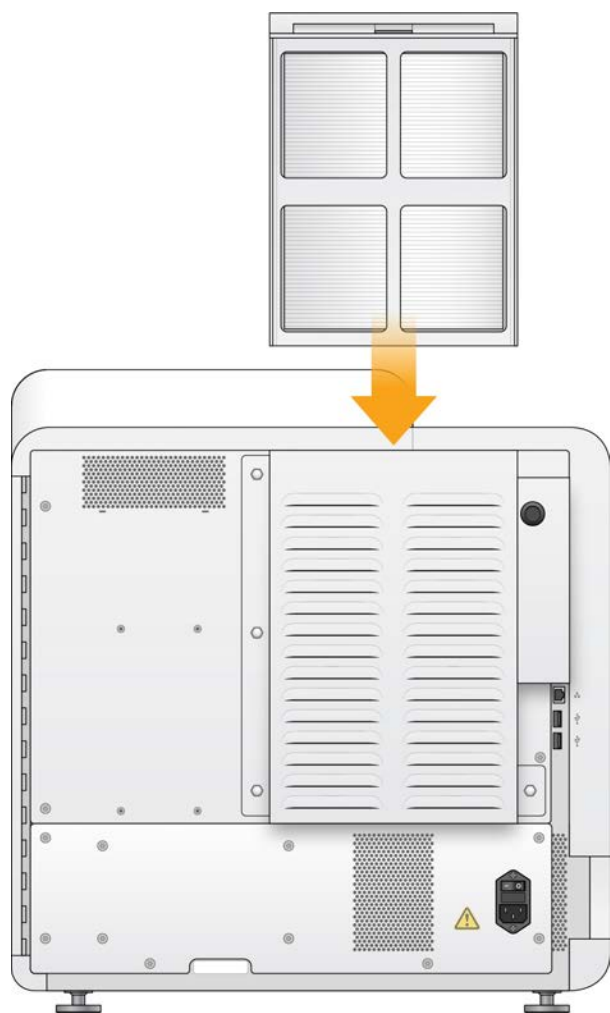


ПРИМЕЧАНИЕ

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.

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

Рисунок 27 Установка воздушного фильтра




Обновления 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 550](#) 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.

Завершение работы прибора

1 Выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).



ПРИМЕЧАНИЕ

Чтобы завершить работу прибора NextSeq 550Dx в режиме исследования, см. раздел *Возможные варианты перезагрузки и завершения работы прибора NextSeq 550Dx* на стр. 77.

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.



ОСТОРОЖНО!

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	46
Файлы поиска и устранения неисправностей	46
Исправление ошибок автоматической проверки	48
Контейнер с использованными реактивами заполнен	51
Рабочий процесс регибридации	52
Ошибки BeadChip и сканирования	54
Пользовательские наборы параметров и папки наборов параметров	56
Проверка системы	56
Сообщение об ошибке RAID	59
Конфигурирование настроек системы	59

Введение

С вопросами технического характера обращайтесь к следующим страницам поддержки системы NextSeq 550 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 запуска обращайтесь в отдел технической поддержки компании Illumina. См. раздел *Техническая помощь на стр. 83*.

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. 13*.

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 поиска и устранения неисправностей в запусках секвенирования

Основной файл	Папка	Описание
Файл с информацией о запуске (RunInfo.xml)	Корневой каталог	Содержит следующие сведения. <ul style="list-style-type: none"> • Название запуска секвенирования • Число циклов в запуске секвенирования • Число циклов в каждом считывании • Является ли считывание индексированным • Число полос и плиток в проточной кювете
Файл параметров запуска (RunParameters.xml)	Корневой каталог	Содержит информацию о параметрах запуска 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 секвенирования.
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 запуска, и содержат список версий программного и аппаратного обеспечения, использовавшихся для 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 секвенирования.
Файлы журнала дорожки (*LaneLog*.txt)	Журналы RTA	Регистрируют события, возникшие в связи с обработкой. Файлы журналов дорожки обновляются по мере выполнения запуска секвенирования.

Ошибки RTA

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

Файлы поиска и устранения неисправностей для матричного сканирования

Основной файл	Папка	Описание
Файл параметров сканирования (ScanParameters.xml)	Корневой каталог	Содержит информацию о параметрах сканирования. Данная информация включает дату сканирования, штрихкод BeadChip, местоположение файла кластера и местоположение файла описания.
Файлы журнала	Журналы	Файлы журналов содержат описание каждого этапа, выполненного на приборе во время сканирования.
Файлы числовых параметров	[Штрихкод]	Числовые показатели представлены с распределением по образцам и по разделам. В файле [штрихкод]_sample_metrics.csv для каждого образца и канала (красного и зеленого) приводятся значения параметров Percent Off Image (Процент кластеров за пределами изображения), Percent Outliers (Процент отклонений), P05, P50, P95, Avg FWHM Avg (Средняя ширина спектра на уровне 50 % амплитуды), FWHM Stddev (СО ширины спектра на уровне 50 % амплитуды) и Min Registration Score (Минимальный показатель регистрации). В файле [штрихкод]_section_metrics.csv для каждой ячейки и плитки приводятся значения параметров Laser Z-position (Положение лазера по вертикали), Through Focus Z-position (Положение сквозного фокуса по вертикали), Red FWHM (Ширина спектра на уровне 50 % амплитуды для красного канала), Green FWHM (Ширина спектра на уровне 50 % амплитуды для зеленого канала), Red Avg Pixel Intensity (Средняя пиксельная интенсивность для красного канала), Green Avg Pixel Intensity (Средняя пиксельная интенсивность для зеленого канала), Red Registration Score (Показатель регистрации для красного канала) и Green Registration Score (Показатель регистрации для зеленого канала).
Файл повторного сканирования	[Штрихкод]	В файле [штрихкод]_rescan.flowcell приводится список местоположений, скорректированных для повторного сканирования, включая увеличенное наложение плитки на плитку.

Исправление ошибок автоматической проверки

Если во время автоматической проверки возникают ошибки, примите следующие рекомендуемые меры по их устранению. Автоматическая проверка в случае секвенирования отличается от таковой для матричного сканирования.

В случае сбоя проверки перед запуском радиочастотный идентификатор (RFID) картриджа с реактивами не блокируется и может быть использован для последующего запуска. 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 запуска 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.

Проверки по запускам секвенирования

В случае сбоя проверки перед запуском радиочастотный идентификатор (RFID) картриджа с реактивами не блокируется и может быть использован для последующего запуска. 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)	<p>Возможно, проточная кювета установлена неправильно.</p> <ul style="list-style-type: none"> На экранах подготовки запуска 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.

Reagent Delivery (Подача реактивов)	Рекомендованное действие
Spent Reagents Empty (Удалите использованные реактивы)	Удалите использованные реактивы из контейнера и повторно загрузите пустой контейнер.

Проверки по процедурам матричного сканирования

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.
Verify Input Files (Проверьте входные файлы)	Убедитесь, что путь к файлу кластера и файлу описания верен, а файлы имеются в наличии.
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.

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.
Auto-Center (Автоматическое центрирование)	Извлеките адаптер BeadChip. Убедитесь, что чип BeadChip установлен в адаптер, затем повторно загрузите адаптер.

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 постановке запуска на паузу в случае заполнения контейнера. Датчики системы не инициируют постановку запуска на паузу во время кластеризации, ресинтезирования парных концевых фрагментов или автоматической промывки после запуска.

При приостановке выполнения запуска 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). Цикл возобновится автоматически.

Рабочий процесс регибридизации

Если числовые показатели, созданные в первые несколько циклов, указывают на значения интенсивности менее 2500, может потребоваться выполнение запуска 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 запуск) является окончательной. После ее использования нельзя восстановить запуск, нельзя повторно использовать расходные материалы запуска, данные секвенирования из запуска не сохраняются.

При завершении запуска пользователем программное обеспечение выполняет следующие шаги, прежде чем запуск завершится.

- ▶ Переводит проточную кювету в безопасное состояние.
- ▶ Снимает блокировку с RFID проточной кюветы для последующего запуска.
- ▶ Присваивает проточной кювете дату истечения срока годности регибридизации.
- ▶ Записывает журналы запуска секвенирования для завершенных запусков. Задержка при этом — нормальное явление.
- ▶ Пропускает автоматическую промывку после запуска.

При инициировании пользователем запуска регибридизации программное обеспечение выполняет следующие шаги, прежде чем начнется выполнение запуска.

- ▶ Создает папку запуска с соответствующим уникальным названием запуска.
- ▶ 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 запуск секвенирования в соответствии с указанными параметрами.

Моменты, подходящие для завершения запуска с целью выполнения регибридизации

Последующая регибридизация возможна только в случае завершения запуска 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 запуск 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 нужен новый картридж с реактивами NextSeq и картридж с буфером вне зависимости от того, когда был остановлен запуск.

Завершение текущего запуска

- 1 Выберите опцию **End Run** (Завершение запуска). 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 настройки запуска регибридизации.



ПРИМЕЧАНИЕ

Проточную кювету можно хранить в пластиковом футляре до 7 дней при температуре от 2 до 8 °C **без** осушителя. Наилучшие результаты получаются, если проточную кювету регибридизировать 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. 39*.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если картридж с реактивами и картридж с буфером, 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 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 **[Необязательно]** Нажмите **Use BaseSpace Sequence Hub Setting** (Использовать настройку BaseSpace Sequence Hub) и выберите один из следующих вариантов.
 - ▶ Мониторинг и хранение данных запуска
 - ▶ 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 запуск.

Ошибки BeadChip и сканирования

Программному обеспечению не удастся считать штрихкод BeadChip

При появлении диалогового окна с сообщением об ошибке считывания штрихкода выберите один из следующих вариантов ответа.

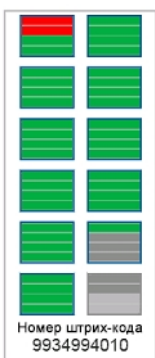
- ▶ Выберите **Rescan** (Сканировать повторно). Программное обеспечение выполнит повторную попытку считывания штрихкода.
- ▶ Выберите текстовое поле и введите номер штрихкода, как указано на изображении. В зависимости от чипа BeadChip, номер штрихкода может содержать до 12 цифр. Выберите **Save** (Сохранить). Изображение штрихкода сохранится в папке выходных данных.
- ▶ Выберите **Cancel** (Отмена). Дверца отсека визуализации откроется для выгрузки адаптера BeadChip.

Сбой сканирования с использованием BeadChip

Изображения регистрируются после выполнения сканирования. При регистрации гранулы распознаются путем сопоставления местоположений на отсканированном изображении со сведениями, приведенными на карте гранул или в папке DMAP.

Ячейки, которые не будут зарегистрированы, отображаются красным цветом на изображении устройства BeadChip.

Рисунок 28 Чип BeadChip с индикацией неудачно отсканированных ячеек



После завершения сканирования и записи отсканированных данных в выходную папку становится активной кнопка **Rescan** (Повторное сканирование).

При нажатии **Rescan** (Повторное сканирование) программное обеспечение выполняет следующие шаги.

- ▶ Выполняет повторное сканирование образцов, содержащих неудачно отсканированные ячейки, посредством увеличенного наложения плитки на плитку.
- ▶ Создает выходные файлы в исходной папке выходных данных.
- ▶ Выполняет перезапись предыдущих выходных файлов с заменой неудачно отсканированных ячеек.
- ▶ Увеличивает показание счетчика сканирований на единицу при каждом повторном сканировании, но в фоновом режиме. Выходная папка не переименовывается программным обеспечением.

Повторное сканирование или запуск нового сканирования

- 1 Выберите **Rescan** (Повторное сканирование), чтобы просканировать образцы, содержащие неудачно отсканированные ячейки.
- 2 Если сканирование по-прежнему завершается неудачей, завершите сканирование.
- 3 Извлеките чип BeadChip вместе с адаптером и проверьте чип BeadChip на наличие пыли или загрязнений. Для очистки загрязнений воспользуйтесь баллончиком со сжатым воздухом или другим методом удаления пыли сжатым воздухом.
- 4 Повторно загрузите BeadChip и запустите новое сканирование.
После запуска нового сканирования программное обеспечение выполняет следующие шаги.
 - ▶ Сканирует весь чип BeadChip.
 - ▶ Создает выходные файлы в новой папке выходных данных.
 - ▶ Увеличивает показание счетчика сканирований на единицу на основании числа сканирований на момент последнего повторного сканирования.

Замена файлов описания и файлов кластеров

- 1 Перейдите на страницу службы поддержки компании Illumina (support.illumina.com), найдите там используемое вами устройство BeadChip и нажмите на вкладку **Downloads** (Документы для скачивания).
- 2 Загрузите файлы для замены или обновления и скопируйте их в нужное местоположение в сети.



ПРИМЕЧАНИЕ

Удостоверьтесь в том, что вы выбрали файлы кластеров и файлы описания, совместимые с системой NextSeq 550. Название совместимых файлов должно содержать **NS550**.


- 3 Только если расположение было изменено, обновите местоположение на экране BeadChip Scan Configuration (Конфигурация сканирования BeadChip) следующим образом.
 - a На главной странице экрана NCS выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
 - b Выберите опцию **System Configuration** (Конфигурация системы).
 - c Выберите опцию **BeadChip Scan Configuration** (Конфигурация сканирования BeadChip).


- 4 Выберите опцию **Browse** (Обзор) и перейдите к местоположению замененных или обновленных файлов.


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.

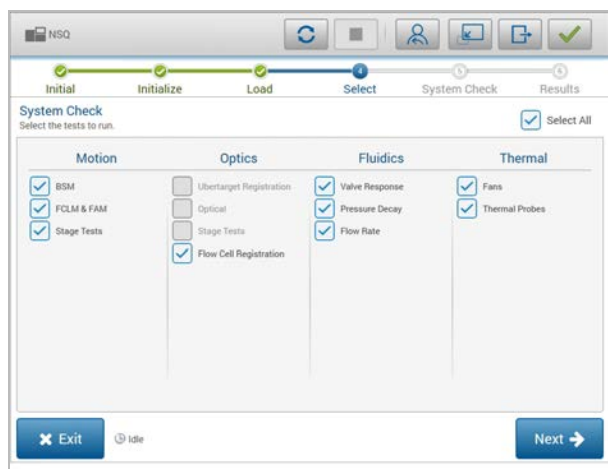


ПРИМЕЧАНИЕ

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 29 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 с высоким выходом.
- 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 **[Необязательно]** 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, 1 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 запуска 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).

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 местоположений, в которые переносятся данные для хранения и анализа.
- ▶ **BeadChip Scan Configuration** (Конфигурация сканирования BeadChip) — позволяет задать следующие условия:
 - ▶ принятое по умолчанию местоположение папки DMAP;
 - ▶ местоположение папки выходных данных;
 - ▶ формат, в котором будут сохраняться файлы изображений;
 - ▶ тип файла выходных данных.

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 4 чисел, разделенных точками, например 168.62.20.37.
- ▶ Введите маску подсети, являющейся частью сети IP.

- ▶ Введите используемый по умолчанию шлюз, являющийся маршрутизатором сети, подключенной к сети Интернет.
- 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 сети Интернет**, — 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 сети Интернет**, выберите **Member of work group** (Член рабочей группы) и введите название рабочей группы. Название рабочей группы уникально для учреждения.
- 7 Выберите **Save** (Сохранить).

Конфигурирование службы BaseSpace Sequence Hub

- 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: в **EU (Frankfurt)** (ЕС (Франкфурт)) или в **USA (N. Virginia)** (США (Сев. Вирджиния)).
 - ▶ 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 **Save** (Сохранить).

Конфигурация сканирования BeadChip

- 1 На экране Manage Instrument (Управление прибором) выберите **System configuration** (Конфигурация системы).
- 2 Выберите опцию **BeadChip Scan Configuration** (Конфигурация сканирования BeadChip).
- 3 Чтобы задать местоположение папки DMAP в сети учреждения, выберите **Browse** (Обзор) и перейдите к местоположению нужной папки в сети учреждения.



ПРИМЕЧАНИЕ

Перед каждым сканированием загружайте и копируйте содержимое папки DMAP в это местоположение. Содержимое папки DMAP необходимо для каждого сканирования BeadChip и является уникальным для каждого штрихкода BeadChip.

- 4 Чтобы задать местоположение сохранения выходных данных в сети учреждения, выберите **Browse** (Обзор) и перейдите к нужному местоположению в сети учреждения.
- 5 Выберите файловый формат сохраняемых изображений. Тип файла изображения, принятый по умолчанию — **JPG**.
- 6 Выберите файловый формат выходных данных сканирования. По умолчанию в качестве типа выходных файлов задан **GTC only** (Только GTC).
- 7 Выберите **Save** (Сохранить).
- 8 На экране Scan Map (Карта сканирования) укажите полный путь к файлу описания и файлу кластера для каждого поддерживаемого чипа BeadChip. Выберите **Browse** (Обзор) для каждого типа файла и перейдите к местоположению папки, содержащей эти файлы.

Приложение В. Анализ в режиме реального времени

Обзор программного обеспечения для анализа в режиме реального времени	62
Рабочий процесс анализа в реальном времени	64

Обзор программного обеспечения для анализа в режиме реального времени

Устройство NextSeq 550 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 демультиплексирования 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 секвенирования;
 - ▶ 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.

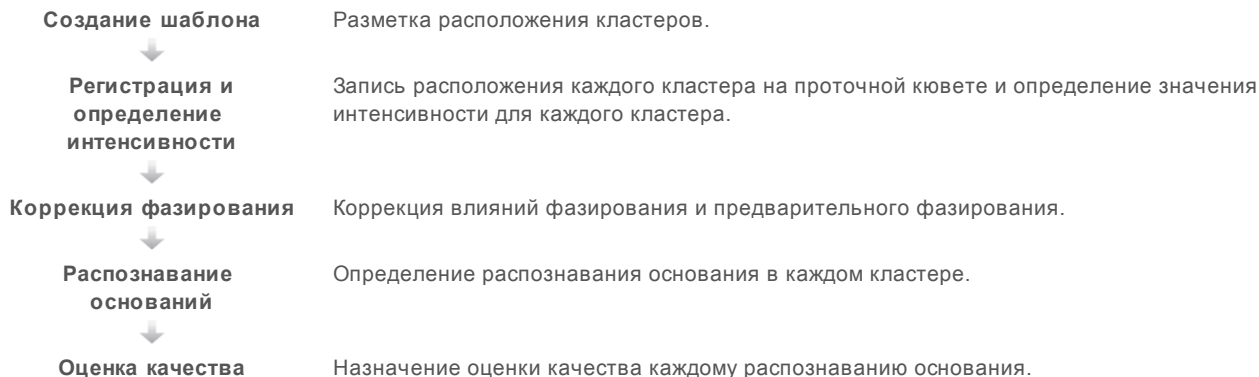
Обработка ошибок

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 запуске.
- ▶ *LaneNLog*.tsv содержит события обработки для каждой дорожки.
- ▶ *Error*.tsv содержит список ошибок, возникших в ходе запуска.
- ▶ *WarningLog*.tsv содержит предупреждения, выданные в ходе запуска.

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 **5** циклах должно быть хотя бы 1 основание, отличное от G. Для индексированных последовательностей RTA версии 2 требует наличия не менее 1 основания, отличного от G, в первых **2** 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).

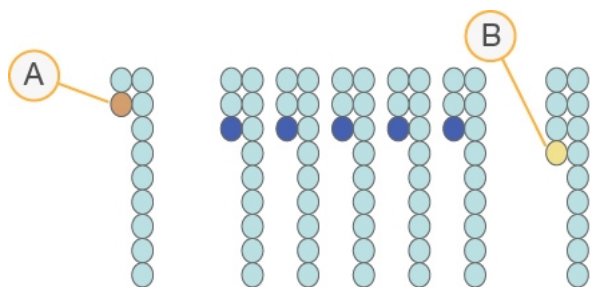
Коррекция фазирования

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 30 Фазирование и предварительное фазирование



- A Считывание с основанием в случае фазирования
- B Считывание с основанием в случае предварительного фазирования

Программа RTA2 позволяет исправлять эффекты фазирования и предварительного фазирования, что повышает качество данных на каждом отдельном цикле на протяжении общего запуска 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 550 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 31 Визуализация интенсивностей кластера

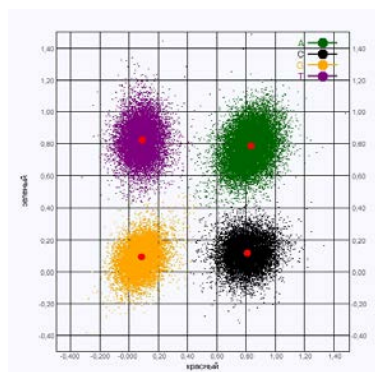


Таблица 1 Распознавание оснований при двухканальном секвенировании

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 запуска 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.

Считывания индекса должны 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 с целью обеспечения оптимально точного прогноза качества для запусков секвенирования, выполняемых с использованием конкретных конфигураций платформ секвенирования и версий химических реакций.

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

Приложение С. Файлы и папки выходных данных

Выходные файлы секвенирования	68
Структура папок выходных данных секвенирования	72
Выходные файлы сканирования	73
Структура папок выходных данных сканирования	74

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 1 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 1 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
Файл конфигурации RTA	Файл конфигурации RTA создается в начале запуска секвенирования; в нем перечисляются настройки для запуска секвенирования. [Корневая папка], RTAConfiguration.xml
Файл с информацией о запуске	Содержит название запуска секвенирования, количество циклов для каждого считывания, указывает, является ли считывание индексированным, а также указывает число полос и плиток проточной кюветы. Файлы сведений о запуске секвенирования создаются в начале секвенирования. [Корневая папка], RunInfo.xml

Тип файла	Описание, место расположения и название файла
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, со вложенными папками 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. 71</i> и <i>Наименование миниатюр изображений на стр. 71</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.

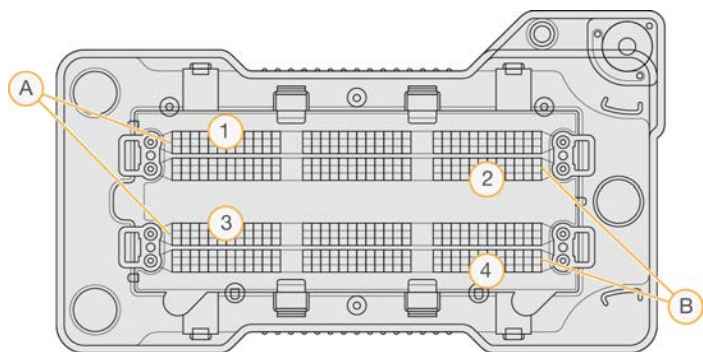
Таблица 2 Плитки проточной кюветы

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 32 Нумерация дорожек



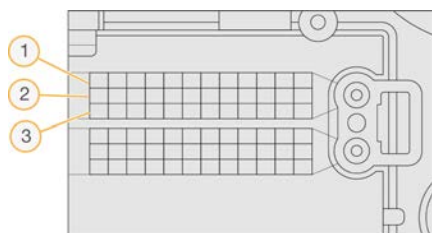
A Пара дорожек A — дорожки 1 и 3

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 33 Нумерация полос

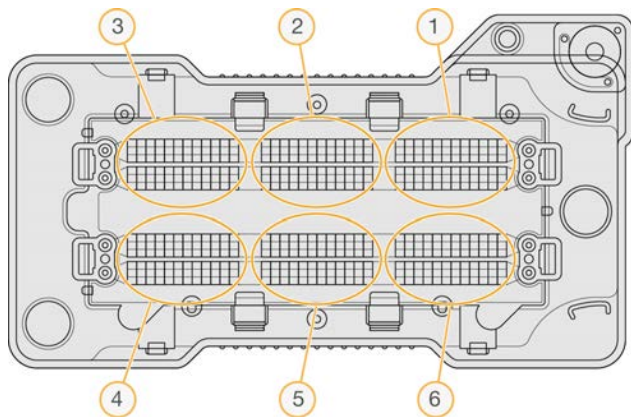


Нумерация камер

В приборе NextSeq 550 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.

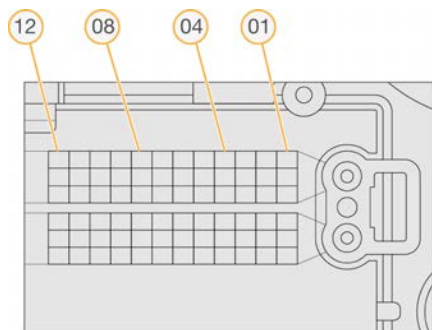
Рисунок 34 Нумерация камер и сегментов (показана проточная кювета с высоким выходом)



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 35 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. 68.

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 папок выходных данных секвенирования

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** (Набор параметров) — специфический для запуска 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

Выходные файлы сканирования

Тип файла	Описание, место расположения и название файла
Файлы GTC	Файл распознавания генотипа. Файл GTC создается для каждого образца, просканированного с использованием BeadChip. Имя файла включает штрихкод и название сканированного образца. [штрихкод]_[образец].gtc
Файлы изображений	Файлы изображений называются согласно участку, просканированному на чипе BeadChip. Название содержит сведения о штрихкоде, образце и ячейке на чипе BeadChip, а также о полосе и канале визуализации (красный или зеленый). [штрихкод]_[образец]_[ячейка]_[полоса]_[камера]_[плитка]_[канал].jpg <ul style="list-style-type: none"> • Barcode (Штрихкод) — имя файла начинается со штрихкода BeadChip. • Sample (Образец) — участок BeadChip, пронумерованный как ряд (R0X) сверху вниз и как колонка (C0X) слева направо. • Section (Ячейка) — пронумерованный ряд образца. • Swath (Полоса) — чипы BeadChip подвергаются визуализации как набор перекрывающихся плиток. Поэтому для визуализации ячейки используется только одна полоса. • Camera (Камера) — камера, которая используется для получения изображения. • Tile (Плитка) — участок визуализации, определяемый как поле обзора камеры. • Channel (Канал) — красный или зеленый канал.

Структура папок выходных данных сканирования

📁 [Дата]_[название прибора]_[№ сканирования]_[штрихкод]

📁 [Штрихкод]

📁 Config

📄 Effective.cfg — настройки конфигурирования записи данных, используемые во время сканирования.

📁 **Focus** (Фокус) — содержит файлы изображений, используемые для фокусировки сканера.

📁 **Logs** (Файлы журналов) — содержит файлы журналов с перечнем всех этапов сканирования.

📁 PreScanDiagnosticFiles

📁 [Дата_время] Barcode Scan

📄 ProcessedBarcode.jpg — изображение штрихкода BeadChip.

📄 Диагностика сканера (файлы журнала)

📄 PreScanChecks.csv — ведет учет результатов автоматической проверки.

📄 Файлы GTC — файлы распознавания генотипа (по одному файлу на каждый образец).

📄 Файлы IDAT — [используются по выбору] файлы данных интенсивности (два файла на образец; по одному на каждый канал).

📄 Image files (Файлы изображений) — отсканированные изображения для каждого образца, ячейки, полосы, камеры, плитки и канала.

📄 [Штрихкод]_sample_metrics.csv

📄 [Штрихкод]_section_metrics.csv

📄 ScanParameters.xml

Приложение D. Рекомендации относительно режима исследования для прибора NextSeq 550Dx

Введение	75
Совместимость расходных материалов для прибора NextSeq 550Dx	75
Начало работы с прибором NextSeq 550Dx	76
Индикаторы режимов работы прибора NextSeq 550Dx	77
Возможные варианты перезагрузки и завершения работы прибора NextSeq 550Dx	77

Введение

Инструкции, содержащиеся в данном справочнике, за некоторыми исключениями применимы в отношении прибора NextSeq 550Dx, работающего в режиме исследования с управляющим программным обеспечением NCS версии 4.0 или выше. Относительно работы в режиме исследования с использованием управляющего ПО NCS версии 3.0 см. документ *Справочник по работе прибора NextSeq 550Dx в режиме исследования (документ № 1000000041922)*.

Источник общих инструкций для программного обеспечения Local Run Manager зависит от того, в каком режиме вы используете прибор NextSeq 550Dx. При работе в режиме исследования пользуйтесь Справочником по программному обеспечению Local Run Manager (документ № 1000000002702). При работе в режиме диагностики см. инструкции по программному обеспечению Local Run Manager в *Справочном руководстве к прибору NextSeq 550Dx (документ № 1000000009513)*. В управляющем программном обеспечении NCS версии 3.0 не предусмотрена возможность использования программного обеспечения Local Run Manager.

Разница между работой прибора NextSeq 550Dx в режиме исследования и прибором NextSeq 550 включает следующие позиции:

- ▶ совместимость расходных материалов;
- ▶ включение прибора;
- ▶ перезапуск и завершение работы прибора.

Совместимость расходных материалов для прибора NextSeq 550Dx

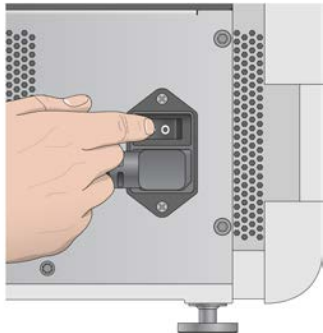
Выполнение запуска секвенирования на приборе NextSeq 550Dx требует наличия одноразового комплекта NextSeq 550/550 или комплекта реактивов с высоким выходом NextSeq 550Dx.

Если для запуска в режиме исследования используется комплект реактивов с высоким выходом NextSeq 550Dx, все его компоненты должны относиться к одной партии реактивов. Комплект NextSeq 550/550 нельзя использовать для выполнения запуска в режиме диагностики.

Начало работы с прибором NextSeq 550Dx

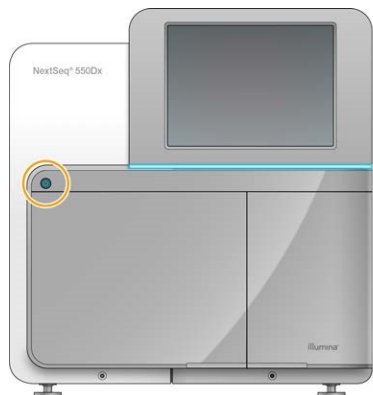
Переведите сетевой выключатель в положение I (вкл.).

Рисунок 36 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. По умолчанию прибор загружается для работы в режиме диагностики.

Рисунок 37 Кнопка питания расположена на передней панели прибора



- 2 Дождитесь окончания загрузки операционной системы. Операционное программное обеспечение NextSeq 550Dx (NOS) автоматически запускает и инициализирует систему. По завершении шага инициализации откроется главная страница.
- 3 Введите имя пользователя программного обеспечения Local Run Manager и пароль. Информация относительно паролей Local Run Manager приведена в *Справочном руководстве к прибору NextSeq 550Dx (документ № 100000009513)*.
- 4 Нажмите **Login** (Имя пользователя). Откроется начальный экран со значками Sequence (Секвенирование), Local Run Manager, Manage Instrument (Управление прибором) и Perform Wash (Выполнение промывки).
- 5 Воспользуйтесь командой «Перезагрузка в режим RUO» в NOS для безопасного завершения работы прибора и перезагрузки его в режим исследования.
 - ▶ Выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
 - ▶ Нажмите **Reboot / Shutdown** (Перезагрузка/Завершение работы).
 - ▶ Нажмите **Reboot to RUO** (Перезагрузка в режим RUO).

- 6 Дождитесь окончания загрузки операционной системы. Программное обеспечение NCS автоматически запускает и инициализирует систему. По завершении шага инициализации откроется главная страница.
- 7 Если конфигурация вашей системы подразумевает обязательное использование имени пользователя и пароля, войдите в учетную запись Windows, используя имя пользователя и пароль, установленные для вашей организации.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если вы не уверены, в каком из режимов работает прибор, ознакомьтесь с содержанием раздела *Индикаторы режимов работы прибора NextSeq 550Dx*.

Индикаторы режимов работы прибора NextSeq 550Dx

В таблице ниже приведены индикаторы режимов работы прибора, которые выводятся на страницах экрана управляющего программного обеспечения NextSeq (NCS) или операционной системы NextSeq (NOS). Информацию о том, как переключиться из режима исследования в режим диагностики, см. в разделе *Возможные варианты перезагрузки и завершения работы прибора NextSeq 550Dx* на стр. 77.

Режим	Начальный экран	Цветная полоса	Ориентация значка состояния
Режим диагностики	Добро пожаловать в NextSeqDx	Синяя	Горизонтальная
Режим исследования	Добро пожаловать в NextSeq	Оранжевая	Вертикальная

Возможные варианты перезагрузки и завершения работы прибора NextSeq 550Dx

Нажимая на кнопки Shutdown Options (Возможные варианты завершения работы), можно получить доступ к следующим функциям прибора NextSeq 550Dx:

- ▶ Reboot to Dx (Перезагрузка в режим Dx) — прибор начнет работать в режиме диагностики;
- ▶ Reboot to RUO (Перезагрузка в режим RUO) — прибор начнет работать в режиме исследования;
- ▶ Shutdown (Завершение работы) — прибор начнет работать в режиме диагностики.
- ▶ Exit to Windows (Выход в Windows) — в зависимости от настроенных разрешений, вы можете закрыть программное обеспечение NCS и увидеть рабочий стол ОС Windows.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если вы используете прибор NextSeq 550Dx в режиме исследования, при возвращении в режим диагностики вам будет предложено выполнить промывку после запуска.

Перезагрузка в режим диагностики

Воспользуйтесь командой «Перезагрузка в режим Dx» для безопасного завершения работы прибора и перезагрузки его в режим диагностики.

- 1 Выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Нажмите **Shutdown options** (Опции выключения).

- 3 Нажмите **Reboot to Dx** (Перезагрузка в режим Dx).

Перезагрузка в режим исследования

Воспользуйтесь командой «Перезагрузка в режим RUO» для безопасного завершения работы прибора и перезагрузки его в режим исследования.

- 1 Выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Нажмите **Shutdown options** (Опции выключения).
- 3 Нажмите **Reboot to RUO** (Перезагрузка в режим RUO).

Завершение работы 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.



ПРИМЕЧАНИЕ

По умолчанию прибор после включения загружается для работы в режиме диагностики.



ОСТОРОЖНО!

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.

Выход в Windows

Команда «Выход в Windows» позволяет осуществить доступ к операционной системе прибора и к любой из папок на том компьютере, который подключен к прибору. Эта команда безопасным образом отключает программное обеспечение и осуществляет выход в Windows.

- 1 Выберите опцию **Manage Instrument** (Управление прибором).
- 2 Нажмите **Shutdown options** (Опции выключения).
- 3 Нажмите **Exit to Windows** (Выход в Windows).

Алфавитный указатель

В

- BaseSpace Sequence Hub 1, 22
 - значки передачи 29
 - конфигурирование 60
 - логин 22, 54
- BeadChip
 - адаптер 6, 33
 - анализ 1
 - загрузка 35
 - ориентация штрихкода 33
 - сбой регистрации 54
 - типы 1
 - штрихкод не считывается 54

D

- Decode File Client
 - доступ через BeadChips 33
 - доступ через учетную запись 33

I

- InterOp 47, 68

L

- Local Run Manager 22
 - модули 21
 - создание запуска 18

N

- NextSeq 550Dx
 - включение прибора 76
 - выход в Windows 78
 - завершение работы 77
 - завершение работы прибора 78
 - имя и пароль пользователя системы 76
 - инициализация программного обеспечения 76
 - перезагрузка 77-78
 - перезагрузка в режим Dx 77
 - перезагрузка в режим RUO 78
 - перезагрузка прибора 77
 - переключатель питания 76

программное обеспечение Local Run Manager 75

R

- RTA v2
 - прекращение 62
- RTA2
 - обработка ошибок 63
- RTAv2
 - обзор 62
- RunInfo.xml 68

U

- Universal Copy Service 29

W

- Windows
 - доступ 6
 - пароль 6

A

- адаптер
 - BeadChip, загрузка 35
 - обзор 6
 - ориентация BeadChip 33
- алгоритм Phred 66
- анализ
 - выводимые файлы 68
 - опции 21-22
- анализ, первичный 66

Б

- буферный отсек 3

В

- визуализация, двухканальное секвенирование 65
- воздушный фильтр 42
- входные файлы, сканирование папка DMAP 31
- файлы кластера 31
- файлы описания 31

выводимые файлы 68
выключение прибора 45
выходные файлы, секвенирование 68
выходные файлы, сканирование
GTC, файлы IDAT-GTC 73

Г

гипохлорит натрия, промывка 40

Д

дверца отсека проточной кюветы 21
длина считывания 17
документация 2, 83

З

замечания по индексированию 66
запуски
создать 18-19
значки
ошибки и предупреждения 5
свернуть NCS 6
состояние 5

И

изображения миниатюр 69
имя и пароль системного пользователя 11
имя пользователя и пароль 11
интенсивности 65
использованные реактивы
полный контейнер 51
утилизация 24
Использованные реактивы
утилизация 41
исходные файлы, сканирование
папка DMAP, скачивание 32

К

картридж с буфером 10, 26
картридж с реактивами
емкость № 28 40
обзор 9
подготовка 19
кластеры, проходящие фильтр 66
клиент для работы с файлами
дешифрования 31

кнопка питания 6, 11
компоненты
буферный отсек 3
отсек визуализации 3
отсек воздушного фильтра 3
отсек для реактивов 3
строка состояния 3

М

местоположение кластера
создание шаблона 64
местоположение папки 23
многоцелевое ПО BlueFuse Multi 1
модули, Local Run Manager 21

Н

настройка запуска, расширенные опции 14
настройки конфигурации 59
нумерация дорожек
пары дорожек 69
Нумерация камер 70
нумерация плиток 71
нумерация полос 70

О

обновление программного обеспечения 43
обучение онлайн 2
отсек визуализации 3
отсек воздушного фильтра 3-4
отсек для реактивов 3
оценки Q-score 66
ошибки
вероятность 66
ошибки и предупреждения 5
в выходных файлах 63

П

папка DMAP
клиент для работы с файлами
дешифрования 31
скачивание 32
папка выходных данных 21
параметры
распознавание оснований 65
параметры запуска
редактировать параметры 22

- режим Local Run Manager 22
 - ручной режим 23
- передача данных
 - значки активности 29
 - сканирование данных 37
 - служба универсального копирования 29
- переключатель питания 11
- поддержка клиентов 83
- поиск и устранение неисправностей
 - замена файлов описания и файлов кластеров 55
 - контейнер с использованными реактивами 51
 - не считывается штрихкод BeadChip 54
 - проверка перед запуском 48
 - проверка системы 56
 - сбой регистрации результатов сканирования 54
 - файлы, относящиеся к запуску 46-47
 - числовые показатели плохого качества 52
- Поиск и устранение неисправностей
 - опции контакта 46
 - файлы, относящиеся к сканированию 48
- помощь, техническая 83
- предупреждения о состоянии 5
- прибор
 - запуск 11
 - кнопка питания 6
 - настройки конфигурирования 59
- прибор NextSeq 550Dx
 - индикаторы режимов работы 77
- проверка перед запуском 27, 36, 48
- проверка системы 56
- программное обеспечение
 - автоматическое обновление 44
 - анализ изображений, распознавание оснований 4
 - инициализация 11
 - на приборе 4
 - настройки конфигурации 59
 - обновление вручную 44
 - продолжительность запуска 17
 - создание запуска 18-19
- программное обеспечение анализа в реальном времени 1, 4
- программное обеспечение анализа в реальном времени (RTA)
 - результаты 68
- продолжительность запуска 17

- промывка
 - автоматическая 30
 - компоненты промывки 39
 - расходные материалы, приобретаемые пользователем 39
- Промывка
 - промывка вручную 39
- промывка после запуска 30
- промывка прибора 39
- проточная кювета
 - визуализация 70
 - направляющие штыри 24
 - нумерация дорожек 69
 - нумерация плиток 71
 - обзор 8
 - пары дорожек 8
 - плитки 69
 - регибридизация 52
 - типы 1
 - упаковка 19
- Проточная кювета
 - наименование файлов изображений 71
 - очистка 19
- проточные кюветы
 - номер полосы 70
- профилактическое техническое обслуживание 38
- прохождение фильтра (ПФ) 66

P

- рабочий процесс
 - BeadChip 35
 - Local Run Manager 22
 - NCS 22
 - гипохлорит натрия 40
 - дверца отсека проточной кюветы 21
 - замечания по индексированию 66
 - использованные реактивы 24
 - картридж с буфером 26
 - картридж с реактивами 19, 26
 - логин BaseSpace Sequence Hub 22, 54
 - обзор 17, 32
 - подготовка проточной кюветы 19
 - проверка перед запуском 27, 36
 - продолжительность запуска 17
 - проточная кювета 24
 - расширенные опции загрузки 14
 - режим Local Run Manager 17, 22
 - ручной режим 23
 - секвенирование 64

- числовые показатели запуска 28
- рабочий процесс секвенирования 17, 64
- распознавание оснований 65
 - замечания по индексированию 66
- расположение кластера
 - файлы 68
- расходные материалы 10
 - вода лабораторного класса 15
 - запуски секвенирования 14
 - картридж с реактивами 9
 - проточная кювета 8
 - расходные материалы для промывки 39-40
 - технической обслуживание прибора 15
- расходные материалы, приобретаемые пользователем 14-15
- расширенные опции загрузки 14
- реактивы
 - надлежащая утилизация 26
- регибридизация праймеров 52
- регибридизация, считывание 1 52
- режим выполнения запуска
 - Local Run Manager 22
 - вручную 22
 - ручной 23
- ручной режим
 - создание запуска 19

С

- секвенирование
 - расходные материалы, приобретаемые пользователем 14
- сканирование, выходные файлы GTC, IDAT 73
- слив расходных материалов 14
- Служба мониторинга Illumina Proactive 13
- совместимость
 - отслеживание по RFID 9
- создание запуска 18-19
- создание шаблона 64
- сообщение об ошибке RAID 59
- справка
 - документация 2
- Средство просмотра анализов секвенирования 16
- строка состояния 3

Т

- таблицы качества 66

- техническая поддержка 83
- техническое обслуживание прибора
 - расходные материалы 15
- техническое обслуживание, профилактическое 38

У

- указания в отношении воды лабораторного класса 15
- управление прибором
 - выключение 45
- управляющее программное обеспечение 4

Ф

- фазирование
 - предварительное фазирование 64
- файлы locs 68
- Файлы RunInfo.xml 47, 68
- файлы журнала
 - GlobalLog 63
 - LaneNLog 63
- файлы исходных данных, сканирование
 - файлы кластеров 55
 - файлы описания 55
- файлы распознанных оснований 68
- файлы фильтра 68
- фильтр чистоты 66
- формамаид, положение № 6 27

Ц

- циклы в процессе считывания 17

Ч

- числовые показатели
 - циклы интенсивности 29
 - циклы плотности кластеров 29
- числовые показатели запуска 28
- чистота сигнала 66

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
Великобритания	+44 800-012-60-19	+44 207-305-71-97
Германия	+49 800-101-49-40	+49 893-803-56-77
Гонконг	800-96-02-30	
Дания	+45 808-201-83	+45 898-711-56
Ирландия	+353 180-093-66-08	+353 016-95-05-06
Испания	+34 911-89-94-17	+34 800-30-01-43
Италия	+39 800-98-55-13	+39 236-00-37-59
Китай	400-066-58-35	
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	
Тайвань	008-066-517-52	
Финляндия	+358 800-91-83-63	+358 974-79-01-10
Франция	+33 805-10-21-93	+33 170-77-04-46
Швейцария	+41 565-80-00-00	+41 800-20-04-42
Швеция	+46 850-61-96-71	+46 200-88-39-79
Япония	0800-111-50-11	
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., 2018. Все права защищены.

illumina®