

Režim výzkumu přístroje NextSeq 550Dx

Referenční příručka přístroje



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

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

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

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

© 2018 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

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

Historie revizí

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 1000000041922 v01	březen 2018	Do části Přizpůsobení systémového nastavení byly doplněny informace o monitorovací službě Illumina Proactive.
Dokument č. 1000000041922 v00	listopad 2017	První vydání.

Obsah

Kapitola 1 Přehled	1
Popis této příručky	1
Úvod	1
Další zdroje	2
Součásti přístroje	2
Přehled spotřebního materiálu pro sekvenování	5
Kapitola 2 Začínáme	9
Spuštění přístroje	9
Přizpůsobení systémového nastavení	10
Spotřební materiál a vybavení dodávané uživatelem	11
Kapitola 3 Sekvenování	13
Úvod	13
Pracovní postup sekvenování	14
Příprava kazety reagensů	14
Příprava průtokové kvyety	15
Příprava knihoven na sekvenování	15
Nastavení sekvenačního běhu	16
Sledování postupu běhu	23
Automatické omytí po běhu	24
Kapitola 4 Skenování	26
Úvod	26
Pracovní postup skenování	27
Stažení složky DMAP	27
Vložení BeadChipu do adaptéru	28
Nastavení skenu	29
Sledování postupu skenu	31
Kapitola 5 Údržba	33
Úvod	33
Ruční mytí	33
Výměna vzduchového filtru	36
Aktualizace softwaru	37
Možnosti restartu a vypnutí	39
Příloha A Řešení problémů	40
Úvod	40
Soubory řešení problémů	40
Odstranění chyb automatické kontroly	41
Zásobník na spotřebované reagensie je plný	43
Pracovní postup rehybridizace	44

Chyby BeadChipu a skenování	45
Vlastní návody a složky návodů	47
Chybová zpráva RAID	47
Konfigurace nastavení systému	47
Příloha B Real-Time Analysis	51
Přehled softwaru Real-Time Analysis	51
Pracovní postup softwaru Real-Time Analysis	52
Příloha C Výstupní soubory a složky	56
Výstupní soubory sekvenování	56
Struktura výstupní složky sekvenování	59
Výstupní soubory skenování	60
Struktura výstupní složky skenování	60
Rejstřík	61
Technická pomoc	65

Kapitola 1 Přehled

Popis této příručky	1
Úvod	1
Další zdroje	2
Součásti přístroje	2
Přehled spotřebního materiálu pro sekvenování	5

Popis této příručky

Tato referenční příručka k přístroji poskytuje pokyny k používání přístroje NextSeq 550Dx v režimu výzkumu (RUO).

Úvod

Přístroj Illumina® NextSeq™ 550Dx je jednotné řešení, které poskytuje hladký přechod mezi vysokovýkonným sekvenováním a čipovým skenováním.

Funkce sekvenování

- ▶ **Vysokovýkonné sekvenování** – Přístroj NextSeq™ 550 umožňuje sekvenování exomů, celých genomů a transkriptomů a podporuje knihovny TruSeq™ a Nextera™.
- ▶ **Typy průtokových kyvet** – Průtokové kyvety jsou dostupné v konfiguracích pro vysoký výkon a střední výkon. Každý typ průtokové kyvety je vybaven kompatibilní předem naplněnou kazetou reagentů.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** – Integrovaný analytický software provádí na přístroji analýzu dat, která zahrnuje analýzu obrazu a přiřazení báze. Přístroj NextSeq 550Dx používá implementaci softwaru RTA s názvem RTA v2, která obsahuje důležité rozdíly v architektuře a funkcích. Další informace naleznete v části *Real-Time Analysis na straně 51*.
- ▶ **Integrace systému BaseSpace®** – Pracovní postup sekvenování je integrován se systémem BaseSpace, genomickým výpočetním prostředím společnosti Illumina, které slouží k analýze dat, ukládání a spolupráci. U přístrojů konfigurovaných pro systém BaseSpace se informace knihoven a parametry běhu zadávají na kartě Prep (Příprava) systému BaseSpace. Běhy, které byly nastaveny v systému BaseSpace, se zobrazují v rozhraní přístroje během nastavení běhu. Při postupu běhu jsou výstupní soubory v reálném čase streamovány do systému BaseSpace nebo BaseSpace Onsite.

Funkce čipového skenování

- ▶ **Integrované čipové skenování v řídicím softwaru** – Přístroj NextSeq 550Dx umožňuje přecházet mezi čipovým skenováním a vysokovýkonným sekvenováním na stejném přístroji používajícím stejný řídicí software.
- ▶ **Rozšířené možnosti snímání** – Systém snímání v přístroji NextSeq 550Dx obsahuje úpravy softwaru a prostoru, které umožňují snímat oblast většího povrchu, což je potřeba ke skenování Beadchip.
- ▶ **Typy BeadChipu** – Mezi kompatibilní typy BeadChipu patří CytoSNP-12, CytoSNP-850K a Karyomap-12.
- ▶ **Adaptér skenu BeadChip** – Opakovaně použitelný adaptér skenu BeadChip umožňuje snadné vložení BeadChipu do přístroje.
- ▶ **Analýza dat** – Data čipu můžete analyzovat pomocí softwaru BlueFuse® Multi.

Další zdroje

Z webu společnosti Illumina si můžete stáhnout následující dokumentaci.

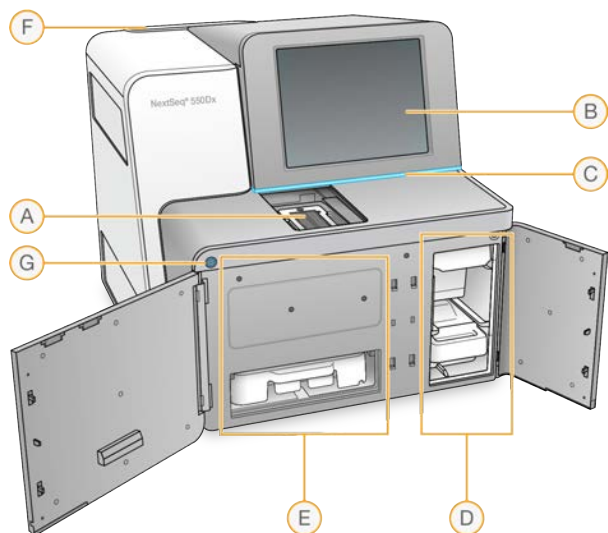
Zdroj	Popis
<i>Referenční příručka pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)</i>	Obsahuje pokyny pro obsluhu přístroje a postupy při řešení problémů v diagnostickém režimu.
<i>Příručka pro přípravu pracoviště pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009869)</i>	Obsahuje specifikace laboratorního prostoru, požadavky na elektrické připojení a poznámky k prostředí.
<i>Příručka bezpečnosti a souladu s předpisy pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009868)</i>	Obsahuje informace o tom, na co je třeba dbát z hlediska bezpečnosti provozu, prohlášení o souladu s předpisy a označení přístroje.
<i>Příručka souladu s předpisy čtečky RFID (dokument č. 100000030332)</i>	Obsahuje informace o čtečce RFID v přístroji, certifikace souladu s předpisy a informace o bezpečnosti.
<i>Denaturace a ředění knihoven pro systém NextSeq (dokument č. 15048776)</i>	Obsahuje pokyny k denaturaci a ředění knihoven připravených pro sekvenační běh a k přípravě volitelné kontroly PhiX. Tento krok platí pro většinu typů knihoven.
<i>Příručka pro vlastní primery NextSeq (dokument č. 15057456)</i>	Obsahuje informace o používání vlastních sekvenačních primerů namísto sekvenačních primerů společnosti Illumina.
<i>Nápověda k softwaru BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Obsahuje informace o používání systému BaseSpace® a dostupných možnostech analýzy.

Na [stránce podpory přístroje NextSeq 550Dx](#) na webu společnosti Illumina naleznete dokumentaci, odkazy ke stažení softwaru, online školení a odpovědi na nejčastější dotazy.

Součásti přístroje

K přístroji NextSeq 550Dx patří dotyková obrazovka, stavový proužek a 4 přihrádky.

Obrázek 1 Součásti přístroje



- A **Přihrádka pro snímání** – Uchovává průtokovou kyvetu pro sekvenování nebo adaptér skenu BeadChip pro skenování.
- B **Dotyková obrazovka** – Umožňuje nastavení a konfiguraci přístroje pomocí rozhraní řídicího softwaru.

- C **Stavový proužek** – Zobrazuje stav přístroje jako provádějící zpracování (modrá), vyžadující pozornost (oranžová) nebo připravený k sekvenování (zelená).
- D **Příhrádka na pufr** – Slouží k uchování kazety s pufrům a zásobníku na spotřebované reagencie.
- E **Příhrádka na reagencie** – Slouží k uložení kazety reagencí.
- F **Příhrádka na vzduchový filtr** – Slouží k uchování vzduchového filtru. K filtru se lze dostat ze zadní části přístroje.
- G **Tlačítko napájení** – Zapíná a vypíná přístroj a jeho počítač.

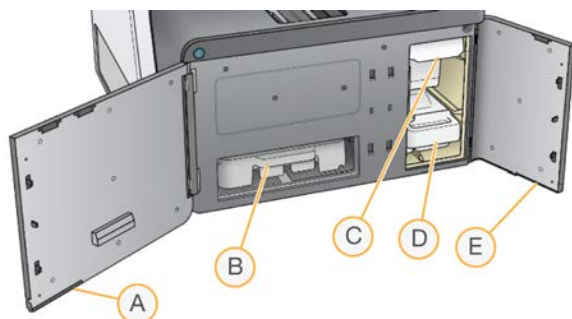
Příhrádka pro snímání

V příhrádce pro snímání se nachází prostor, který obsahuje tři zarovnávací piny k umístění průtokové kyvety pro sekvenování nebo adaptéru BeadChipu pro skenování. Po vložení průtokové kyvety nebo adaptéru BeadChipu se dvířka příhrádky pro snímání automaticky uzavřou a komponenty se přesunou na svá místa.

Příhrádky na reagencie a pufr

Chcete-li na přístroji NextSeq 550Dx nastavit sekvenační běh, potřebujete mít přístup do příhrádky na reagencie a pufr, abyste mohli vložit spotřební materiál pro běh a vyprázdnit zásobník na spotřebované reagencie.

Obrázek 2 Příhrádky na reagencie a pufr



- A **Dvířka příhrádky na reagencie** – Příhrádka na reagencie se zavírá západkou vpravo pod dvířky. V příhrádce na reagencie se nachází kazeta reagencí.
- B **Kazeta reagencí** – Kazeta reagencí je předem naplněna jednorázovým spotřebním materiálem.
- C **Kazeta s pufrům** – Kazeta s pufrům je předem naplněna jednorázovým spotřebním materiálem.
- D **Zásobník na spotřebované reagencie** – Zde se po každém běhu shromáždí spotřebované reagencie určené k likvidaci.
- E **Dvířka příhrádky na pufr** – Příhrádka na pufr se zavírá západkou v levém dolním rohu dvířek.

Část pro vzduchový filtr

Příhrádka pro vzduchový filtr, která tento filtr drží, se nachází v zadní části přístroje. Vzduchový filtr vyměňujte každých 90 dní. Informace o výměně filtru najdete v části [Výměna vzduchového filtru na straně 36](#).

Software NextSeq 550Dx






Software přístroje obsahuje integrované aplikace, které provádějí sekvenační běhy nebo čipové skenování.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS)** – Řídicí software vás provádí postupem nastavení sekvenačního běhu nebo čipového skenování.

- **Software Real-Time Analysis (RTA)** – Software RTA provádí u sekvenačních běhů analýzu obrázků a přiřazování bází během běhu. Přístroj NextSeq 550Dx používá software RTA v2, který obsahuje důležité rozdíly v architektuře a funkcích oproti předchozím verzím. Další informace naleznete v části *Real-Time Analysis* na straně 51.

Stavové ikony

Stavová ikona v pravém horním rohu kontroly signalizuje změny v podmínkách během nastavení běhu nebo v průběhu běhu.

Stavová ikona	Název stavu	Popis
	Stav OK	Systém je normální.
	Zpracování	Systém provádí zpracování
	Varování	Došlo k varování. Varování nezastaví běh ani nevyžadují nápravnou akci, které by podmiňovala další pokračování.
	Chyba	Došlo k chybě. Chyby vyžadují nápravnou akci, než bude možné pokračovat v běhu.
	Nutný servis	Objevilo se upozornění, které vyžaduje vaši pozornost. Bližší informace jsou obsaženy v příslušné zprávě.

Dojde-li k nějaké změně v podmínkách, ikona se varovně rozblíká. Chcete-li získat bližší informace o této změně, vyberte ikonu. Volbou **Acknowledge** (Vzít na vědomí) zprávu přijmete a pomocí **Close** (Zavřít) zavřete dialogové okno.



POZNÁMKA

Jakmile zprávu přijmete, ikona se obnoví a zpráva bude zašedlá. Pokud uživatel vybere příslušnou ikonu, bude si moci zprávu přečíst i později, ale po restartu softwaru NCS tato zpráva zmizí.

Tlačítko napájení

Tlačítkem napájení na přední části přístroje NextSeq 550Dx lze přístroj a jeho počítač vypínat a zapínat. Toto tlačítko může mít následující funkce podle toho, v jakém stavu se nachází napájení přístroje. Ve výchozím nastavení se přístroj NextSeq 550Dx zapíná v diagnostickém režimu.

Informace o vypnutí přístroje naleznete v části *Vypnutí přístroje* na straně 39.

Stav napájení	Akce
Napájení přístroje je vypnuto	Přístroj zapnete krátkým stisknutím tlačítka.
Napájení přístroje je zapnuto	Přístroj vypnete krátkým stisknutím tlačítka. Na obrazovce se objeví dialogové okno, ve kterém je třeba potvrdit normální vypnutí přístroje.
Napájení přístroje je zapnuto	Přidržíte-li tlačítko napájení po dobu 10 sekund, přístroj i jeho počítač vypnete „natvrdo“. Tímto způsobem však přístroj vypínáte pouze v případě, že jinak nereaguje.

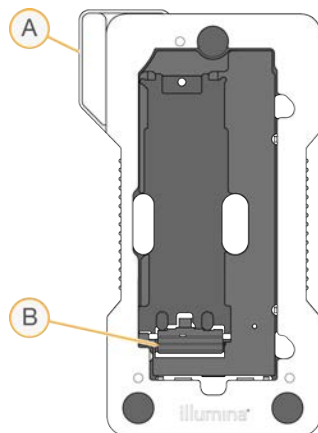
**POZNÁMKA**

Vypnete-li přístroj v průběhu sekvenování, sekvenování se okamžitě ukončí. Ukončení běhu bude konečné. Spotřební materiál běhu už nebude možné použít a data sekvenování z tohoto běhu nebudou uložena.

Přehled opakovaně použitelného adaptéru skenu BeadChip

Opakovaně použitelný adaptér skenu BeadChip drží BeadChip během skenování. BeadChip je bezpečně usazen ve snížené ploše adaptéru pomocí zadržující svorky. Poté se adaptér skenu BeadChip vloží do prostoru v přihrádce pro snímání.

Obrázek 3 Opakovaně použitelný adaptér skenu BeadChip



A Adaptér skenu BeadChip

B Zadržující svorka

Přehled spotřebního materiálu pro sekvenování

Chcete-li v přístroji NextSeq 550Dx provést sekvenovací běh v režimu výzkumu, je potřeba jednorázová sada NextSeq 500/550 Kit nebo NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit. Každá sada obsahuje jednu průtokovou kyvetu a reagentie potřebné k sekvenovacímu běhu.

Z důvodu přesného sledování a kompatibility spotřebního materiálu je na průtokové kyvetě, kazetě reagentií a kazetě s pufrům použit čip radiofrekvenční identifikace (RFID).

**POZNÁMKA**



Před použitím uchovávejte spotřební materiál pro sekvenování v příslušných krabicích.

Pokud v běhu režimu výzkumu používáte sadu NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit, je nutné, aby byly všechny komponenty ze stejné šarže sady. Sadu NextSeq 500/550 Kit nelze použít k běhu diagnostického režimu.

Označení kompatibility sady

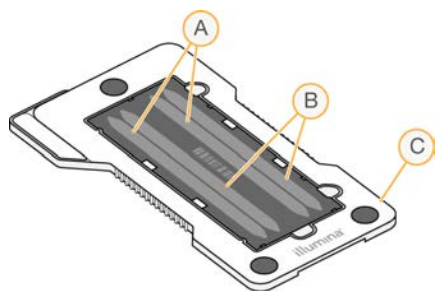
Komponenty sady jsou označeny barevně kódovanými indikátory, které znázorňují kompatibilitu mezi průtokovými kyvetami a kazetami reagentií. Vždy používejte kompatibilní kazetu reagentií a průtokovou kyvetu. Kazeta s pufrům je univerzální.

Každá průtoková kyveta a kazeta reagentií je označena textem **High** nebo **Mid** (vysoký nebo střední výkon). Při přípravě spotřebního materiálu pro běh vždy zkontrolujte označení.

Typ sady	Označení na štítku
Komponenty vysokovýkonné sady	
Komponenty středně výkonné sady	

Základní informace o průtokové kyvetě

Obrázek 4 Kazeta průtokové kyvety



- A Pár cest A – cesty 1 a 3
- B Pár cest B – cesty 2 a 4
- C Rám kazety průtokové kyvety

Průtoková kyveta je skleněný substrát, na kterém se generují klastry a kde probíhá sekvenační reakce. Průtoková kyveta je uložena v kazetě na průtokovou kyvetu.

Průtoková kyveta obsahuje čtyři cesty, které se snímají v párech.

- ▶ Cesty 1 a 3 (pár cest A) jsou snímány najednou.
- ▶ Cesty 2 a 4 (pár cest B) budou snímány až po skončení snímání páru A.

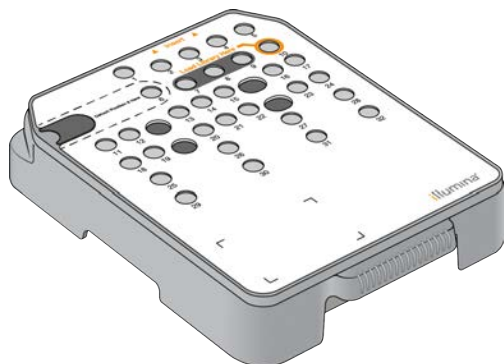
Přestože průtoková kyveta obsahuje čtyři cesty, sekvenuje se na ní pouze jediná knihovna nebo sada knihoven sloučených ve fondu. Knihovny jsou vloženy do kazety s reagensy z jednoho zásobníku a automaticky přeneseny na všechny čtyři cesty průtokové kyvety.

Každá cesta je snímána po malých částech, které se nazývají dlaždice. Další informace naleznete v části [Dlaždice průtokové kyvety na straně 56](#).

Základní informace o kazetě reagensí

Kazeta reagensí je jednorázovým spotřebním materiálem. Je vybavena sledováním pomocí RFID a zásobníky, které jsou uzavřeny těsnicí fólií a předem naplněny klastrovacími a sekvenovacími reagensii.

Obrázek 5 Kazeta reagensí



Kazeta reagensí obsahuje zvláštní zásobník pro vložení připravených knihoven. Po spuštění běhu se knihovny automaticky přenesou ze zásobníku do průtokové kvyety.

Některé zásobníky jsou vyhrazeny pro automatické promytí po běhu. Z kazety s pufrem se pak do těchto vyhrazených zásobníků čerpá mycí roztok, který projde systémem a poté pokračuje do zásobníku na spotřebované reagenzie.

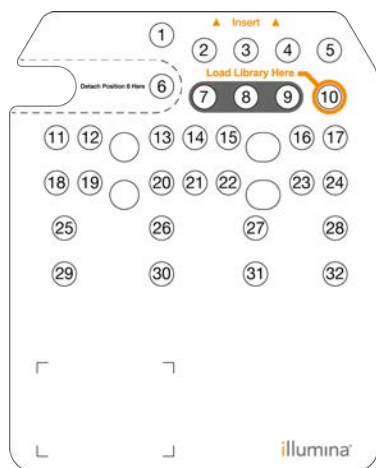


VAROVÁNÍ

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

Vyhrazené zásobníky

Obrázek 6 Číslované zásobníky



Pozice	Popis
7, 8 a 9	Vyhrazeno pro vlastní volitelné primery
10	Vložení knihoven

Další informace o vlastních primerech naleznete v *Příručce pro vlastní primery přístroje NextSeq (dokument č. 15057456)*.

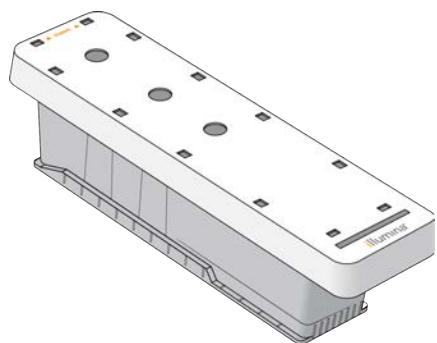
Vyjímatelný zásobník na pozici č. 6

Předem naplněná kazeta zahrnuje denaturační reagencii na pozici 6, která obsahuje formamid. Zásobník na pozici 6 je vyjímatelný, aby bylo možné po sekvenčním běhu snáze zlikvidovat nepoužité reagenty. Bližší informace naleznete v části *Odstranění použitého zásobníku na pozici č. 6 na straně 20*.

Základní informace o kazetě s pufrem

Kazeta s pufrem je jednorázovým spotřebním materiálem. Obsahuje tři zásobníky, které jsou předem naplněny pufrý a mycím roztokem. Obsah kazety s pufrem stačí pro sekvenování jedné průtokové kyvety.

Obrázek 7 Kazeta s pufrem



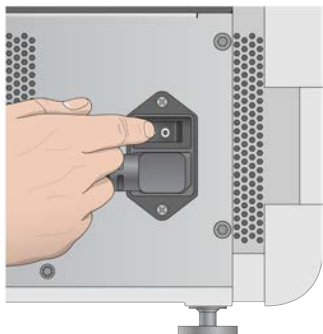
Kapitola 2 Začínáme

Spuštění přístroje	9
Přizpůsobení systémového nastavení	10
Spotřební materiál a vybavení dodávané uživatelem	11

Spuštění přístroje

Vypínač napájení přepněte do polohy I (zapnuto).

Obrázek 8 Vypínač napájení umístěný vzadu na přístroji



- 1 Stiskněte tlačítko napájení nad přihrádkou na reagenecie. Tímto tlačítkem zapnete přístroj a spustíte s ním spojený počítač a software.
Ve výchozím nastavení se přístroj zapíná v diagnostickém režimu.

Obrázek 9 Tlačítko napájení umístěné vpředu na přístroji



- 2 Počkejte, až se načte operační systém.
Provozní software přístroje NextSeq 550Dx (NOS) systém spustí a inicializuje automaticky. Po skončení inicializace se objeví domovská obrazovka.
- 3 Zadejte své uživatelské jméno a heslo do softwaru Local Run Manager.
Další informace o heslech softwaru Local Run Manager naleznete v *Referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 100000009513)*.
- 4 Zvolte možnost **Login** (Přihlášení).
Otevře se domovská obrazovka s ikonami pro sekvenování, program Local Run Manager, úpravy přístroje, a provedení mytí.

- 5 Příkazem Reboot to RUO (Restartovat do režimu RUO) v systému NOS bezpečně vypněte přístroj a restartujte jej v režimu výzkumu.
 - ▶ Vyberte **Manage Instrument** (Upravit přístroj).
 - ▶ Vyberte **Reboot / Shut Down** (Restartovat/vypnout).
 - ▶ Vyberte **Reboot to RUO** (Restartovat do režimu RUO).
- 6 Počkejte, až se načte operační systém.
Software NCS se spustí a inicializuje systém automaticky. Po skončení inicializace se objeví domovská obrazovka.
- 7 Pokud byl váš systém nakonfigurován tak, aby vyžadoval přihlašovací údaje, přihlaste se do systému Windows pomocí uživatelského jména a hesla pro vaše pracoviště.



POZNÁMKA

Pokud si nejste jistí, v jakém režimu se přístroj nachází, projděte si část *Indikátory režimu přístroje*.

Indikátory režimu přístroje

V následující tabulce jsou uvedeny indikátory režimů přístroje na obrazovce softwaru NCS nebo NOS. Informace o tom, jak přepnout z režimu výzkumu do diagnostického režimu, naleznete v části *Možnosti restartu a vypnutí na straně 39*.

Režim	Domovská obrazovka	Barevný ukazatel	Orientace stavové ikony
Diagnostický režim	Přivítání NextSeqDx	Modrá	Horizontální
Režim výzkumu	Přivítání NextSeq	Oranžová	Vertikální

Přizpůsobení systémového nastavení

Řídící software obsahuje přizpůsobitelná systémová nastavení následujících možností.

- ▶ Předvolby vstupu
- ▶ Nastavení zvuku
- ▶ Název přístroje
- ▶ Předvolby nastavení běhu
- ▶ Čištění nepoužitých reagensů

Přizpůsobení avataru a přezdívky přístroje

- 1 Na obrazovce Manage Instrument (Upravit přístroj) vyberte možnost **System Customization** (Přizpůsobení systému).
- 2 Chcete-li ke svému přístroji přiřadit obrázek jako avatar, zvolte možnost **Browse** (Procházet) a vyberte příslušný obrázek.
- 3 Do pole Nickname (Přezdívka) zadejte preferovaný název přístroje.
- 4 Pomocí možnosti **Save** (Uložit) uložte nastavení a ukončete obrazovku.
Obrázek a název budou uvedeny v levém horním rohu každé obrazovky.

Nastavení možnosti klávesnice a zvukového indikátoru

- 1 Na obrazovce Manage Instrument (Upravit přístroj) vyberte možnost **System Customization** (Přizpůsobení systému).

- 2 Zaškrtnutím políčka **Use on-screen keyboard** (Použít klávesnici na obrazovce) použijete jako vstupní zařízení přístroje klávesnici na obrazovce.
- 3 Zaškrtnutím políčka **Play audio** (Přehrávat zvuky) zapnete zvukové indikátory pro následující události:
 - ▶ Při inicializaci přístroje
 - ▶ Při spuštění běhu
 - ▶ Při výskytu určitých chyb
 - ▶ V případě, že je nutný zásah uživatele
 - ▶ Při skončení běhu
- 4 Pomocí možnosti **Save** (Uložit) uložte nastavení a ukončete obrazovku.

Úprava možností nastavení běhu

- 1 Na obrazovce Manage Instrument (Upravit přístroj) vyberte možnost **System Customization** (Přizpůsobení systému).
- 2 Zaškrtnutím políčka **Use Advanced Load Consumables** (Použít pokročilé vložení spotřebního materiálu) povolíte možnost vložení veškerého spotřebního materiálu běhu pomocí jediné obrazovky.
- 3 Pokud zaškrtnete políčko **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Přeskočit potvrzení kontroly před spuštěním běhu), sekvenování nebo skenování se automaticky spustí, jakmile úspěšně proběhne automatická kontrola.
- 4 Pomocí možnosti **Save** (Uložit) uložte nastavení a ukončete obrazovku.

Nastavení možnosti automatického čištění

- 1 Na obrazovce Manage Instrument (Upravit přístroj) vyberte možnost **System Customization** (Přizpůsobení systému).
- 2 Chcete-li po každém běhu automaticky vyčistit nepoužité reagenty z kazety reagentů a přemístit je do zásobníku na spotřebované reagenty, zaškrtněte políčko **Purge Consumables at End of Run** (Vyčistit na konci běhu spotřební materiál).



POZNÁMKA

Čištění spotřebního materiálu automaticky přidá další čas do pracovního postupu.

- 3 Pomocí možnosti **Save** (Uložit) uložte nastavení a ukončete obrazovku.

Spotřební materiál a vybavení dodávané uživatelem

Při přípravě spotřebního materiálu, sekvenování a údržbě systému se používá následující spotřební materiál a vybavení.

Uživatelé dodávající spotřební materiál pro sekvenování

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
1 N NaOH (hydroxid sodný)	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Denaturace knihovny, zředěno na 0,2 N
200 mM Tris-HCl, pH7	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Denaturace knihovny
Čisticí ubrousky se 70% isopropyl alkoholem nebo Ethanol, 70 %	VWR, kat. č. 95041-714 (nebo ekvivalentní) Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Čištění průtokové kyvety a obecné použití
Laboratorní utěrky, netkané	VWR, kat. č. 21905-026 (nebo ekvivalentní)	Čištění průtokové kyvety a obecné použití

Spotřební materiál dodaný uživatelem pro účely údržby přístroje

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
NaOCl, 5 % (chlornan sodný)	Sigma-Aldrich, kat. č. 239305 (nebo ekvivalent laboratorní jakosti)	Ruční mytí přístroje po skončení běhu; mycí přípravek zředěný na 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, kat. č. P7949	Ruční mytí přístroje; mycí přípravek zředěný na 0,05 %
Voda, laboratorní jakost	Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Mytí přístroje (ruční mytí)
Vzduchový filtr	Illumina, katalogové číslo 20022240	Čištění vzduchu nasávaného přístrojem pro účely chlazení

Pokyny pro vodu laboratorní jakosti

Při provádění postupů na přístroji vždy používejte pouze vodu laboratorní jakosti nebo deionizovanou vodu. Nikdy nepoužívejte kohoutkovou vodu. Používejte pouze vodu následující nebo rovnocenné jakosti:

- ▶ Deionizovaná voda
- ▶ Illumina PW1
- ▶ Voda 18 Megaohmů (MΩ)
- ▶ Voda Milli-Q
- ▶ Voda Super-Q
- ▶ Voda pro molekulární biologii

Vybavení dodávané uživatelem

Položka	Zdroj
Mraznička, -25 °C až -15 °C, bez námrazy	Dodavatel běžného laboratorního vybavení
Chladnička, 2 až 8 °C	Dodavatel běžného laboratorního vybavení

Kapitola 3 Sekvenování

Úvod	13
Pracovní postup sekvenování	14
Příprava kazety reagensů	14
Příprava průtokové kyvety	15
Příprava knihoven na sekvenování	15
Nastavení sekvenačního běhu	16
Sledování postupu běhu	23
Automatické omytí po běhu	24

Úvod

Chcete-li v přístroji NextSeq 550Dx provést sekvenační běh, připravte kazetu reagensů, průtokovou kyvetu a postupujte podle požadavků softwaru na nastavení a zahájení. Vytváření klastru a sekvenování probíhají v přístroji. Po skončení běhu se přístroj začne automaticky promývat pomocí komponent, které jsou do něj již vloženy.

Generování klastrů

Během generování klastrů se jednotlivé molekuly DNA vážou k povrchu průtokové kyvety a amplifikují se, až vytvoří klastry.

Sekvenování

Klastry jsou snímány pomocí chemie s dvoukanálovým sekvenováním a kombinacemi filtrování specifickými pro každý z fluorescenčně označených nukleotidů. Jakmile je dokončeno snímání dlaždice průtokové kyvety, začne snímání dlaždice následující. Tento proces se opakuje pro každý cyklus sekvenování. Po analýze obrazu software provede přiřazení báze, filtrování a vyhodnocení kvality.

Sledujte postup běhu a statistiky prostřednictvím rozhraní řídicího softwaru, karty Run (Běh) v systému BaseSpace nebo počítače v síti se softwarem Sequencing Analysis Viewer (SAV). Další informace naleznete v části *Sequencing Analysis Viewer* na straně 24.

Analýza

Při postupu běhu řídicí software automaticky přemísťuje soubory přiřazení báze (BCL) do systému BaseSpace nebo zadaného výstupního umístění pro sekundární analýzu.

K dispozici je několik metod analýzy v závislosti na vaší aplikaci. Další informace naleznete v *návodě systému BaseSpace* (help.basespace.illumina.com).

Trvání sekvenačního běhu

Trvání sekvenačního běhu závisí na počtu provedených cyklů. Maximální délka běhu je běh s párovými konci o 150 cyklech, které se čtou jednotlivě (2 × 150) plus pro každý z nich 8 cyklů na 2 čtení indexu.

Počet cyklů ve čtení

Při čtení sekvenačního běhu se provádí vždy o jeden cyklus více, než je počet analyzovaných cyklů. Například v záznamu běhu s párovými konci o 150 cyklech proběhne čtení 151 cyklů (2 × 151), takže celkem 302 cyklů. Na konci běhu bude analyzováno 2 × 150 cyklů. Cyklus navíc je zapotřebí pro výpočty fázování a předfázování.

Pracovní postup sekvenování



U konfigurací, které používají systém Illumina BaseSpace nebo BaseSpace Onsite: Nastavte běh na kartě Prep (Příprava) systému BaseSpace. Navštivte *nápovědu systému BaseSpace* (help.basespace.illumina.com).



Připravte novou kazetu reagensí: rozmrazte ji a zkontrolujte.
Připravte novou průtokovou kyvetu: přeneste ji do pokojové teploty, rozbalte a zkontrolujte.



Denaturujte a zředte knihovny (neplatí pro všechny typy knihoven). Přečtěte si dokument *Denaturace a ředění knihoven pro systém NextSeq* (dokument č. 15048776).



Do kazety reagensí č. 10 vložte ředění knihovny.



Výběrem možnosti **Sequence** (Sekvenovat) v rozhraní softwaru zahajte postup nastavení běhu.



Vložte průtokovou kyvetu.



Vyprázdněte zásobník na spotřebované reagensie a znovu jej vložte.
Vložte kazetu s pufrům a kazetu reagensí.



Zkontrolujte parametry běhu a výsledky automatické kontroly. Zvolte možnost **Start** (Spustit).



Sledujte běh prostřednictvím rozhraní řídicího softwaru, karty Run (Běh) v systému BaseSpace nebo počítače v síti s aplikací Sequencing Analysis Viewer.



Mytí přístroje začne automaticky po dokončení sekvenování.

Příprava kazety reagensí

Chcete-li zdárně provést sekvenování, pozorně se řiďte pokyny pro nakládání s kazetou reagensí.

- 1 Ze skladovacích prostor s teplotou od -25 °C do -15 °C vyjměte kazetu reagensí.
- 2 Některou z následujících metod reagensie rozmrazte. Kazetu neponožte. Po rozmrazení kazetu vysušte a teprve potom pokračujte na další krok.

Teplota	Doba rozmrazování	Limit stability
Vodní lázeň (15 °C až 30 °C)	60 minut	Nesmí přesáhnout 6 hodin
2 °C až 8 °C	7 hodin	Nesmí přesáhnout 5 dnů.



POZNÁMKA

Pokud se ve stejné vodní lázni rozmrazuje více než jedna kazeta, povolte delší dobu rozmrazování.

- 3 Pětkrát kazetu obraťte nahoru a dolů, aby se reagentie promíchaly.
- 4 Zkontrolujte dno kazety, zda se reagentie řádně rozmrazily a neobsahují žádné sraženiny. Zaměřte se zvláště na pozice 29, 30, 31 a 32, neboť jsou největší a jejich rozmrazení potrvá nejdéle.
- 5 Opatrně kazetou poklepejte o pracovní stůl, abyste snížili počet vzduchových bublinek. Nejlepších výsledků dosáhnete, přikročíte-li pak přímo k vložení vzorku a nastavení běhu.



VAROVÁNÍ

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

Příprava průtokové kyvety

- 1 Ze skladových prostor s teplotou 2–8 °C vyjměte balíček s novou průtokovou kyvetou.
- 2 Ponechte nerozbalený balíček průtokové kyvety při pokojové teplotě po dobu 30 minut.



POZNÁMKA

Není-li poškozena obalová fólie, vydrží průtoková kyveta v pokojové teplotě až 12 hodin. Průtokovou kyvetu opakovaně nechláďte ani neohřívejte.

Příprava knihoven na sekvenování

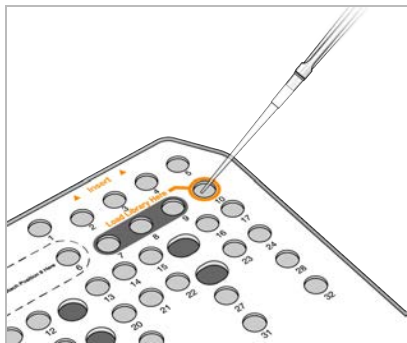
Denaturace a zředění knihoven

Denaturujte a zřed'te knihovny na objem pro vložení 1,3 ml a koncentraci pro vložení 1,8 pM. V praxi může být koncentrace pro vložení různá podle přípravy knihovny a kvantifikačních metod. Pokyny naleznete v *Příručce pro denaturované a zředěné knihovny systému NextSeq (dokument č. 15048776)*.

Vložení knihoven do kazety reagentů

- 1 Utěrkou, která nepouští vlákna, odstraňte těsnicí fólii zakrývající zásobník č. 10 označený jako **Load Library Here** (Sem vložte knihovnu).
- 2 Těsnění propíchněte špičkou čisté 1ml pipety.
- 3 Vložte 1,3 ml připravených 1,8 pM knihoven do zásobníku č. 10 označeného jako **Load Library Here** (Sem vložte knihovnu). Při rozptylování knihoven se nedotýkejte těsnicí fólie.

Obrázek 10 Vložení knihoven



Nastavení sekvenčního běhu

- 1 Na domovské obrazovce vyberte možnost **Experiment** a poté možnost **Sequence** (Sekvenovat). Příkaz Sequence (Sekvenovat) otevře dvířka přihrádky pro snímání, uvolní spotřební materiál z předchozího běhu a otevře sérii obrazovek k nastavení běhu. Je běžné, že se tak stane s krátkým zpožděním.

Pokud je přístroj nakonfigurován pro systém BaseSpace, budete vyzváni k přihlášení do systému BaseSpace. Pokud je přístroj nakonfigurován pro samostatný režim, bude dalším krokem vložení průtokové kyvety.

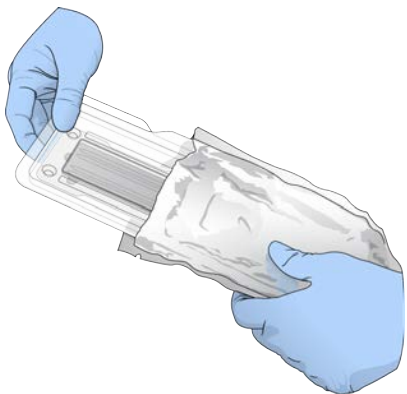
Přihlášení do systému BaseSpace

- 1 Zadejte své uživatelské jméno a heslo v systému BaseSpace.
- 2 Vyberte možnost **Next** (Další).

Vložení průtokové kyvety

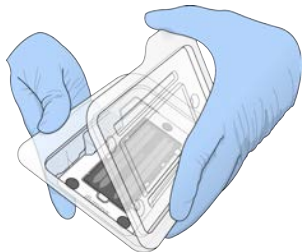
- 1 Odstraňte průtokovou kyvetu z předchozího běhu.
- 2 Z obalové fólie vyjměte průtokovou kyvetu.

Obrázek 11 Odstraňte obalovou fólii



- 3 Otevřete průhledné obalové pouzdro z umělé hmoty a vyjměte průtokovou kyvetu.

Obrázek 12 Odstraňte obalové pouzdro



- 4 Ubrouskem, který nepouští vlákna a je napuštěn alkoholem, vyčistěte skleněný povrch průtokové kyvety. Sklo osušte laboratorní utěrkou nepouštějící vlákna.

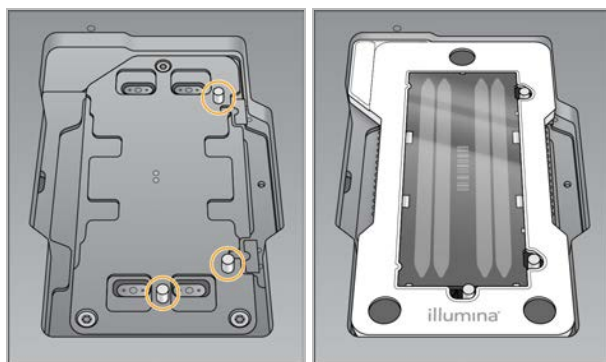


POZNÁMKA

Zkontrolujte, zda je skleněný povrch průtokové kyvety opravdu čistý. V případě potřeby čištění opakujte.

- 5 Zarovnejte průtokovou kyvetu podle zarovnávacích pinů a umístěte ji do snímacího prostoru.

Obrázek 13 Vložení průtokové kyvety



- 6 Zvolte možnost **Load** (Vložit).
Dvířka se automaticky zavřou, na obrazovce se zobrazí ID průtokové kyvety a proběhne kontrola senzorů.



POZNÁMKA

Při zavírání držte ruce dál od dvířek průtokové kyvety, abyste se nepřiskřípli.

- 7 Vyberte možnost **Next** (Další).

Vyprázdnění zásobníku na spotřebované reagentie

- 1 Pomocí západky v levém dolním rohu dvířek otevřete přihrádku na pufr.
- 2 Vyjměte zásobník na spotřebované reagentie a obsah zlikvidujte podle zavedených předpisů.

Obrázek 14 Vyjmutí zásobníku na spotřebované reagentie



POZNÁMKA

Při vyjímání zásobník přidržíte i zespodu druhou rukou.

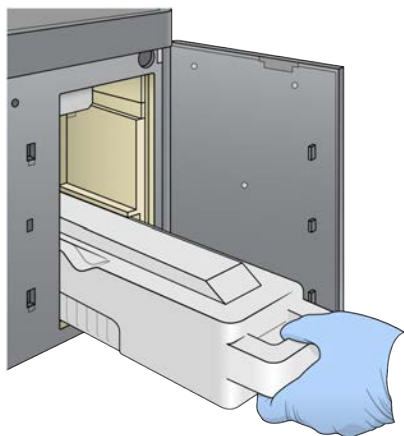


VAROVÁNÍ

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

- 3 Prázdný zásobník na spotřebované reagentie zasuňte nadoraz do přihrádky na pufr. Až bude zásobník na správném místě, uslyšíte cvaknutí.

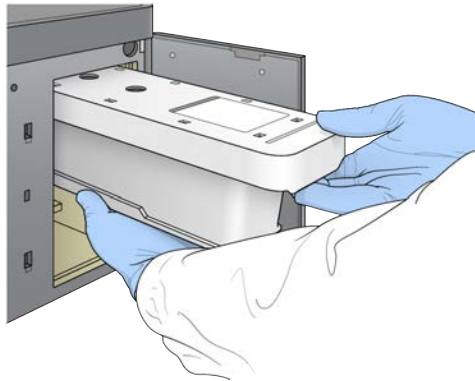
Obrázek 15 Vložení zásobníku na spotřebované reagentie



Vložení kazety s pufrem

- 1 Z horní přihrádky odstraňte použitou kazetu s pufrem.
K nadzdvíhnutí a vysunutí kazety s pufrem je třeba použít trochu síly.
- 2 Novou kazetu s pufrem zasuňte nadoraz do přihrádky na pufr.
Až bude kazeta na správném místě, uslyšíte cvaknutí, na obrazovce se objeví ID kazety s pufrem a proběhne kontrola senzoru.

Obrázek 16 Vložení kazety s pufrem



- 3 Zavřete dvířka přihrádky na pufr a zvolte možnost **Next** (Další).

Vložení kazety reagensů

- 1 Pomocí západky v pravém dolním rohu dvířek otevřete přihrádku na reagenzie.
- 2 Z přihrádky na reagenzie vyjměte kazetu s použitými reagenziemi. Nepoužitý obsah zlikvidujte v souladu s platnými místními normami.



VAROVÁNÍ

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

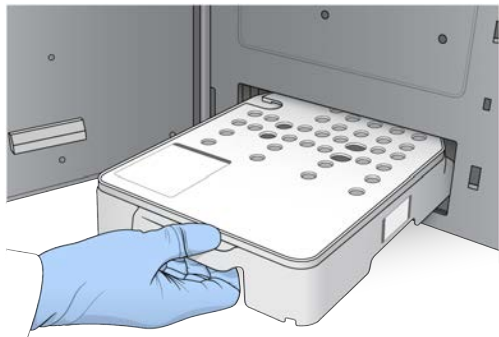


POZNÁMKA

Zásobník na pozici 6 je vyjímatelný, aby bylo možné snáze zlikvidovat nepoužité reagenzie. Bližší informace naleznete v části *Odstranění použitého zásobníku na pozici č. 6* na straně 20.

- 3 Kazetu reagensů zasuňte nadoraz do přihrádky na reagenzie a zavřete dvířka.

Obrázek 17 Vložení zásobníku reagensí

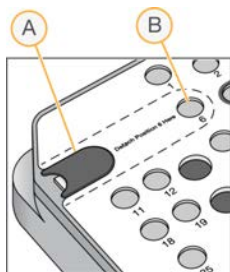


- 4 Zvolte možnost **Load** (Vložit).
Software kazetu automaticky nastaví do správné pozice (zhruba 30 s), na obrazovce se objeví ID kazety a proběhne kontrola senzorů.
- 5 Vyberte možnost **Next** (Další).

Odstranění použitého zásobníku na pozici č. 6

- 1 Jakmile z přístroje vyjmete kazetu s *použitou* reagensí, odstraňte ochranný gumový kryt slotu vedle pozice č. 6.

Obrázek 18 Vyjímatelná pozice č. 6



- A Ochranný gumový kryt
- B Pozice č. 6

- 2 Stiskněte průhlednou plastovou tabulku a tlačte ji směrem doleva. Tím vysunete zásobník.
- 3 Zásobník zlikvidujte v souladu s platnými místními normami.

Nastavení parametrů běhu

Kroky na obrazovce Run Setup (Nastavení běhu) se liší na základě konfigurace systému:

- ▶ **BaseSpace nebo BaseSpace Onsite** – Na obrazovce Run Setup (Nastavení běhu) jsou uvedeny běhy, které byly nastaveny pomocí karty Prep (Příprava) systému BaseSpace. Pokud se na obrazovce Run Setup (Nastavení běhu) nezobrazuje požadovaný běh, ujistěte se, zda je daný běh označen k sekvenování v systému BaseSpace.
- ▶ **Samostatný režim** – Na obrazovce Run Setup (Nastavení běhu) se nachází pole k definování parametrů běhu.

Výběr dostupného běhu (konfigurace BaseSpace)

- 1 Vyberte název běhu v seznamu dostupných běhů.
Procházejte v seznamu pomocí šipek nahoru a dolů nebo zadejte název běhu do pole Search (Vyhledávání).
- 2 Vyberte možnost **Next** (Další).
- 3 Potvrďte parametry běhu.
 - ▶ **Run Name** (Název běhu) – Název běhu přiřazený v systému BaseSpace.
 - ▶ **Library ID** (ID knihovny) – Název sloučených knihoven ve fondu, který je přiřazený v systému BaseSpace.
 - ▶ **Recipe** (Návod) – Název návodu, buď **NextSeq High**, nebo **NextSeq Mid** v závislosti na kazetě reagensů použité pro běh.
 - ▶ **Read Type** (Typ čtení) – Single Read (Jedno čtení) nebo Paired End (Párové-koncové).
 - ▶ **Read Length** (Délka čtení) – Počet cyklů pro každé čtení.
 - ▶ **[Volitelné]** Custom Primers (Vlastní primery), pokud je to relevantní.
- 4 **[Volitelné]** Chcete-li změnit parametry běhu, klikněte na tlačítko **Edit** (Upravit). Po skončení zvolte možnost **Save** (Uložit).
 - ▶ **Run parameters** (Parametry běhu) – Změňte počet čtení nebo počet cyklů na čtení.
 - ▶ **Custom primers** (Vlastní primery) – Změňte nastavení vlastních primerů. Další informace naleznete v *Příručce pro vlastní primery přístroje NextSeq (dokument č. 15057456)*.
 - ▶ **Purge consumables for this run** (Vyčistit spotřební materiál pro tento běh) – Toto nastavení změňte, chcete-li po aktuálním běhu automaticky vyčistit spotřební materiál.
- 5 Vyberte možnost **Next** (Další).

Zadání parametrů běhu (samostatná konfigurace)

- 1 Zadejte vámi zvolený název běhu.
- 2 **[Volitelné]** Zadejte vámi zvolené ID knihovny.
- 3 Vyberte typ čtení, buď možnost **Single Read** (Jedno čtení), nebo **Paired End** (Párové-koncové).
- 4 Zadejte počet cyklů pro každé čtení v sekvenčním běhu.
 - ▶ **Read 1** (Čtení 1) – Zadejte hodnotu do 151 cyklů.
 - ▶ **Index 1** – Zadejte počet cyklů potřebných pro primer Index 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** – Zadejte počet cyklů potřebných pro primer Index 2 (i5).
 - ▶ **Read 2** (Čtení 2) – Zadejte hodnotu do 151 cyklů. Tato hodnota je obvykle stejná jako počet cyklů pro čtení 1.

Řídící software prověří vaše záznamy pomocí následujících kritérií:

 - ▶ Celkový počet cyklů nesmí překročit maximální povolený počet cyklů.
 - ▶ Počet cyklů pro čtení 1 je vyšší než 5 cyklů použitých k vytvoření šablony.
 - ▶ Počet cyklů čtení indexu nepřekračuje počet cyklů čtení 1 a čtení 2.
- 5 **[Volitelné]** Pokud používáte vlastní primery, zaškrtněte políčka u použitých primerů. Další informace naleznete v *Příručce pro vlastní primery přístroje NextSeq (dokument č. 15057456)*.
 - ▶ **Čtení 1** – vlastní primer pro čtení 1.
 - ▶ **Index 1** – vlastní primer pro index 1.
 - ▶ **Index 2** – vlastní primer pro index 2.
 - ▶ **Čtení 2** – vlastní primer pro čtení 2.

6 **[Volitelné]** Chcete-li změnit parametry běhu, klikněte na tlačítko **Advanced Settings** (Pokročilá nastavení)



- ▶ V rozevřacím seznamu Recipe (Návod) vyberte návod. Uvedeny jsou pouze kompatibilní návody.
- ▶ **Output folder location** (Umístění výstupní složky) – Změňte umístění výstupní složky pro aktuální běh. Vyberte možnost **Browse** (Procházet) a přejděte do síťového umístění.
- ▶ **Included file** (Zahrnutý soubor) – Vyberte soubory, které chcete zahrnout do výstupní složky, protože by mohly být užitečné v případě potřeby další analýzy. Jsou to například soubory manifestů a seznamy vzorků.
- ▶ **Purge consumables for this run** (Vyčistit spotřební materiál pro tento běh) – Toto nastavení změňte, chcete-li po aktuálním běhu automaticky vyčistit spotřební materiál.
- ▶ **Use run monitoring for this run** (Použít pro tento běh sledování běhu) – Toto nastavení změňte, chcete-li použít sledování běhu v systému BaseSpace.

7 Vyberte možnost **Next** (Další).

Kontrola před spuštěním běhu

Před spuštěním běhu provede software automatickou kontrolu systému. Během této kontroly se na obrazovce objeví následující ukazatele:

- ▶ **Šedé zaškrtnutí** – Kontrola ještě nebyla provedena.
- ▶ **Ikona probíhajícího procesu** – Kontrola právě probíhá.
- ▶ **Zelené zaškrtnutí** – Prošlo kontrolou.
- ▶ **Červený křížek** – Neprošlo kontrolou. V případě, že některé položky neprošly kontrolou, je třeba zásahu uživatele. Bližší informace naleznete v části *Odstranění chyb automatické kontroly na straně 41*.

Chcete-li zastavit probíhající automatickou kontrolu, klikněte na tlačítko **Cancel** (Zrušit). Chcete-li kontrolu znovu spustit, zvolte tlačítko **Retry** (Zkusit znovu). Kontrola bude automaticky pokračovat od místa, kde nebyla kompletní nebo nebyla úspěšná.

Chcete-li si prohlédnout výsledky jednotlivých kontrol v rámci kategorie, vyberte kartu kategorie.

Spuštění běhu

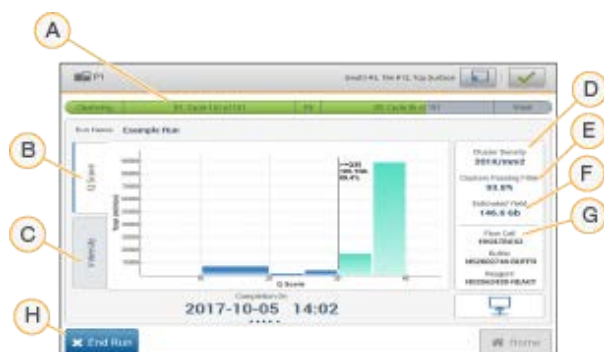
Až proběhne automatická kontrola před spuštěním běhu, zvolte možnost **Start** (Spustit). Spustí se sekvenční běh.

Bližší informace o konfiguraci systému a automatickém spuštění běhu po úspěšné kontrole naleznete v části *Úprava možností nastavení běhu na straně 11*.

Sledování postupu běhu

- 1 Sledování postupu běhu, intenzit a skóre kvality se na obrazovce zobrazuje v podobě metrik.

Obrázek 19 Postup a metrika sekvenačního běhu



- A **Postup běhu** – Zobrazuje aktuální krok a počet dokončených cyklů pro každé čtení. Proužek postupu neodpovídá rychlosti běhu každého kroku. Dole se zobrazuje datum a čas očekávaného dokončení běhu.
- B **Skóre kvality** – Zobrazuje distribuci skóre kvality (Q-score). Další informace naleznete v části [Vyhodnocování kvality na straně 54](#).
- C **Intenzita** – Zobrazuje hodnotu klastrů intenzity 90. percentily pro každou dlaždici. V grafu jsou jednotlivé báze barevně označeny: A červeně, C zeleně, G modře a T černě.
- D **Hustota klastru (K/mm²)** – Zobrazuje počet klastrů, které byly při běhu zjištěny.
- E **Klastry procházející filtrem (%)** – Zobrazuje procento klastrů, které procházejí filtrem. Další informace naleznete v části [Klastry procházející filtrem na straně 54](#).
- F **Očekávaná výtěžnost (Gb)** – Zobrazuje počet bází předpokládaných na běh.
- G **Informace o šarži** – Ukazuje čísla šarží spotřebního materiálu pro sekvenování. U průtokové kyvety se zobrazuje sériové číslo.
- H **Ukončení běhu** – Zastaví probíhající sekvenační běh. Spotřební materiál nelze znovu použít.



POZNÁMKA













Jakmile použijete volbu Home (Domů), nebudete se už moci vrátit ke zobrazení metrik běhu. Metriky běhu jsou však dostupné v systému BaseSpace nebo je lze zobrazit v samostatném počítači pomocí aplikace Sequencing Analysis Viewer (SAV).

Cykly pro metriky běhu

Spuštění metrik se zobrazuje v různých částech běhu.

- ▶ V průběhu generování klastru se žádné metriky neobjevují.
- ▶ Prvních pět cyklů je vyhrazeno pro vytváření šablony.
- ▶ Spuštění metrik se zobrazí po cyklu 25 a zahrnuje hustotu klastru, klastry procházející filtrem, výtěžnost a skóre kvality.

Přenos dat

Stav	Illumina BaseSpace	BaseSpace Onsite	Samostatný přístroj
Připojeno			
Připojeno a probíhá přenos dat			
Odpojeno			
Zakázáno			

V závislosti na vybrané konfiguraci analýzy se na obrazovce během běhu zobrazí ikona indikující stav přenosu dat.

Je-li v průběhu běhu přerušen přenos dat, data se dočasně uloží do počítače přístroje. Jakmile bude připojení obnoveno, přenos dat bude automaticky pokračovat. Pokud se do skončení běhu připojení neobnoví, je před zahájením dalšího běhu nutné ručně odstranit data z počítače přístroje.

Run Copy Service

Softwarová sada systému NextSeq 550Dx obsahuje službu Run Copy Service. RTA v2 tuto službu vyžaduje při kopírování souborů ze zdrojového do cílového umístění a tato služba zpracovává i požadavky na kopie podle toho, v jakém pořadí je obdržela. Dojde-li k výjimce, soubor bude znovu zařazen do fronty kopírování podle počtu souborů v této frontě.

Sequencing Analysis Viewer

Software Sequencing Analysis Viewer zobrazuje metriky sekvenování vytvořené během běhu. Metriky se zobrazují ve formě diagramů, grafů a tabulek založených na datech vytvořených softwarem RTA a zapsaných do souborů InterOp. Metriky jsou v průběhu běhu aktualizovány. Výběrem možnosti **Refresh** (Aktualizovat) kdykoli během běhu zobrazíte aktualizované metriky. Další informace naleznete v *Uživatelské příručce softwaru Sequencing Analysis Viewer (část č. 15020619)*.

Software Sequencing Analysis Viewer je součástí softwaru instalovaného v počítači přístroje. Software Sequencing Analysis Viewer můžete také nainstalovat do jiného počítače připojeného ke stejné síti jako přístroj a sledovat metriky běhu vzdáleně.

Automatické omytí po běhu

Po dokončení sekvenčního běhu zahájí software automatické omytí po běhu, a to pomocí mycího roztoku, který se nachází v kazetě s pufrem, a NaOCl, který se nachází v kazetě reagentů. Pokud je pro běh povolena možnost čištění spotřebního materiálu, dojde k čištění před automatickým omytím po běhu.

Automatické omytí po oběhu trvá zhruba 90 minut. Po skončení omytí se stane aktivním tlačítko Home (Domů). Během omývání zůstanou na obrazovce výsledky sekvenování.

Po omytí

Po omytí zůstávají nasávací trubičky otočeny směrem dolů, aby do systému nemohl proniknout vzduch. Ponechte kazety na místě až do dalšího běhu.

Skenování

Úvod	26
Pracovní postup skenování	27
Stažení složky DMAP	27
Vložení BeadChipu do adaptéru	28
Nastavení skenu	29
Sledování postupu skenu	31

Úvod

K provedení skenu na přístroji NextSeq 550Dx potřebujete následující komponenty běhu:

- ▶ Hybridizovaný a poskvrněný BeadChip
- ▶ Opakovaně použitelný adaptér skenu BeadChip
- ▶ Soubory DMAP (dekódovací mapy) pro použitý BeadChip
- ▶ Soubor manifestu pro použitý typ BeadChipu
- ▶ Soubor klastru pro použitý typ BeadChipu

Výstupní soubory jsou vytvořeny během skenu a poté zařazeny do fronty k přenosu do zadané výstupní složky.

Proveďte analýzu pomocí softwaru BlueFuse Multi, který vyžaduje, aby byla data skenování k dispozici ve formátu souboru přiřazení genotypů (GTC). Přístroj NextSeq 550Dx ve výchozím nastavení vytváří normalizovaná data a související přiřazení genotypů ve formátu souboru GTC. Volitelně můžete přístroj nakonfigurovat, aby navíc vytvářel soubory dat intenzity (IDAT). Další informace naleznete v části *Konfigurace skenu BeadChip na straně 50*.

Decode File Client

Složka DMAP obsahuje informace, které identifikují umístění částic na BeadChipu a kvantifikují signál asociovaný s každou částicí. Složka DMAP je pro každý čárový kód BeadChipu jedinečná.

Nástroj Decode File Client umožňuje stáhnout složky DMAP přímo ze serverů společnosti Illumina pomocí standardního protokolu HTTP.

Nástroj Decode File Client naleznete na [stránce podpory nástroje Decode File Client](https://support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html) na webu společnosti Illumina (support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html). Nainstalujte nástroj Decode File Client do počítače s přístupem k síťovému umístění složky DMAP.

Další informace naleznete v části *Stažení složky DMAP na straně 27*.

Soubory manifestů a soubory klastrů

U každého BeadChipu software vyžaduje přístup k souboru manifestu a souboru klastru. Soubor manifestu a klastru je pro každý typ BeadChipu jedinečný. Ujistěte se, že používáte soubory klastrů, které mají v názvu text NS550. Tyto soubory jsou kompatibilní se systémem NextSeq 550Dx.

- ▶ **Soubor manifestu** – Soubory manifestů popisují obsah sondy nebo SNP na BeadChipu. Soubory manifestů používají formát *.bpm.
- ▶ **Soubory klastrů** – Soubory klastrů popisují pozice klastrů pro čipy genotypů Illumina a používají se při analýze dat za účelem přiřazení genotypů. Soubory klastrů používají formát *.egt.

Umístění souborů se zadává na obrazovce BeadChip Scan Configuration (Konfigurace skenu BeadChip). Na domovské obrazovce softwaru NCS vyberte možnost **Manage Instrument** (Upravit přístroj), **System Configuration** (Konfigurace systému) a nakonec **BeadChip Scan Configuration** (Konfigurace skenu BeadChip). Při instalaci přístroje NextSeq 550Dx zástupce společnosti Illumina tyto soubory stáhne a zadá cestu k nim v řídicím softwaru. Tyto soubory není potřeba měnit s výjimkou případu ztráty nebo dostupnosti nové verze. Další informace naleznete v části *Nahrazení souborů manifestů a souborů klastrů na straně 47*.

Pracovní postup skenování

DMAP

Stáhněte si informace DMAP a uložte je do zadaného umístění složky DMAP.



Vložte BeadChip do adaptéru skenu BeadChip.



Vložte adaptér skenu BeadChip do přístroje.



Zadejte parametry skenu: umístění složky DMAP a výstupní umístění.



Zkontrolujte výsledky automatické kontroly.
Zvolte možnost **Start** (Spustit).



Sledujte skenování prostřednictvím rozhraní řídicího softwaru.

Stažení složky DMAP

Ke složce DMAP se dostanete prostřednictvím nástroje Decode File Client s použitím účtu nebo BeadChipu (výchozí zobrazení).

Přístup ke složce DMAP – účet

- 1 Na hlavní kartě nástroje Decode File Client vyberte možnost stažení:
 - ▶ AutoPilot
 - ▶ All BeadChips not yet downloaded (Všechny ještě nestažené BeadChipy)
 - ▶ All BeadChips (Všechny BeadChipy)
 - ▶ BeadChips by Purchase Order (BeadChipy podle nákupní objednávky)
 - ▶ BeadChips by barcode (BeadChipy podle čárového kódu)
- 2 Zadejte požadované informace.
- 3 Vyhledejte složku DMAP, kterou chcete stáhnout.
- 4 Ujistěte se, že máte v cílovém umístění stahovaných souborů dostatek volného místa.

- 5 Spustíte stahování. Stav stahování uvidíte na kartě Download Status (Stav stahování) a Log (Protokol).
- 6 Uložte složku DMAP do zadaného umístění složky DMAP.

Přístup ke složce DMAP – BeadChip

- 1 Identifikujte BeadChipy pomocí 2 z následujících možností:
 - ▶ Čárový kód BeadChipu
 - ▶ ID krabice BeadChipu
 - ▶ Číslo nákupní objednávky
 - ▶ Číslo prodejní objednávky
- 2 Vyhledejte složku DMAP, kterou chcete stáhnout.
- 3 Ujistěte se, že máte v cílovém umístění stahovaných souborů dostatek volného místa.
- 4 Spustíte stahování. Stav stahování uvidíte na kartě Download Status (Stav stahování) a Log (Protokol).
- 5 Uložte složku DMAP do zadaného umístění složky DMAP.

Vložení BeadChipu do adaptéru

- 1 Stiskněte svorku zadržující adaptér. Svorka se lehce nakloní zpět a otevře.
- 2 Uchopte BeadChip za hrany tak, aby byl jeho čárový kód poblíž zadržující svorky. Pak BeadChip umístěte na sníženou plochu adaptéru.

Obrázek 20 Vložení BeadChipu do adaptéru



- 3 Pomocí otvorů na jednotlivých stranách BeadChipu zajistěte, aby byl usazen ve snížené ploše adaptéru.

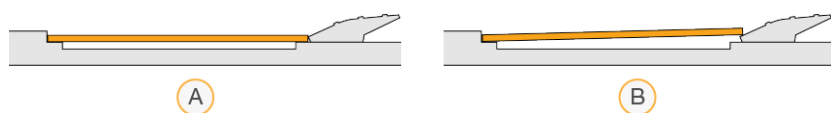
Obrázek 21 Usazení a zabezpečení BeadChipu



- 4 Jemným uvolněním zadržující svorky BeadChip zabezpečte.

- Zkontrolujte BeadChip z bočního pohledu, abyste se ujistili, že je v adaptéru usazen rovně. V případě potřeby upravte pozici BeadChipu.

Obrázek 22 Kontrola pozice BeadChipu



- A Správná pozice – BeadChip leží po uvolnění svorky na adaptéru rovně.
 B Nesprávná pozice – BeadChip neleží po uvolnění svorky rovně.

Nastavení skenu

- Na domovské obrazovce vyberte možnost **Experiment** a poté možnost **Scan** (Skenovat). Příkaz Scan (Skenovat) otevře dvířka přihrádky pro snímání, uvolní spotřební materiál z předchozího běhu (pokud existuje) a otevře sérii obrazovek k nastavení skenu. Je běžné, že se tak stane s krátkým zpožděním.

Vyjmutí spotřebního materiálu pro sekvenování

Pokud je při nastavování skenu přítomen spotřební materiál pro sekvenování, vyzve vás software před pokračováním k dalšímu kroku k vyjmutí kazety reagensů a kazety pufru.

- Pokud budete vyzváni, odeberte použitý spotřební materiál pro sekvenování z předchozího sekvenačního běhu.
 - Z přihrádky na reagenzie vyjměte kazetu s reagenziemi. Nepoužitý obsah zlikvidujte v souladu s platnými místními normami.
 - Z přihrádky na pufr odstraňte použitou kazetu s pufrem.



VAROVÁNÍ

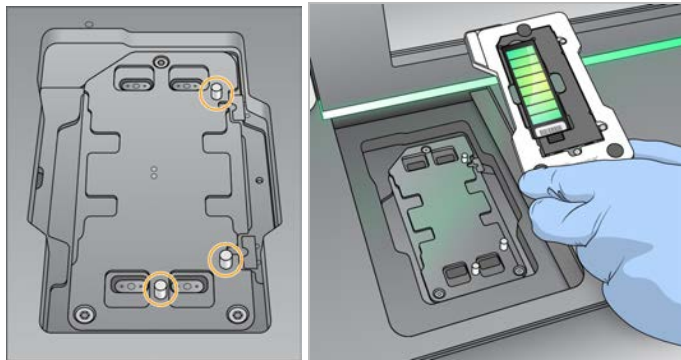
Tato sada reagensů obsahuje potenciálně nebezpečné chemické látky. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagenziemi nakládejte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

- Vyjměte průtokovou kyvetu z přihrádky pro snímání.
- Zavřete dvířka přihrádky na reagenzie a přihrádky na pufr.

Vložení adaptéru skenu BeadChip

- 1 Zarovnejte adaptér skenu BeadChip v prostoru pomocí zarovnávacích pinů.

Obrázek 23 Vložení adaptéru skenu BeadChip



- 2 Zvolte možnost **Load** (Vložit).
Dvířka se automaticky zavřou, na obrazovce se zobrazí ID BeadChipu a proběhne kontrola senzorů. Je běžné, že se tak stane s krátkým zpožděním. Pokud čárový kód BeadChipu nelze přečíst, zobrazí se dialog, který vám umožní zadat čárový kód ručně. Podrobnosti naleznete v části *Software nemůže přečíst čárový kód BeadChipu na straně 45*.
- 3 Vyberte možnost **Next** (Další).

Nastavení skenu

- 1 Na stránce Scan Setup (Nastavení skenu) potvrďte následující informace:
 - ▶ **Barcode** (Čárový kód) – Software při vložení BeadChipu přečte jeho čárový kód. Pokud byl čárový kód zadán ručně, zobrazí se tlačítko Edit (Upravit) pro pozdější změny.
 - ▶ **Type** (Typ) – Pole typu BeadChipu se automaticky vyplní na základě čárového kódu BeadChipu.
 - ▶ **DMAP Location** (Umístění složky DMAP) – Umístění složky DMAP se zadává na obrazovce BeadChip Scan Configuration (Konfigurace skenu BeadChip). Chcete-li změnit umístění pouze pro aktuální sken, vyberte možnost **Browse** (Procházet) a přejděte do správného umístění.
 - ▶ **Output Location** (Výstupní umístění) – Výstupní umístění se zadává na obrazovce BeadChip Scan Configuration (Konfigurace skenu BeadChip). Chcete-li změnit umístění pouze pro aktuální sken, vyberte možnost **Browse** (Procházet) a přejděte do zvoleného umístění.
- 2 Vyberte možnost **Next** (Další).

Kontrola před spuštěním běhu

Před spuštěním běhu provede software automatickou kontrolu systému. Během této kontroly se na obrazovce objeví následující ukazatele:

- ▶ **Šedé zaškrtnutí** – Kontrola ještě nebyla provedena.
- ▶ **Ikona probíhajícího procesu** ⌚ – Kontrola právě probíhá.
- ▶ **Zelené zaškrtnutí** – Prošlo kontrolou.
- ▶ **Červený křížek** – Neprošlo kontrolou. V případě, že některé položky neprošly kontrolou, je třeba zásahu uživatele. Bližší informace naleznete v části *Odstranění chyb automatické kontroly na straně 41*.

Chcete-li zastavit probíhající automatickou kontrolu, klikněte na tlačítko **Cancel** (Zrušit). Chcete-li kontrolu znovu spustit, zvolte tlačítko **Retry** (Zkusit znovu). Kontrola bude automaticky pokračovat od místa, kde nebyla kompletní nebo nebyla úspěšná.

Chcete-li si prohlédnout výsledky jednotlivých kontrol v rámci kategorie, vyberte kartu kategorie.

Spuštění skenu

Až proběhne automatická kontrola, vyberte možnost **Start** (Spustit). Skenování se spustí.

Bližší informace o konfiguraci systému a automatickém spuštění skenu po úspěšné kontrole naleznete v části [Úprava možností nastavení běhu na straně 11](#).

Sledování postupu skenu

1 Sledujte postup skenu pomocí obrázku BeadChipu. Jednotlivé barvy na obrázku indikují stav skenování.

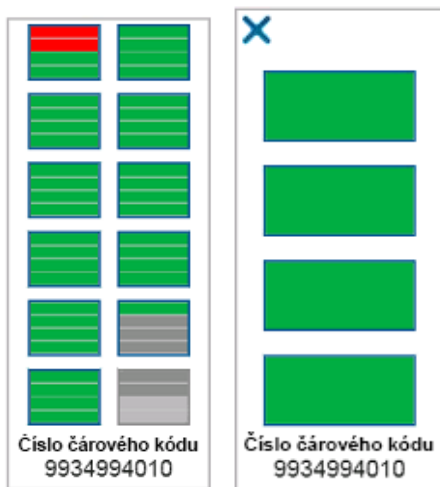
- ▶ **Světle šedá** – neskenováno
- ▶ **Tmavě šedá** – skenováno, ale neregistrováno
- ▶ **Zelená** – skenováno a úspěšně registrováno
- ▶ **Červená** – skenováno a registrace selhala

Pokud registrace selže, můžete vzorky obsahující části, které selhaly, přeskenovat. Další informace naleznete v části [Selhání skenu BeadChip na straně 46](#).

2 Výběrem obrázku BeadChipu přepnete mezi úplným zobrazením a podrobným zobrazením vybraného vzorku.

- ▶ Úplné zobrazení znázorňuje vzorky na BeadChipu a části v každém vzorku.
- ▶ Podrobné zobrazení znázorňuje jednotlivé části ve vybraném vzorku.

Obrázek 24 Obrázek BeadChipu: Úplné zobrazení a podrobné zobrazení



POZNÁMKA

Ukončení skenu je konečné. Pokud sken ukončíte před jeho dokončením, *nebudou* data skenu uložena.

Přenos dat

Při dokončení skenu se data seřadí do fronty k přenosu do výstupní složky skenování. Data se dočasně zapíší do počítače přístroje. Dočasná složka se z počítače přístroje automaticky odstraní, jakmile začne následující skenování.

Čas vyžadovaný k přenosu dat závisí na vašem síťovém připojení. Před zahájením následujícího skenování se ujistěte, že byla daná data zapsána do výstupní složky. Zkontrolovat to můžete ověřením, zda se ve složce čárového kódu nacházejí soubory GTC. Další informace naleznete v části *Struktura výstupní složky skenování* na straně 60.

Pokud se připojení přeruší, bude přenos dat pokračovat automaticky po jeho obnovení. Každý soubor získá po zařazení do fronty k přenosu do výstupní složky hodinový časovač. Když časovač vyprší nebo když před dokončením přenosu dojde k restartu přístroje, nebudou data do výstupní složky zapsána.

Kapitola 5 Údržba

Úvod	33
Ruční mytí	33
Výměna vzduchového filtru	36
Aktualizace softwaru	37
Možnosti restartu a vypnutí	39

Úvod

Postupy údržby zahrnují ruční mytí přístroje a aktualizace softwaru systému ve chvíli, kdy jsou k dispozici.

- ▶ **Promývání přístroje** – Automatické promytí přístroje po každém sekvenčním běhu pomáhá udržovat přístroj v provozu. Za určitých okolností je však třeba provést i ruční mytí. Viz *Ruční mytí na straně 33*.
- ▶ **Aktualizace softwaru** – Když je dostupná aktualizovaná verze softwaru systému, můžete aktualizaci nainstalovat automaticky prostřednictvím připojení k systému BaseSpace nebo ručně stažením instalačního programu z webu společnosti Illumina. Podrobnosti naleznete v části *Aktualizace softwaru na straně 37*.
- ▶ **Výměna vzduchového filtru** – Pravidelná výměna vzduchového filtru zajišťuje správné proudění vzduchu v přístroji.

Preventivní údržba

Společnost Illumina doporučuje, abyste preventivní servisní údržbu naplánovali na každý rok. Pokud nemáte uzavřenou servisní smlouvu, obraťte se na oblastního zástupce nebo technickou podporu společnosti Illumina a objednejte si placenou službu preventivní údržby.

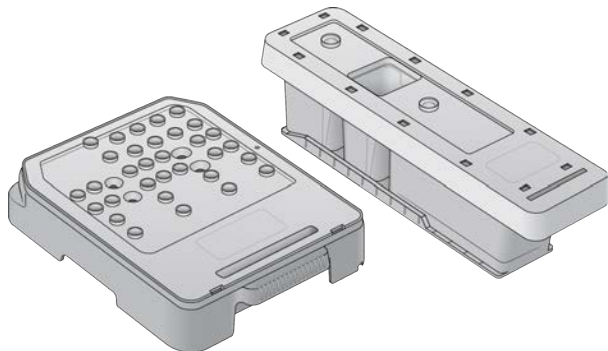
Ruční mytí

Ruční mytí se spouští z domovské obrazovky. Možnosti mytí jsou Quick Wash (Rychlé mytí) a Manual Post-Run Wash (Ruční mytí po skončení běhu).

Typy mytí	Popis
Rychlé mytí Trvání: 20 minut	Propláchně systém mycím roztokem dodaným uživatelem. Roztok se skládá z vody laboratorní jakosti a prostředku Tween 20 (mycí kazeta s puřrem). <ul style="list-style-type: none">• Pokud je přístroj nečinný a kazeta reagensů a kazeta s puřrem jsou na místě, je třeba toto mytí provádět každých 14 dní.• Je-li přístroj v suchém stavu (kazety reagensů a s puřrem jsou odstraněny), je třeba toto mytí provádět každých 7 dní.• Je vyžadováno po vypnutí.
Ruční mytí po běhu Trvání: 90 minut	Propláchně systém mycím roztokem dodaným uživatelem. Roztok se skládá z vody laboratorní jakosti, prostředku Tween 20 (mycí kazeta s puřrem) a 0,12 % chloranu sodného (mycí kazeta reagensů). Toto mytí je třeba provést, pokud neproběhlo automatické mytí po skončení běhu.

K ručnímu mytí je zapotřebí mycí kazeta reagensů a mycí kazeta s puřrem dodávané s přístrojem a použitá průtoková kyveta. Použitou průtokovou kyvetu lze za účelem promývání přístroje použít až dvacetkrát.

Obrázek 25 Mycí kazeta reagensů a mycí kazeta s pufrem



Příprava ručního mytí po skončení běhu

Rozhodněte se, zda připravíte ruční mytí po skončení běhu, které je popsáno níže, nebo zda zvolíte rychlé mytí (následující část). Chcete-li provést ruční mytí po skončení běhu, přeskočte část věnovanou rychlému mytí a pokračujte k části *Vložení použité průtokové kyvety a mycích kazet na straně 35*.

Spotřební materiál dodaný uživatelem	Objem a popis
NaOCl	1 ml, ředěno na 0,12 % Vloženo do mycí kazety reagensů (pozice č. 28)
100% Tween 20 Voda laboratorní jakosti	Použito k vytvoření 125 ml 0,05% mycího roztoku Tween 20 Vloženo do mycí kazety s pufrem (prostřední zásobník)

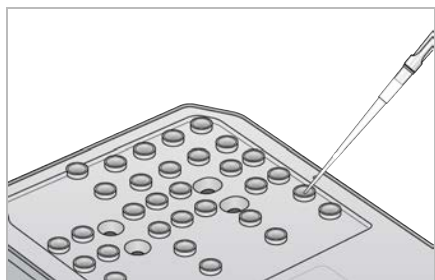


POZNÁMKA

Vždy používejte čerstvé ředění NaOCl, od jehož přípravy neuběhlo více než **24 hodin**. Pokud namícháte objem větší než 1 ml, uchovejte jej při teplotě 2–8 °C a spotřebujte do 24 hodin. Jinak zbylý roztok NaOCl zlikvidujte.

- Smícháním následujících objemů ve zkumavce mikroodstředivky získáte 1 ml 0,12% NaOCl:
 - ▶ 5% NaOCl (24 µl)
 - ▶ Voda laboratorní jakosti (976 µl)
- Obratěte zkumavku, aby se její obsah smíchal.
- Do mycí kazety reagensů přidejte 1 ml 0,12% NaOCl. Správný zásobník odpovídá pozici č.28 na předem naplněné kazetě.

Obrázek 26 Vložte NaOCl



- 4 Smícháním následujících objemů získáte 0,05% mycí roztok Tween 20:
 - ▶ 100% Tween 20 (62 µl)
 - ▶ Voda laboratorní jakosti (125 ml)
- 5 Do prostředního zásobníku mycí kazety s pufrém přidejte 125 ml mycího roztoku.
- 6 Zvolte možnost **Perform Wash** (Provést mytí) a poté **Manual Post-Run Wash** (Ruční mytí po skončení běhu).

Příprava rychlého mytí

Níže popsáním způsobem lze připravit rychlé mytí, které je alternativou k postupu uvedenému v části *Příprava ručního mytí po skončení běhu na straně 34*.

Spotřební materiál dodaný uživatelem	Objem a popis
100% Tween 20	Použito k vytvoření 40 ml 0,05% mycího roztoku Tween 20
Voda laboratorní jakosti	Vloženo do mycí kazety s pufrém (prostřední zásobník)

- 1 Smícháním následujících objemů získáte 0,05% mycí roztok Tween 20:
 - ▶ 100% Tween 20 (20 µl)
 - ▶ Voda laboratorní jakosti (40 ml)
- 2 Do prostředního zásobníku mycí kazety s pufrém přidejte 40 ml mycího roztoku.
- 3 Vyberte možnost **Perform Wash** (Provést mytí) a poté **Quick Wash** (Rychlé mytí).

Vložení použité průtokové kyvety a mycích kazet

- 1 Není-li v přístroji přítomna použitá průtoková kyveta, vložte ji do přístroje. Vyberte tlačítko **Load** (Vložit) a poté **Next** (Další).
- 2 Vyjměte zásobník na spotřebované reagentie a obsah zlikvidujte podle zavedených předpisů.



VAROVÁNÍ

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

- 3 Prázdný zásobník na spotřebované reagentie zasuňte nadoraz do přihrádky na pufr.
- 4 Pokud v přihrádce zůstala použitá kazeta s pufrém z předchozího běhu, vyjměte ji.
- 5 Vložte mycí kazetu s pufrém, která obsahuje mycí roztok.
- 6 Pokud v přihrádce zůstala použitá kazeta reagentií z předchozího běhu, vyjměte ji.
- 7 Vložte mycí kazetu reagentií.
- 8 Vyberte možnost **Next** (Další). Kontrola před mytím začne automaticky.

Spuštění mytí

- 1 Zvolte možnost **Start** (Spustit).
- 2 Až omývání skončí, vyberte možnost **Home** (Domů).

Po omytí

Po omytí zůstávají nasávací trubičky otočeny směrem dolů, aby do systému nemohl proniknout vzduch. Ponechte kazety na místě až do dalšího běhu.

Výměna vzduchového filtru

Vzduchový filtr zajišťuje správnou cirkulaci vzduchu v přístroji. Provozní software přístroje NextSeq 550Dx v diagnostickém režimu přístroje zobrazuje upozornění na potřebu výměny filtru každých 90 dní. Pokud se objeví toto upozornění, zvolte buď možnost **Remind in 1 day** (Připomenout o den později), nebo se řiďte následujícím postupem a vyberte možnost **Filter Changed** (Filtr vyměněn). Po výběru možnosti **Filter Changed** (Filtr vyměněn) se aktivuje odpočítávání na dalších 90 dnů.

- 1 Vybalte nový vzduchový filtr a na jeho rám napište datum, kdy jste jej měnili.
- 2 Vzadu na přístroji zatlačte na horní část držáku na filtr a tím jej uvolněte.
- 3 Uchopte horní část krytu a tlakem směrem vzhůru držák vysuňte z přístroje.
- 4 Odstraňte a zlikvidujte starý vzduchový filtr.
- 5 Do držáku vložte nový vzduchový filtr.

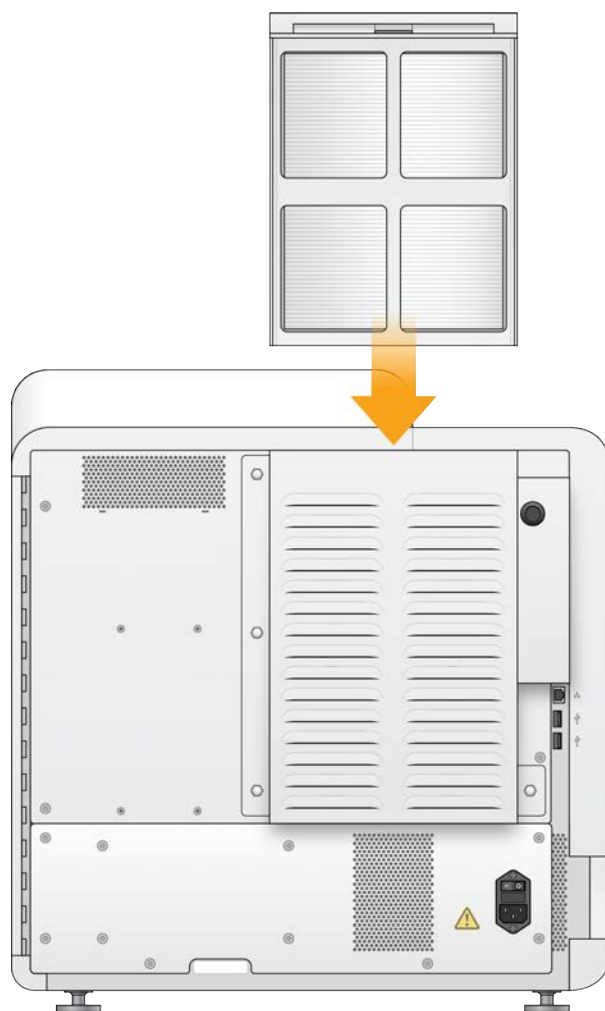


POZNÁMKA

Je-li filtr umístěn opačně, nefunguje správně. Zajistěte, aby byl vzduchový filtr v držáku umístěn tak, že nahoře bude vidět zelená šipka směřující nahoru a štítek s výstrahou bude skryt. Šipka by měla ukazovat směrem k úchopu držáku na filtr.

- 6 Držák filtru zasuňte do přístroje. Tlačte na jeho horní část směrem dolů, dokud neuslyšíte cvaknutí potvrzující, že je filtr na místě.

Obrázek 27 Vložení vzduchového filtru




Aktualizace softwaru

Aktualizace softwaru jsou součástí sady softwaru označované jako systémová sada, která obsahuje následující software:

- ▶ NextSeq Control Software (NCS)
- ▶ Návodů přístroje NextSeq
- ▶ RTA2
- ▶ NextSeq Service Software (NSS)
- ▶ Sequencing Analysis Viewer (SAV)
- ▶ BaseSpace Broker

Aktualizace softwaru můžete instalovat automaticky pomocí internetového připojení nebo ručně ze síťového umístění nebo disku USB.

- ▶ **Automatické aktualizace** – U přístrojů připojených k síti s internetovým přístupem se ve chvíli, kdy bude k dispozici aktualizace, zobrazí na tlačítku Manage Instrument (Upravit přístroj) na domovské obrazovce ikona výstrahy .

- ▶ **Ruční aktualizace** – Na [stránce podpory přístroje NextSeq 550Dx](#) na webu společnosti Illumina si stáhněte instalační program systémové sady.

Automatická aktualizace softwaru

- 1 Vyberte **Manage Instrument** (Upravit přístroj).
- 2 Vyberte možnost **Software Update** (Aktualizace softwaru).
- 3 Vyberte možnost **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Nainstalovat již staženou aktualizaci ze systému BaseSpace).
- 4 Výběrem možnosti **Update** (Aktualizovat) spustíte aktualizaci. Otevře se dialog k potvrzení příkazu.
- 5 Postupujte podle pokynů průvodce instalací:
 - a Přijměte licenční smlouvu.
 - b Přečtěte si poznámky k vydání.
 - c Projděte si seznam softwaru zahrnutého v aktualizaci.

Po dokončení aktualizace se řídicí software automaticky restartuje.



POZNÁMKA

Pokud je zahrnuta aktualizace firmwaru, je nutné po aktualizaci firmwaru restartovat systém.

Ruční aktualizace softwaru

- 1 Stáhněte si z webu společnosti Illumina instalační program systémové sady a uložte jej do síťového umístění.
Případně zkopírujte instalační soubor softwaru na přenosný disk USB.
- 2 Vyberte **Manage Instrument** (Upravit přístroj).
- 3 Vyberte možnost **Software Update** (Aktualizace softwaru).
- 4 Vyberte možnost **Manually install the update from the following location** (Ručně nainstalovat aktualizaci z následujícího umístění).
- 5 Vyberte možnost **Browse** (Procházet) a přejděte do umístění instalačního souboru softwaru. Poté vyberte možnost **Update** (Aktualizovat).
- 6 Postupujte podle pokynů průvodce instalací:
 - a Přijměte licenční smlouvu.
 - b Přečtěte si poznámky k vydání.
 - c Projděte si seznam softwaru zahrnutého v aktualizaci.

Po dokončení aktualizace se řídicí software automaticky restartuje.



POZNÁMKA

Pokud je zahrnuta aktualizace firmwaru, je nutné po aktualizaci firmwaru restartovat systém.

Možnosti restartu a vypnutí

Tlačítko Shut Down Options (Možnosti vypnutí) zpřístupňuje tyto funkce:

- ▶ Restart – Přístroj se spustí v režimu Dx.
- ▶ Shutdown (Vypnout) – Přístroj se spustí v režimu Dx.
- ▶ Exit to Windows (Ukončení a návrat do systému Windows) – V závislosti na vašich oprávněních můžete systém NCS zavřít a vrátit se do systému Windows.

Restart do diagnostického režimu

Příkazem Restart (Restartovat) bezpečně vypnete přístroj a restartujete jej v diagnostickém režimu. Diagnostický režim je výchozím režimem při restartování.

- 1 Vyberte **Manage Instrument** (Upravit přístroj).
- 2 Vyberte možnost **Shutdown Options** (Možnosti vypnutí).
- 3 Vyberte **Restart** (Restartovat).

Vypnutí přístroje

- 1 Vyberte **Manage Instrument** (Upravit přístroj).
- 2 Vyberte možnost **Shutdown Options** (Možnosti vypnutí).
- 3 Vyberte možnost **Shut Down** (Vypnout).
Příkaz Shut Down (Vypnout) bezpečně vypne software a napájení přístroje. Chcete-li přístroj hned zapnout znovu, vyčkejte alespoň 60 s.



POZNÁMKA

Ve výchozím nastavení se přístroj při zapnutí uvede do diagnostického režimu.



UPOZORNĚNÍ

Přístroj **nepřemísťujte**. Nesprávné přemístění přístroje může ovlivnit optické zarovnání a narušit integritu dat. Pokud potřebujete přístroj přemístit, spojte se se zástupcem společnosti Illumina.

Ukončení a návrat do systému Windows

Příkaz Exit to Windows (Skončit a přejít do systému Windows) vám zpřístupní operační systém přístroje a jakoukoli složku v počítači přístroje. Tímto příkazem bezpečně vypnete software a vrátíte se do systému Windows,

- 1 Vyberte **Manage Instrument** (Upravit přístroj).
- 2 Vyberte možnost **Shutdown Options** (Možnosti vypnutí).
- 3 Vyberte **Exit to Windows** (Skončit a přejít do systému Windows).

Příloha A Řešení problémů

Úvod	40
Soubory řešení problémů	40
Odstranění chyb automatické kontroly	41
Zásobník na spotřebované reagencie je plný	43
Pracovní postup rehybridizace	44
Chyby BeadChipu a skenování	45
Vlastní návody a složky návodů	47
Chybová zpráva RAID	47
Konfigurace nastavení systému	47

Úvod

Pokud máte technické otázky, navštivte stránku podpory přístroje NextSeq 550Dx na webu společnosti Illumina. Na stránkách podpory naleznete dokumentaci, odkazy ke stažení a přehled nejčastějších dotazů.

Pokud chcete mít přístup k bulletinům podpory, přihlaste se ke svému účtu MyIllumina.

V případě problémů v oblasti kvality nebo výkonnosti běhu se obraťte na technickou podporu společnosti Illumina. Podrobnosti naleznete v části *Technická pomoc na straně 65*.

Řešení problémů můžete usnadnit tím, že technické podpoře společnosti Illumina předáte odkaz na souhrn běhu v systému BaseSpace.

Soubory řešení problémů

Zástupce technické podpory společnosti Illumina může za účelem řešení problému požádat o kopie souborů specifických pro běh nebo kontrolu. Obvykle se při řešení problémů používají následující soubory.

Soubory řešení problémů sekvenačních běhů

Klíčový soubor	Složka	Popis
Informační soubor běhu (RunInfo.xml)	Kořenová složka	Obsahuje následující informace: <ul style="list-style-type: none">Název běhuPočet cyklů v běhuPočet cyklů v každém čteníZda je čtení indexovaným čtenímPočet záběrů a dlaždic na průtokové kvetě
Soubor s parametry běhu (RunParameters.xml)	Kořenová složka	Obsahuje informace o parametrech a součástech běhu. Informace zahrnuje RFID, sériové číslo, číslo součástky a datum konce použitelnosti.
Konfigurační soubor RTA (RTAConfiguration.xml)	Kořenová složka	Obsahuje nastavení konfigurace RTA pro běh. Soubor RTAConfiguration.xml se vytváří na začátku běhu.
Soubory InterOp (*.bin)	InterOp	Binární soubory výkazů použité v aplikaci Sequencing Analysis Viewer. Soubory InterOp jsou aktualizovány v průběhu běhu.
Soubory protokolů	Protokoly procesů	Soubory protokolů popisují každý krok, který přístroj v každém cyklu provedl, a seznam verzí softwaru a firmwaru, které byly při daném běhu použity. Soubor s názvem [InstrumentName]_CurrentHardware.csv obsahuje sériová čísla komponent přístroje.
Soubory protokolu chyb (*ErrorLog*.txt)	Protokoly RTA	Protokol chyb RTA. Soubory protokolu chyb se aktualizují vždy, když dojde k chybě.

Klíčový soubor	Složka	Popis
Soubory globálních protokolů (*GlobalLog*.tsv)	Protokoly RTA	Protokol všech událostí RTA. Soubory globálních protokolů se aktualizují během běhu.

Chyby RTA

Chcete-li vyřešit problémy s chybami RTA, zkontrolujte nejprve chybový protokol, který je uložen ve složce RTALogs. V případě, že běhy proběhnou úspěšně, se tento soubor nevytvorí. Hlásíte-li problémy technické podpoře společnosti Illumina, nezapomeňte ke své zprávě přiložit příslušný chybový protokol.

Soubory řešení problémů čipových skenů

Klíčový soubor	Složka	Popis
Soubor parametrů skenu (ScanParameters.xml)	Kořenová složka	Obsahuje informace o parametrech skenu. Informace obsahují datum skenu, čárový kód BeadChipu, umístění souboru klastru a umístění souboru manifestu.
Soubory protokolů	Protokoly procesů	Protokoly
Soubory metrik	[Čárový kód]	Metriky jsou poskytnuty jako metriky vzorků a metriky částí. [Čárový kód]_sample_metrics.csv – Pro každý vzorek a kanál (červený a zelený) uvádí hodnoty Percent Off Image, Percent Outliers, P05, P50, P95, Avg FWHM Avg, FWHM Stddev a Min Registration Score. [Čárový kód]_section_metrics.csv – Pro každou část a dlaždici uvádí hodnoty Laser Z-position, Through Focus Z-position, Red FWHM, Green FWHM, Red Avg Pixel Intensity, Green Avg Pixel Intensity, Red Registration Score a Green Registration Score.
Soubor přeskenování	[Čárový kód]	[Čárový kód]_rescan.flowcell – Uvádí umístění dlaždic upravená pro přeskenování, což zahrnuje zvýšené překryvání jednotlivých dlaždic.

Odstranění chyb automatické kontroly

Pokud při automatické kontrole dojde k chybám, použijte následující doporučené kroky k jejich odstranění. Automatické kontroly se u sekvenování a čipového skenování liší.

Kontroly sekvenačních běhů

Pokud se nezdaří kontrola před spuštěním běhu, RFID kazety reagencí se neuzamkne a kazetu bude možné použít při následujícím běhu. RFID se však uzamkne, jakmile jsou propíchnuty těsnicí fólie.

Kontroly systému	Doporučený postup
Doors Closed (Dvířka zavřena)	Zkontrolujte, zda jsou zavřena dvířka příslušné přihrádky.
Consumables Loaded (Spotřební materiál vložen)	Senzory spotřebního materiálu neregistrují. Zkontrolujte, zda je všechn spotřební materiál správně vložen. Na obrazovkách nastavení běhu se volbou Back (Zpět) vraťte na krok vkládání a zopakujte nastavení běhu.
Required Software (Požadovaný software)	Chybí zásadně důležité součásti softwaru. Provedte ruční aktualizaci softwaru a obnovte všechny jeho komponenty.

Kontroly systému	Doporučený postup
Instrument Disk Space (Místo na disku přístroje)	Na pevném disku přístroje není dostatek místa k provedení běhu. Možná se nepřenesla data z běhu předchozího. Vymažte data běhu z pevného disku přístroje.
Network Connection (Připojení k síti)	Síťové připojení bylo přerušeno. Zkontrolujte stav sítě i fyzické připojení k síti.
Network Disk Space (Místo na síťovém disku)	Buď je zaplněn účet BaseSpace, nebo síťový server.
Teplota	Doporučený postup
Temperature (Teplota)	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Temperature Sensors (Teplotní senzory)	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Fans (Ventilátory)	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Systém snímání	Doporučený postup
Imaging Limits (Limity snímání)	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Z Steps-and-Settle	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Bit Error Rate (Bitová chybovost)	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Flow Cell Registration (Registrace průtokové kyvety)	Je možné, že průtoková kyveta není správně usazena. <ul style="list-style-type: none"> Na obrazovkách nastavení běhu se volbou Back (Zpět) vraťte ke kroku týkajícímu se průtokové kyvety. Dvířka přihrádky pro snímání se otevřou. Vyjměte a znovu vložte průtokovou kyvetu. Zkontrolujte, zda je správně usazena.
Dodávka reagensů	Doporučený postup
Valve Response (Reakce ventilu)	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Pump (Čerpadlo)	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Buffer Mechanism (Mechanismus pufry)	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Spent Reagents Empty (Spotřebované reagensie prázdné)	Vyprázdněte zásobník na použité reagensie a prázdný zásobník znovu vložte na místo.

Kontroly čipových skenů

Kontroly systému	Doporučený postup
Doors Closed (Dvířka zavřena)	Zkontrolujte, zda jsou zavřena dvířka příslušné přihrádky.
Consumables Loaded (Spotřební materiál vložen)	Senzory spotřebního materiálu neregistrují. Zkontrolujte, zda je všechen spotřební materiál správně vložen. Na obrazovkách nastavení běhu se volbou Back (Zpět) vraťte na krok vkládání a zopakujte nastavení běhu.
Required Software (Požadovaný software)	Chybí zásadně důležité součásti softwaru. Proveďte ruční aktualizaci softwaru a obnovte všechny jeho komponenty.
Ověření vstupních souborů	Ujistěte se, že je cesta k souboru klastru a souboru manifestu správná a že se tam příslušné soubory nacházejí.
Instrument Disk Space (Místo na disku přístroje)	Na pevném disku přístroje není dostatek místa k provedení běhu. Možná se nepřenesla data z běhu předchozího. Vymažte data běhu z pevného disku přístroje.
Network Connection (Připojení k síti)	Síťové připojení bylo přerušeno. Zkontrolujte stav sítě i fyzické připojení k síti.
Network Disk Space (Místo na síťovém disku)	Buď je zaplněn účet BaseSpace, nebo síťový server.

Systém snímání	Doporučený postup
Imaging Limits (Limity snímání)	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Z Steps-and-Settle	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Bit Error Rate (Bitová chybovost)	Obraťte se na technickou podporu společnosti Illumina.
Automatické vycentrování	Vyjměte adaptér skenu BeadChip. Ujistěte se, že je BeadChip usazen v adaptéru, a poté adaptér znovu vložte.

Zásobník na spotřebované reagenty je plný

Každý běh zahajujte s prázdným zásobníkem na spotřebované reagenty.

Pokud před začátkem běhu tento zásobník nevyprázdníte, senzory dají softwaru pokyn k zastavení běhu v případě, že se tento zásobník naplní. Systémové senzory nemohou běh pozastavit, probíhá-li klastrování, resyntéza párového konce nebo automatické promývání po skončení běhu.

Pokud se běh pozastaví, zobrazí se dialogové okno s možnostmi zdvihnout nasávací trubičky a vyprázdnit plný zásobník.

Vyprázdnění zásobníku na spotřebované reagenty

- 1 Zvolte možnost **Raise Sippers** (Zdvihnout nasávací trubičky).
- 2 Vyjměte zásobník na spotřebované reagenty a obsah vhodným způsobem zlikvidujte.
- 3 Prázdný zásobník vraťte do přihrádky na pufr.
- 4 Zvolte možnost **Continue** (Pokračovat). Běh se automaticky obnoví.

Pracovní postup rehybridizace

Běh rehybridizace může být nutný v případě, že metriky vytvořené během prvních několika cyklů zobrazují intenzity nižší než 2500. Některé knihovny s nízkou diverzitou mohou zobrazovat intenzity nižší než 1000, což je očekávaný jev, který rehybridizací nelze vyřešit.



POZNÁMKA

Příkaz End Run (Ukončit běh) je konečný. V běhu nelze pokračovat, spotřební materiál běhu už nelze znovu použít a data sekvenování z běhu nejsou uložena.

Když ukončíte běh, provede software před ukončením běhu následující kroky:

- ▶ Umístí průtokovou kyvetu do bezpečného stavu.
- ▶ Odemkne RFID průtokové kyvety pro pozdější běh.
- ▶ Přiřadí průtokové kyvetě datum konce použitelnosti rehybridizace.
- ▶ Zapiše protokoly běhu pro dokončené cykly. Je běžné, že se tak stane se zpožděním.
- ▶ Obejde automatické promývání po skončení běhu.

Když spustíte běh rehybridizace, provede software následující potřebné kroky:

- ▶ Vytvoří složku běhu na základě jedinečného názvu běhu.
- ▶ Zkontroluje, zda nenastalo datum konce použitelnosti rehybridizace průtokové kyvety.
- ▶ Provede priming reagencí. Je běžné, že se tak stane se zpožděním.
- ▶ Přeskočí krok klastrování.
- ▶ Odebere předchozí primer čtení 1.
- ▶ Hybridizuje čerstvý primer čtení 1.
- ▶ Pokračuje ve čtení 1 a zbytku běhu na základě zadaných parametrů běhu.

Body ukončení běhu pro rehybridizaci

Pozdější rehybridizace je možná pouze v případě, že běh ukončíte v následujících bodech:

- ▶ **Po cyklu 5** – Intenzity se objevují po registraci šablony, která potřebuje prvních 5 cyklů sekvenování. Ačkoli je ukončení běhu po cyklu 1 bezpečné, doporučuje se ukončení po cyklu 5. Neukončujte běh v průběhu vytváření klastru.
- ▶ **Čtení 1 nebo čtení indexu 1** – Ukončete běh *před* zahájením resyntézy párového konce. Po zahájení resyntézy párového konce nelze průtokovou kyvetu uložit pro pozdější rehybridizaci.

Požadovaný spotřební materiál

Běh rehybridizace vyžaduje novou kazetu s pufrem a kazetu reagencí přístroje NextSeq 550Dx bez ohledu na to, zda byl běh zastaven.

Ukončení aktuálního běhu

- 1 Vyberte možnost **End Run** (Ukončit běh). Až budete vyzváni k potvrzení příkazu, vyberte možnost **Yes** (Ano).
- 2 Až budete vyzváni k uložení průtokové kyvety, vyberte možnost **Yes** (Ano). Zkontrolujte datum konce použitelnosti pro rehybridizaci.

- 3 Vyjměte uloženou průtokovou kyvetu a odložte ji na místo s teplotou od 2°C do 8°C, dokud nebudete připraveni nastavit běh rehybridizace.



POZNÁMKA

Průtokovou kyvetu můžete skladovat za teploty od 2 °C do 8 °C až po dobu 7 dní v uzavíratelném plastovém pouzdru **bez** vysoušecího balíčku. Nejlepších výsledků dosáhnete, když uloženou průtokovou kyvetu rehybridizujete během 3 dnů.

Ruční mytí

- 1 Na domovské obrazovce vyberte možnost **Perform Wash** (Provést mytí).
- 2 Na obrazovce Wash Selection (Výběr mytí) vyberte možnost **Manual Post-Run Wash** (Ruční mytí po skončení běhu). Viz *Ruční mytí na straně 33*.



POZNÁMKA

Pokud jste nevyjmuli kazetu reagensů a kazetu s pufrem ze zastaveného běhu, můžete je použít k ručnímu mytí. V opačném případě proveďte ruční mytí pomocí mycí kazety na reagensie a mycí kazety na pufr.

Nastavení nového běhu na kartě Prep (Příprava) systému BaseSpace

- 1 Pokud je přístroj nakonfigurován pro systém BaseSpace nebo BaseSpace Onsite, nastavte nový běh na kartě Prep (Příprava) pomocí stejných parametrů, jako měl původní běh.



TIP

Klikněte na kartu Pools (Fondy), vyberte příslušné ID fondu k zachování nastavení předchozího běhu a poté novému běhu přiřadte jedinečný název.

Nastavení běhu na přístroji

- 1 Připravte novou kazetu reagensů.
- 2 Pokud byla průtoková kyveta skladována, nechte ji dosáhnout pokojové teploty (15 až 30 minut).
- 3 Vyčistěte a vložte uloženou průtokovou kyvetu.
- 4 Vyjměte zásobník na spotřebované reagensie a obsah patřičně zlikvidujte. Poté prázdný zásobník znovu naplňte.
- 5 Vložte novou kazetu s pufrem a kazetu reagensů.
- 6 Na stránce Run Setup (Nastavení běhu) vyberte z následujících možností:
 - ▶ **BaseSpace nebo BaseSpace Onsite** – Vyberte běh a potvrďte parametry běhu.
 - ▶ **Standalone** (Samostatný) – zadejte název běhu a specifikujte stejné parametry jako v původním běhu.
- 7 Výběrem možnosti **Next** (Další) pokračujte ke kontrole před během a spuštění běhu.

Chyby BeadChipu a skenování

Software nemůže přečíst čárový kód BeadChipu

Když se zobrazí dialog chyby čárového kódu, vyberte z následujících možností:

- ▶ Vyberte možnost **Rescan** (Přeskenovat). Software se pokusí přečíst čárový kód znovu.

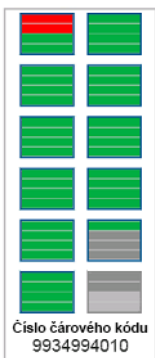
- ▶ Vyberte textové pole a zadejte číselný čárový kód, jak je ukázáno na obrázku. V závislosti na BeadChipu může mít číslo čárového kódu až 12 číslic. Vyberte možnost **Save** (Uložit). Obrázek čárového kódu se uloží do výstupní složky.
- ▶ Vyberte možnost **Cancel** (Zrušit). Dvířka přihrádky pro snímání se otevřou, aby bylo možné vyjmout adaptér skenu BeadChip.

Selhání skenu BeadChip

Obrázky jsou po skenování registrovány. Během procesu registrace se částice identifikují párováním umístění na skenovaném obrázku s informacemi poskytnutými v mapě částic nebo složce DMAP.

Části, u kterých registrace selže, budou na obrázku BeadChipu zobrazeny červeně.

Obrázek 28 BeadChip zobrazující části, které selhaly



Po dokončení skenu a zapsání dat skenování do výstupní složky se aktivuje tlačítko Rescan (Přeskenovat). Když vyberete možnost přeskenování, provede software následující kroky:

- ▶ Přeskenuje vzorky obsahující části, které selhaly, pomocí zvýšeného překrytí jednotlivých dlaždic.
- ▶ Vytvoří výstupní soubory v původní výstupní složce.
- ▶ Přepíše části, které selhaly, v předchozích výstupních souborech.
- ▶ Zvýší po každém přeskenování čítač skenů o 1 (to se však provede na pozadí). Software nepřejmenuje výstupní složku.

Přeskenování nebo spuštění nového skenu

- 1 Výběrem možnosti **Rescan** (Přeskenovat) spustíte skenování vzorků obsahujících části, které selhaly.
- 2 Pokud bude při skenování nadále docházet k selhání, ukončete jej.
- 3 Vyjměte BeadChip a adaptér a zkontrolujte, zda se na BeadChipu nenachází prach nebo nečistoty. Zbavte se nečistot pomocí stlačeného vzduchu nebo jiné podobné metody.
- 4 Znovu vložte BeadChip a spusťte nový sken.
Když spustíte nový sken, provede software následující kroky:
 - ▶ Provede skenování celého BeadChipu.
 - ▶ Vytvoří výstupní soubory v nové výstupní složce.
 - ▶ Zvýší čítač skenů o 1 (na základě počtu skenů posledního přeskenování).

Nahrazení souborů manifestů a souborů klastrů

- 1 Přejděte na stránku podpory společnosti Illumina (support.illumina.com) pro použitý BeadChip a klikněte na kartu **Downloads** (Ke stažení).
- 2 Stáhněte soubory, které mají být nahrazeny nebo aktualizovány, a zkopírujte je do vámi zvoleného síťového umístění.



POZNÁMKA

Ujistěte se, že jste vybrali soubory manifestů a klastrů, které jsou kompatibilní se systémem přístroje NextSeq 550Dx. Kompatibilní soubory mají v názvu text **NS550**.

- 3 Pouze v případech, že se změnilo umístění, aktualizujte podle následujícího postupu umístění na obrazovce BeadChip Scan Configuration (Konfigurace skenu BeadChip).
 - a Na domovské obrazovce softwaru NCS vyberte možnost **Manage Instrument** (Upravit přístroj).
 - b Vyberte možnost **System Configuration** (Konfigurace systému).
 - c Vyberte možnost **BeadChip Scan Configuration** (Konfigurace skenu BeadChip).
- 4 Vyberte možnost **Browse** (Procházet) a přejděte do umístění náhradních nebo aktualizovaných souborů.


Vlastní návody a složky návodů

Neupravujte původní návody. Vždy si vytvořte kopii původního návodu s novým názvem. Pokud bude původní návod upraven, u budoucích aktualizací jej již nástroj k aktualizaci softwaru nerozpozná a novější verze nebudou instalovány.

Ukládejte vlastní návody v příslušné složce návodů. Složky návodů jsou uspořádány následovně.

Custom (Vlastní)

 High (Vysoký výkon) – vlastní návody k použití s vysokovýkonnou sadou.

 Mid (Střední výkon) – vlastní návody k použití se středně výkonnou sadou.

 High (Vysoký výkon) – původní návody k použití s vysokovýkonnou sadou.

 Mid (Střední výkon) – původní návody k použití se středně výkonnou sadou.

 Wash (Mytí) – obsahuje návod na ruční mytí.

Chybová zpráva RAID

Počítač přístroje NextSeq 550Dx je vybaven celkem čtyřmi pevnými disky. Dva jsou určeny pro diagnostický a dva pro výzkumný režim. Začne-li některý pevný disk selhávat, systém vygeneruje chybovou zprávu RAID a navrhne vám, abyste se obrátili na technickou podporu společnosti Illumina. Obvykle je třeba pevný disk vyměnit.

Můžete dále pokračovat v nastavování běhu a pracovat jako obvykle. Účelem této zprávy je předem naplánovat službu, aby se předešlo výpadkům při běžném provozu přístroje. Chcete-li pokračovat, vyberte možnost **Close** (Zavřít).

Konfigurace nastavení systému

Konfigurace systému probíhá v rámci instalace. Pokud je však třeba provést nějakou změnu nebo překonfigurovat systém, použijte možnost konfigurace systému. Přístup k možnostem konfigurace systému má pouze účet s oprávněním správce systému Windows.

- ▶ **Network Configuration** (Konfigurace sítě) – Umožňuje nastavit IP adresu, adresu serveru doménových názvů (DNS), název počítače a název domény.
- ▶ **Analysis Configuration** (Konfigurace analýzy) – Poskytuje možnosti metod analýzy, včetně systému BaseSpace, BaseSpace Onsite, samostatného režimu, sledování běhu v systému BaseSpace a nastavení výchozích přihlašovacích údajů systému BaseSpace a výkazů o stavu přístroje.
- ▶ **BeadChip Scan Configuration** (Konfigurace skenu BeadChip) – Poskytuje možnosti zadání výchozího umístění složky DMAP, umístění výstupní složky, souborového formátu ukládaných obrázků a typu výstupního souboru.

Nastavení konfigurace sítě

- 1 Na obrazovce úprav přístroje zvolte možnost **System Configuration** (Konfigurace systému).
- 2 Vyberte možnost **Network Configuration** (Konfigurace sítě).
- 3 Chcete-li, aby vám server DHCP přiděloval adresu IP automaticky, zvolte možnost **Obtain an IP address automatically** (Automaticky získávat IP adresu).



POZNÁMKA

Protokol Dynamic Host Configuration Protocol (DHCP) je standardním síťovým protokolem, který se používá v sítích IP pro dynamickou distribuci síťových konfiguračních parametrů.

Případně můžete zvolit možnost **Use the following IP address** (Použít následující IP adresu) a ručně připojit přístroj k jinému serveru, jak je uvedeno níže. Dotazy na adresy specifické pro váš závod směřujte na svého správce sítě.

- ▶ Zadejte adresu IP. Adresa IP se skládá ze čtyř čísel oddělených tečkami, například 168.62.20.37.
 - ▶ Zadejte masku podsítě pro síť IP.
 - ▶ Zadejte výchozí bránu, což je síťový rozbočovač určený pro připojení k internetu.
- 4 Chcete-li přístroj připojit k serveru názvů domén přidruženého k adrese IP, zvolte možnost **Obtain a DNS server address automatically** (Automaticky získávat adresu serveru DNS).
Případně můžete zvolit možnost **Use the following DNS server addresses** (Použít následující adresy serveru DNS) a ručně připojit přístroj k jinému serveru názvů domén, jak je uvedeno níže.
 - ▶ Zadejte preferovanou adresu DNS. Adresa DNS je název serveru, který slouží k překladu názvů domén na IP adresy.
 - ▶ Zadejte alternativní adresu DNS. Tato alternativa bude použita, pokud preferovaná DNS nedokáže název některé domény přeložit na adresu IP.
 - 5 Pomocí **Save** (Uložit) pokračujte na obrazovku počítače.



POZNÁMKA

Název počítače přístroje je k tomuto počítači přiřazen již během výroby. Jakékoli změny názvu tohoto počítače mohou ovlivnit připojení a vyžadují přispění správce sítě.

- 6 Počítač připojíte do domény nebo do pracovní skupiny následovně.
 - ▶ **Přístroje připojené k internetu** – Zvolte možnost **Member of Domain** (Člen domény) a poté název domény, přes kterou se ve vašem závodě připojujete k internetu. Změny domény vyžadují uživatelské jméno a heslo správce.
 - ▶ **Přístroje nepřipojené k internetu** – Zvolte možnost **Member of Work Group** (Člen pracovní skupiny) a zadejte název pracovní skupiny. Název pracovní skupiny je v rámci vašeho závodu jedinečný.
- 7 Vyberte možnost **Save** (Uložit).

Nastavení konfigurace analýzy

- 1 Na obrazovce úprav přístroje zvolte možnost **System Configuration** (Konfigurace systému).
- 2 Vyberte možnost **Analysis Configuration** (Konfigurace analýzy).
- 3 Výběrem z následujících možností určete umístění, kam se přenesou data pro následnou analýzu.
 - ▶ Chcete-li data sekvenování odeslat do systému Illumina BaseSpace, vyberte možnost **BaseSpace**. **[Volitelné]** Zaškrtněte políčko **Output Folder** (Výstupní složka), vyberte možnost **Browse** (Procházet) a přejděte do sekundárního síťového umístění, kde můžete uložit soubory BCL jako doplnění k systému BaseSpace.
 - ▶ Vyberte možnost **BaseSpace Onsite**. Do pole Server Name (Název serveru) zadejte úplnou cestu k vašemu serveru BaseSpace Onsite. **[Volitelné]** Zaškrtněte políčko **Output Folder** (Výstupní složka), vyberte možnost **Browse** (Procházet) a přejděte do sekundárního síťového umístění, kde můžete uložit soubory BCL jako doplnění k serveru BaseSpace Onsite.
 - ▶ Chcete-li data uložit pouze do síťového umístění, vyberte možnost **Standalone Instrument** (Samostatný přístroj). Vyberte možnost **Browse** (Procházet) a přejděte do zvoleného síťového umístění. Řídicí software vytváří název výstupní složky automaticky.
 - ▶ **[Volitelné]** Chcete-li běh sledovat pomocí nástrojů vizualizace v systému BaseSpace, vyberte možnost **Use Run Monitoring** (Použít sledování běhu). Je potřeba přihlášení k systému BaseSpace a internetové připojení.
- 4 Pokud jste vybrali možnost BaseSpace nebo BaseSpace Onsite, nastavte podle následujících pokynů parametry systému BaseSpace.
 - ▶ Vyplněním hodnot **User Name** (Uživatelské jméno) a **Password** (Heslo) v systému BaseSpace registrujete přístroj.
 - ▶ Výběrem možnosti **Use default login and bypass the BaseSpace login screen** (Použít výchozí přihlašovací údaje a obejít přihlašovací obrazovku systému BaseSpace) nastavte registrované uživatelské jméno a heslo jako výchozí přihlašovací údaje. Díky tomuto nastavení se během nastavení běhu obejde obrazovka systému BaseSpace.
- 5 Chcete-li povolit monitorovací službu Illumina Proactive, zvolte možnost (Odesílat výkonnostní údaje přístroje do společnosti Illumina) a **Send instrument health information to Illumina** (Odesílat informace o stavu přístroje do společnosti Illumina). Název nastavení v softwarovém rozhraní se může lišit od názvu uvedeného v této příručce v závislosti na verzi NCS, kterou používáte.

Když je toto nastavení zapnuté, jsou výkonnostní údaje přístroje zasílány společnosti Illumina. Tyto údaje pomáhají společnosti Illumina snáze řešit problémy a zjišťovat možné chyby, zajišťovat proaktivní údržbu a maximalizovat dobu provozu přístroje. Další informace o výhodách této služby najdete v dokumentu *Illumina Proactive Technical Note (dokument č. 1000000052503)*.

Tato služba:

 - ▶ Neodesílá data sekvenování
 - ▶ Vyžaduje, aby byl přístroj připojen k síti s přístupem k internetu.
 - ▶ Vyžaduje, aby byl přístroj připojen k centru BaseSpace



POZNÁMKA

Tato možnost není k dispozici pro centrum BaseSpace Onsite

- ▶ Tato funkce je ve výchozím nastavení zapnutá. Chcete-li se odhlásit od této služby, deaktivujte nastavení **Send instrument health information to Illumina** (Odesílat informace o stavu přístroje do společnosti Illumina).

- 6 Vyberte možnost **Save** (Uložit).

Konfigurace skenu BeadChip

- 1 Na obrazovce úprav přístroje zvolte možnost **System Configuration** (Konfigurace systému).
- 2 Vyberte možnost **BeadChip Scan Configuration** (Konfigurace skenu BeadChip).
- 3 Chcete-li zadat výchozí umístění složky DMAP, vyberte možnost **Browse** (Procházet) a přejděte do vámi zvoleného umístění složky v síti vašeho závodu.



POZNÁMKA

Před každým skenem si stáhněte a zkopírujte obsah DMAP do tohoto umístění. Obsah DMAP je vyžadován pro každý BeadChip a je jedinečný pro každý čárový kód BeadChipu.

- 4 Chcete-li zadat výchozí umístění výstupu, vyberte možnost **Browse** (Procházet) a přejděte do vámi zvoleného umístění v síti vašeho závodu.
- 5 Vyberte obrázkový formát souboru pro ukládané obrázky. Výchozím typem obrázku je **JPG**.
- 6 Vyberte formát výstupního souboru pro data skenu. Výchozím typem výstupního souboru je **GTC only** (Pouze GTC).
- 7 Vyberte možnost **Save** (Uložit).
- 8 Na obrazovce Scan Map (Skenování – mapa) zadejte úplnou cestu k souboru manifestu a souboru klastru pro každý typ BeadChipu. U každého typu souboru vyberte možnost **Browse** (Procházet) a přejděte do umístění složky, která tyto soubory obsahuje.
- 9 **[Volitelné]** Výběrem možnosti **Hide Obsolete BeadChips** (Skrýt zastaralé BeadChipy) odeberte ze zobrazení zastaralé BeadChipy.
- 10 Vyberte možnost **Save** (Uložit).

Příloha B Real-Time Analysis

Přehled softwaru Real-Time Analysis	51
Pracovní postup softwaru Real-Time Analysis	52

Přehled softwaru Real-Time Analysis

Přístroj NextSeq 550Dx používá implementaci softwaru Real-Time Analysis (RTA) s názvem RTA2. RTA2 běží na počítači přístroje a extrahuje intenzity z obrazů, provádí přiřazení báze a k přiřazení báze přiřazuje skóre kvality. RTA2 a řídicí software komunikují prostřednictvím webového rozhraní HTTP a souborů ve sdílené paměti. Pokud dojde k ukončení programu RTA2, zpracování nebude pokračovat a data běhu nebudou uložena.



POZNÁMKA

Výkon demultiplexování není vypočten. Karta Index v softwaru Sequencing Analysis Viewer (SAV) proto není vyplněna.

Vstupy modulu RTA2

Modul RTA2 vyžaduje pro zpracování následující vstupy:

- ▶ Obrazy dlaždic v paměti místního systému.
- ▶ Soubor RunInfo.xml, který se vytváří automaticky na začátku běhu a zahrnuje název běhu, počet cyklů, informaci, zda je čtení indexováno, a počet dlaždic na průtokové kyteti.
- ▶ Soubor RTA.exe.config, což je soubor softwarové konfigurace ve formátu XML.

Software RTA2 přebírá příkazy od řídicího softwaru. Týkají se umístění souboru RunInfo.xml a zda je specifikována nějaká volitelná výstupní složka.

Výstupní soubory RTA verze 2

Obrazy pro každý kanál jsou do paměti předávány jako dlaždice. Dlaždice jsou malé obrazové oblasti na průtokové kyteti, definované jedním pohledem kamery. Z těchto obrazů vytváří software výstup jako sadu souborů přiřazení bází a souborů filtrů s hodnocením kvality. Všechny další soubory výstupní soubory podporují.

Typ souboru	Popis
Soubory přiřazení bází	Každá analyzovaná dlaždice je zahrnuta v agregovaném souboru přiřazení báze (*.bcl.bgzf) pro každou cestu a cyklus. Agregovaný soubor přiřazení báze obsahuje přiřazení báze a s ním spojené skóre kvality pro každý klastř příslušné cesty.
Soubory filtrů	Každá dlaždice vytváří informaci o filtru, která je sdružena do jednoho souboru filtru (*.filter) pro každou cestu. Soubor filtru určuje, zda klastř prochází filtry.
Soubory umístění klastřů	Soubory umístění klastřů (*.locs) obsahují koordináty X a Y pro každý klastř v dlaždici. Soubor umístění klastřů se vytváří pro každou cestu během vytváření šablony.
Soubory indexu přiřazení báze	Soubor indexu přiřazení báze (*.bci) se vytváří pro každou cestu, aby zůstaly zachovány původní informace o dlaždici. Soubor indexu obsahuje pár hodnot pro každou dlaždici, které zahrnují číslo dlaždice a počet klastřů pro danou dlaždici.

Výstupní soubory slouží k další analýze v systému BaseSpace. Případně můžete provést převod do formátu FASTQ a využít analytická řešení třetích stran pomocí převodního softwaru bcl2fastq. Soubory přístroje NextSeq 550Dx vyžadují verzi bcl2fastq v2.0 nebo novější. Nejnovější verzi softwaru bcl2fastq naleznete na [stránce souborů ke stažení pro přístroj NextSeq 550Dx](#) na webu společnosti Illumina.

RTA verze 2 poskytuje metriku kvality běhu v reálném čase, kterou ukládá v podobě souborů InterOp. Soubory InterOp jsou binárním výstupem, který obsahuje metriky dlaždice, cyklu a úrovně čtení, a jsou nutné k zobrazení metrik v reálném čase v aplikaci Sequencing Analysis Viewer (SAV). Nejnovější verzi aplikace SAV naleznete na [stránce souborů ke stažení pro aplikaci SAV](#) na webu společnosti Illumina.

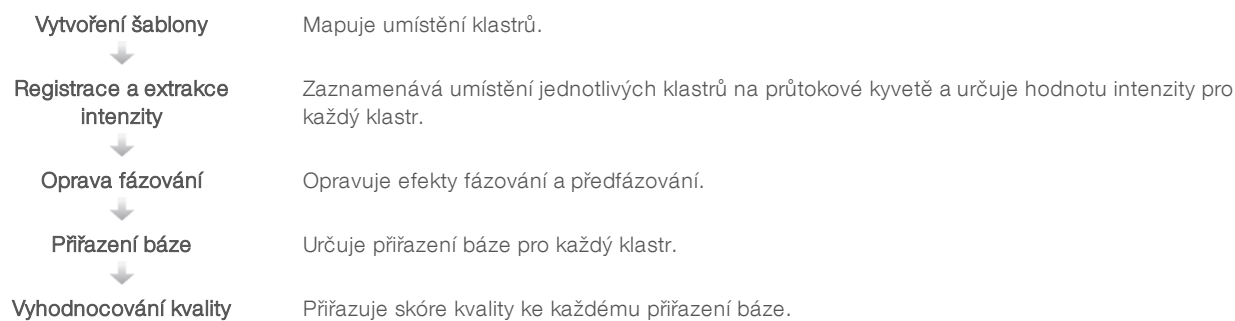
Nakládání s chybami

RTA2 vytváří protokoly a zapisuje je do složky protokolů RTA. Chyby jsou zaznamenávány do souboru chyb ve formátu *.tsv.

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

- ▶ *GlobalLog*.tsv – shrnuje důležité události běhu.
- ▶ *Error*.tsv – obsahuje seznam chyb, ke kterých při běhu došlo.
- ▶ *WarningLog*.tsv – obsahuje seznam varování, která byla při běhu vygenerována.

Pracovní postup softwaru Real-Time Analysis



Vytvoření šablony

Prvním krokem pracovního postupu softwaru RTA je vytvoření šablony, která pomocí koordinát X a Y definuje pozice jednotlivých klastrů na dlaždici.

K vytvoření šablony jsou zapotřebí data obrazů z prvních pěti cyklů běhu. Šablona se vytvoří, jakmile bude sejmuto poslední cyklus šablony pro příslušnou dlaždici.



POZNÁMKA

Chcete-li během vytváření šablony detekovat některý klastr, musí být v prvních **pěti** cyklech alespoň jedna báze jiná než G. Pro jakékoli sekvenace indexu vyžaduje software RTA v2, aby se v prvních **dvou** cyklech vyskytla alespoň jedna báze jiná než G.

Šablona slouží jako reference pro následující krok registrace a extrakce intenzity. Pozice klastru pro celou průtokovou kyvetu jsou zapsány do souborů umístění klastrů (*.locs), jeden soubor pro každou cestu.

Registrace a extrakce intenzity

Registrace a extrakce intenzity začíná poté, co se vytvoří šablona.

- ▶ Registrace zároveň obrazy vytvořené v každém z po sobě jdoucích cyklů snímání proti šabloně.
- ▶ Extrakce intenzity určuje hodnotu intenzity pro každý klastr v šabloně pro daný obraz.

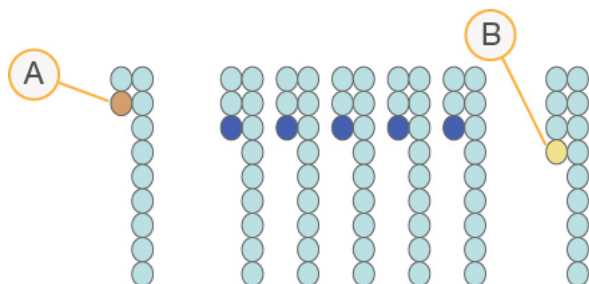
Pokud se u některých obrazů v cyklu registrace nezdaří, pro dotyčnou dlaždici v cyklu se nevytvoří žádná přiřazení databáze. Pomocí softwaru Sequencing Analysis Viewer (SAV) prozkoumejte obrázky miniatur a identifikujte ty, u kterých selhala registrace.

Oprava fázování

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

- ▶ K fázování dochází, když se báze zpozdí.
- ▶ K předfázování dochází, když báze poskočí dopředu.

Obrázek 29 Fázování a předfázování



- A Čtení sbází, která fázuje.
- B Čtení sbází, která předfázuje.

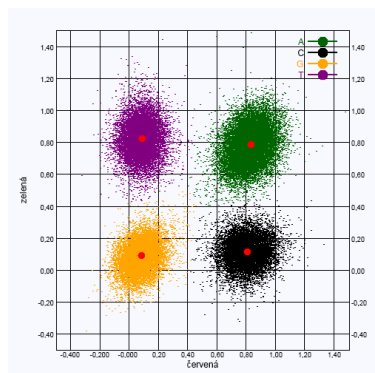
Modul RTA2 opravuje účinky fázování a předfázování, což maximalizuje kvalitu dat v každém cyklu během běhu.

Přiřazení báze

Přiřazení báze určuje bázi (A, C, G nebo T) pro každý klastr dané dlaždice v konkrétním cyklu. Přístroj NextSeq 550Dx používá dvoukanálové sekvenování, které vyžaduje k zakódování dat pro 4 báze DNA pouze dva snímky, jeden z červeného a jeden ze zeleného kanálu.

Intenzity extrahované z jednoho obrazu a porovnané s jiným obrazem vytvoří čtyři odlišné populace, z nichž každá odpovídá jednomu nukleotidu. Proces přiřazení báze určuje, do které populace každý klastr patří.

Obrázek 30 Vizualizace intenzit klastrů



Tabulka 1 Přřazení báze při dvoukanálovém sekvenování

Báze	Červený kanál	Zelený kanál	Výsledek
A	1 (zapnuto)	1 (zapnuto)	Klastry, které vykazují intenzitu v červených i zelených kanálech.
C	1 (zapnuto)	0 (vypnuto)	Klastry, které vykazují intenzitu pouze v červeném kanále.
G	0 (vypnuto)	0 (vypnuto)	Klastry, které nevykazují intenzitu v žádném známém umístění klastrů.
T	0 (vypnuto)	1 (zapnuto)	Klastry, které vykazují intenzitu pouze v zeleném kanále.

Klastry procházející filtrem

Během běhu model RTA2 filtruje nezpracovaná data, aby odebral čtení, která nedosahují prahové hodnoty kvality dat. Klastry, které se překrývají nebo mají nízkou kvalitu, budou odebrány.

V případě dvoukanálové analýzy využívá modul RTA2 systém založený na populacích, aby určil ryzost přiřazení báze. Klastry procházejí filtrem (PF), pokud maximálně 1 přiřazení báze má v prvních 25 cyklech ryzost $< 0,63$. Na klastry, které neprojdou filtrem, se přiřazení báze nepoužije.

Informace o indexování

Proces čtení indexu přiřazení báze se liší od procesu jiných čtení přiřazení báze.

Čtení indexů musí v některém ze dvou prvních cyklů začínat alespoň jednou bází, která je jiná než G. Pokud čtení indexu začíná dvěma přiřazeními báze G, negeneruje se žádná intenzita signálu. Signál musí být přítomen alespoň ve dvou prvních cyklech, aby byl zajištěn výkon demultiplexování.

Chcete-li zvýšit robustnost demultiplexování, vyberte sekvence indexu, které pro každý cyklus poskytují signál alespoň v jednom, ideálně však v obou kanálech. Budete-li se řídit tímto pokynem, vyhnete se kombinacím indexu, které při jakémkoliv cyklu vytvářejí výhradně báze G.

- ▶ Červený kanál – A nebo C
- ▶ Zelený kanál – A nebo T

Tento proces přiřazení báze zajišťuje přesnost při analýze vzorků s nízkou četností.

Vyhodnocování kvality

Skóre kvality představuje předpověď pravděpodobnosti nesprávného přiřazení báze. Vyšší skóre kvality naznačuje, že přiřazení báze má vyšší kvalitu a s větší pravděpodobností bude správné.

Skóre kvality je ucelený způsob sdělování pravděpodobnosti malých chyb. Skóre kvality je uváděno ve formě $Q(X)$, kde X je příslušné skóre. Následující tabulka zobrazuje vztah mezi skórem kvality a pravděpodobností chyby.

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



POZNÁMKA

Vyhodnocování kvality je založeno na upravené verzi algoritmu programu Phred.

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

Po stanovení skóre kvality se výsledky zaznamenají do souborů přiřazení báze (*.bcl.bgzf).

Příloha C Výstupní soubory a složky

Výstupní soubory sekvenování	56
Struktura výstupní složky sekvenování	59
Výstupní soubory skenování	60
Struktura výstupní složky skenování	60

Výstupní soubory sekvenování

Typ souboru	Popis souboru, umístění a název
Soubory přiřazení bází	Každá analyzovaná dlaždice je zahrnuta do souboru přiřazení báze, agregovaného v jednom souboru pro každou cestu a každý cyklus. Agregovaný soubor obsahuje přiřazení báze a zakódované skóre kvality pro každý klastr příslušné cesty. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] – soubory jsou uloženy v jedné složce pro každou cestu. [Cyklus].bcl.bgzf, kde [Cyklus] je počet cyklů zapsaný čtyřmi číslicemi. Soubory přiřazení báze jsou komprimovány do formátu gzip.
Soubor indexu přiřazení báze	Pro každou cestu obsahuje binární soubor indexu původní informace o dlaždici v páru hodnot pro každou dlaždici, které obsahují číslo dlaždice a počet klastrů na dlaždici. Nejprve se vytvářejí soubory indexu přiřazení báze a pro příslušnou cestu je vytvořen soubor přiřazení báze. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] – soubory jsou uloženy v jedné složce pro každou cestu. s_[Lane].bci
Soubory umístění klastrů	Pro každou dlaždici jsou koordináty X a Y každého klastru agregovány do jednoho souboru umístění klastrů pro každou cestu. Soubory umístění klastrů jsou výsledkem vytváření šablony. Data\Intensities\L00[X] – soubory jsou uloženy v jedné složce pro každou cestu. s_[lane].locs
Soubory filtrů	Soubor filtru vymezuje, zda klastr projde filtry. Informace o filtru je agregována do jednoho souboru filtru pro každou cestu a čtení. Soubory filtrů jsou vytvářeny ve 26. cyklu a využívají data z předchozích 25 cyklů. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] – soubory jsou uloženy v jedné složce pro každou cestu. s_[lane].filter
Soubory InterOp	Binární soubory výkazů použité v aplikaci Sequencing Analysis Viewer (SAV). Soubory InterOp jsou aktualizovány v průběhu běhu. Složka InterOp
Soubor konfigurace RTA	Soubor konfigurace RTA se vytváří na začátku běhu a obsahuje seznam nastavení příslušného běhu. [Kořenová složka], RTAConfiguration.xml
Informační soubor běhu	Obsahuje název běhu, počet cyklů v každém čtení, údaj, zda je toto čtení čtením indexovaným, a počet záběrů a dlaždic na průtokové kyvetě. Soubor s informacemi o běhu se vytváří na začátku běhu. [Kořenová složka], RunInfo.xml

Dlaždice průtokové kyvety

Dlaždice jsou malé obrazové oblasti na průtokové kyvetě, definované jedním pohledem kamery. Celkový počet dlaždic závisí na počtu cest, záběrů a povrchů, které se na průtokové kyvetě snímají, a na tom, jak kamery při snímání spolupracují. Průtokové kyvety s vysokým výkonem obsahují celkem 864 dlaždic.

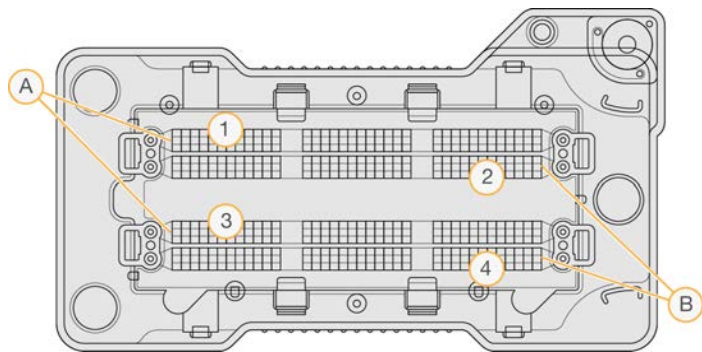
Tabulka 2 Dlaždice průtokové kyvety

Komponenta průtokové kyvety	Vysoký výkon	Popis
Cesty	4	Cesta představuje fyzický kanál s vyhrazenými vstupními a výstupními porty.
Povrchy	2	Průtoková kyveta je snímána na dvou površích – na horním a dolním. Nejprve je nasnímán horní povrch dlaždice 1, pak spodní povrch téže dlaždice a poté se kamera přesune na dlaždici následující.
Záběry na cestu	3	Záběr představuje sloupec dlaždic příslušné cesty.
Segmenty kamery	3	Přístroj používá ke snímání průtokové kyvety 6 kamer ve třech segmentech pro každou cestu.
Dlaždice na záběr na segment kamery	12	Dlaždice je část průtokové kyvety, kterou kamera vidí jako jeden obrázek.
Celkový počet nasnímaných dlaždic	864	Celkový počet dlaždic se rovná cesty × povrchy × záběry × segmenty kamery × dlaždice na záběr na segment.

Číslování cest

Cesty 1 a 3 neboli pár cest A jsou snímány najednou. Cesty 2 a 4 neboli pár cest B budou snímány až po skončení snímání páru A.

Obrázek 31 Číslování cest

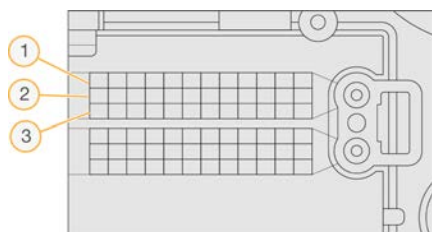


- A Pár cest A – cesty 1 a 3
- B Pár cest B – cesty 2 a 4

Číslování záběrů

Každá cesta je snímána ve třech záběrech. U průtokových kyvet s vysokým výkonem jsou záběry označeny čísly 1–3.

Obrázek 32 Číslování záběrů

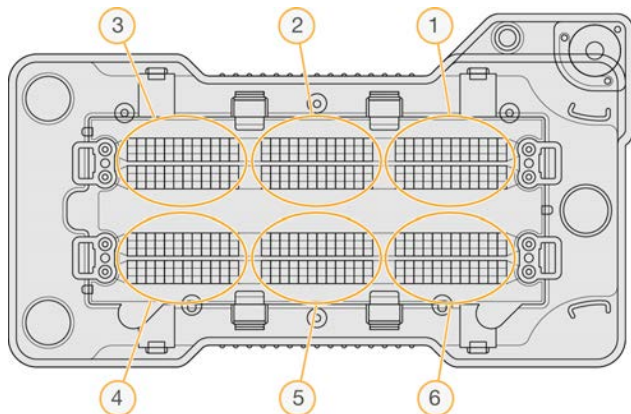


Číslování kamery

Přístroj NextSeq 550Dx používá ke snímání průtokové kvety celkem šest kamer.

Kamery jsou číslovány od 1 do 6. Kamery 1–3 snímají cestu 1. Kamery 4–6 snímají cestu 3. Jakmile kamery sejmou cesty 1 a 3, snímací modul se přesune na osu X, aby mohl sejmut cesty 2 a 4.

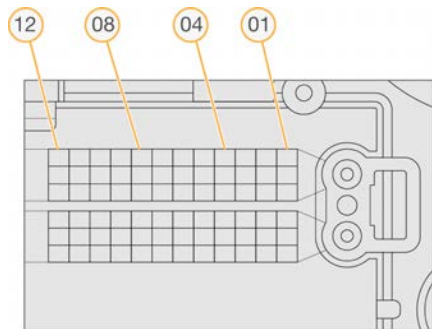
Obrázek 33 Kamera a číslování segmentů (Zobrazena průtoková kvjeta s vysokým výkonem)



Číslování dlaždic

V jednom záběru segmentu každé kamery se nachází 12 dlaždic. Dlaždice jsou označeny čísly 01–12 bez ohledu na číslo záběru nebo segmentu kamery. Čísla jsou vždy dvoumístná.

Obrázek 34 Číslování dlaždic



Kompletní číslo dlaždice zahrnuje pět číslic, které představují umístění podle následujícího systému:

- ▶ **Povrch** – 1 představuje horní povrch, 2 představuje povrch dolní.
- ▶ **Záběr** – 1, 2 nebo 3.
- ▶ **Kamera** – 1, 2, 3, 4, 5, nebo 6
- ▶ **Dlaždice** – 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, nebo 12

Příklad: Dlaždice označená číslem 12508 označuje horní povrch, záběr číslo 2, kameru číslo 5 a dlaždici číslo 8.

Kompletní pětimístné číslo dlaždice je použito v názvu souboru obrázků miniatur a v empirických fázovacích souborech. Další informace naleznete v části [Výstupní soubory sekvenování na straně 56](#).

Struktura výstupní složky sekvenování

Řídicí software vytváří název výstupní složky automaticky.

📁 Data

📁 Intensities

📁 BaseCalls

📁 L001 – Soubory přiřazení báze pro cestu 1, agregované do jednoho souboru na cyklus.

📁 L002 – Soubory přiřazení báze pro cestu 2, agregované do jednoho souboru na cyklus.

📁 L003 – Soubory přiřazení báze pro cestu 3, agregované do jednoho souboru na cyklus.

📁 L004 – Soubory přiřazení báze pro cestu 4, agregované do jednoho souboru na cyklus.

📁 L001 – Agregovaný soubor *.locs pro cestu 1.

📁 L002 – Agregovaný soubor *.locs pro cestu 2.

📁 L003 – Agregovaný soubor *.locs pro cestu 3.

📁 L004 – Agregovaný soubor *.locs pro cestu 4.

📁 Images

📁 Zaostření

📁 L001 – Zaostření obrazů pro cestu 1.

📁 L002 – Zaostření obrazů pro cestu 2.

📁 L003 – Zaostření obrazů pro cestu 3.

📁 L004 – Zaostření obrazů pro cestu 4.

📁 **InterOp** – Binární soubory použité aplikací Sequencing Analysis Viewer (SAV).

📁 **Logs** (Protokoly) – Soubory protokolů popisující provozní kroky.

📁 **Recipe** (Návod) – Soubor s návodem specifickým pro běh, nazvaný podle ID kazety reagentie.

📁 **RTALogs** – Soubory protokolů popisující analytické kroky.

📄 RTAConfiguration.txt

📄 RunInfo.xml

📄 RunNotes.xml

📄 RunParameters.xml

Výstupní soubory skenování

Typ souboru	Popis souboru, umístění a název
Soubory GTC	Soubor přiřazení genotypů. Soubor GTC se vytváří pro každý vzorek skenovaný na BeadChipu. Název souboru obsahuje čárový kód a skenovaný vzorek. [čárovýkód]_[vzorek].gtc
Soubory obrázků	Soubory obrázků se pojmenovávají na základě oblasti skenované na BeadChipu. Název obsahuje čárový kód, vzorek a část na Beadchipu, záběr a kanál snímání (červený nebo zelený). [čárovýkód]_[vzorek]_[část]_[záběr]_[kamera]_[dlaždice]_[kanál].jpg <ul style="list-style-type: none"> • Čárový kód – Název souboru začíná čárovým kódem BeadChipu. • Vzorek – oblast BeadChipu, která je číslována jako řádek (ROX) odshora dolů a sloupec (COX) zleva doprava. • Část – číslování řádek v rámci vzorku. • Záběr – BeadChipy jsou snímány jako kolekce překrývajících se dlaždic. K sejmutí části se tedy použije pouze 1 záběr. • Kamera – Kamera použitá k sejmutí obrázku. • Dlaždice – Oblast snímání definovaná jako pole pohledu kamery. • Kanál – Kanál je buď červený, nebo zelený.

Struktura výstupní složky skenování

📁 [Datum]_[Název přístroje]_[Sken#]_[Čárový kód]

📁 [Čárový kód]

📁 Config (Konfigurace)

📄 Effective.cfg – Zaznamenává nastavení konfigurace použité během skenu.

📁 Focus (Zaostření) – Obsahuje obrázkové soubory sloužící k zaostření skenu.

📁 Logs (Protokoly) – Obsahuje soubory protokolu popisující jednotlivé kroky provedené během skenování.

📁 PreScanDiagnosticFiles (Diagnostické soubory před skenem)

📁 [Datum_Čas] Barcode Scan (Skenování čárového kódu)

📄 ProcessedBarcode.jpg – obrázek čárového kódu BeadChipu.

📄 Diagnostika skenování (soubory protokolů)

📄 PreScanChecks.csv – Zaznamenává výsledky automatické kontroly.

📄 Soubory GTC – soubory přiřazení genotypů (1 soubor na vzorek).

📄 Soubory IDAT – [Volitelné] soubory dat intenzity (2 soubory na vzorek; 1 na každý kanál).

📄 Soubory obrázků – skenované obrázky pro každý vzorek, část, záběr, kameru, dlaždici a kanál.

📄 [Čárový kód]_sample_metrics.csv

📄 [Čárový kód]_section_metrics.csv

📄 ScanParameters.xml

Rejstřík

A

adaptér
 BeadChip 30
 orientace BeadChipu 28
 přehled 5
aktualizace softwaru 37
algoritmus programu Phred 54
analýza
 výstupní soubory 56
analýza, primární
 čistota signálu 54

B

BaseSpace 1, 49
 ikony přenosu 24
 přihlášení 16
BeadChip
 adaptér 5, 28
 analýza 1
 čárový kód nelze přečíst 45
 orientace čárového kódu 28
 selhání registrace 46
 typy 1
 vložení 30

C

chlornan sodný, mytí 34
Chybová zpráva RAID 47
chyby a varování 4
 ve výstupních souborech 52
chyby kontroly před spuštěním běhu 41
číslování cest 57
číslování dlaždic 58
číslování kamer 58
číslování záběrů 57
čištění spotřebního materiálu 11
cykly ve čtení 13

D

Decode File Client 26
 přístup pomocí BeadChipu 28
 přístup pomocí účtu 27
délka čtení 13-14
dokumentace 2, 65

E

empirické fázování 53

F

fázování, předfázování 53
filtr ryzosti 54
formamid, pozice 6 20

G

generování klastru 23
generování klastrů 13

I

ikony
 chyby a varování 4
 stav 4
informace o indexování 54
intenzity 53

K

kazeta reagensů
 přehled 7
 zásobník č. 28 34
kazeta s pufrům 8, 19
klastry procházející filtrem 54
klávesnice 10
kompatibilita
 průtoková kyveta, kazeta reagensů 5
 sledování pomocí RFID 5
kompatibilita
 sledování pomocí RFID 7
komponenty
 příhrádka na pufr 2
 příhrádka na reagenty 2
 příhrádka pro snímání 2-3
 stavový proužek 2
Konfigurace 49
konfigurace BaseSpace 21
kontrola před spuštěním běhu 22, 30

M

- metrika
 - přiřazení báze 53
- metriky
 - cykly hustoty klastru 23
 - cykly intenzity 23
- metriky běhu 23
- Monitorovací služba Illumina Proactive 49
- mytí
 - automatické 24
 - mycí komponenty 33
 - ruční mytí 33
 - spotřební materiál dodaný uživatelem 33
- mytí přístroje 33

N

- nápověda 2
- nastavení běhu, pokročilá možnost 11
- nastavení konfigurace 47
- nastavení systému 10

O

- omytí po běhu 24
- online školení 2

P

- parametry běhu
 - režim BaseSpace 21
 - samostatný režim 21
 - úprava parametrů 21
- páry cest 57
- pokročilá možnost vložení 11
- pokyny pro vodu laboratorní jakosti 12
- pomoc 65
- pracovní postup
 - BeadChip 30
 - chlornan sodný 34
 - informace o indexování 54
 - kazeta reagensů 19
 - kazeta s pufrem 19
 - kontrola před spuštěním běhu 22, 30
 - metriky běhu 23
 - pokročilá možnost vložení 11
 - přehled 14, 27
 - přihlášení k systému BaseSpace 16
 - příprava průtokové kyvety 15

- průtoková kyveta 16
 - režim BaseSpace 21
 - samostatný režim 21
 - sekvenování 52
 - spotřebované reagensie 17
 - trvání běhu 13-14
- pracovní postup sekvenování 52
- pravděpodobnost chyby 54
- přenos dat
 - ikony aktivity 24
 - run copy service 24
 - skenování dat 32
 - universal copy service 24
- prevence 33
- preventivní údržba 33
- příhrádka na pufr 2
- příhrádka na reagensie 2
- příhrádka pro snímání 2-3
- přiřazení báze 53
 - informace o indexování 54
- přístroj
 - avatar 10
 - indikátory režimu 10
 - nastavení konfigurace 47
 - přezdvíčka 10
 - restart 39
 - spuštění 9
 - tlačítko napájení 4
 - vypnout 39
- procházející filtrem (PF) 54
- průtoková kyveta
 - balení 15
 - číslo záběru 57
 - číslování cest 57
 - číslování dlaždic 58
 - čištění 15
 - dlaždice 56
 - pár cest 6
 - přehled 6
 - rehybridizace 44
 - snímání 58
 - typy 1
 - zarovnávací piny 16

R

- reagensie
 - správná likvidace 19
 - v sadě 5
- rehybridizace primeru 44
- rehybridizace, čtení 1 44

řešení problémů

- kontrola před spuštěním běhu 41
- metriky s nízkou kvalitou 44
- možnosti kontaktu 40
- nahrzení souborů manifestů a klastrů 47
- nelze přečíst čárový kód BeadChipu 45
- selhání registrace skenu 46
- soubory specifické pro běh 40
- soubory specifické pro sken 41
- zásobník na spotřebované reagenty 43
- restart 39
 - přístroj 39
- restart do režimu výzkumu 10
- režim RUO 10
- řídící software 3
- RTA2
 - nakládání s chybami 52
- run copy service 24
- RunInfo.xml 40, 56

S

- samostatná konfigurace 21
- sekvenování
 - úvod 13
 - uživatелеm dodaný spotřební materiál 12
- skóre kvality 54
- sledování pomocí RFID 5
- složka DMAP
 - Decode File Client 26
 - stažení 27
- snímání, dvoukanálové sekvenování 53
- software
 - analýza obrazů, přiřazení báze 3
 - automatická aktualizace 38
 - inicializace 9
 - nastavení konfigurace 47
 - přístrojový 3
 - ruční aktualizace 38
 - trvání běhu 13-14
- software BlueFuse Multi 1
- software Real-Time Analysis 1, 3
 - fázování 53
 - pracovní postup 52
 - výsledky 56
- soubory filtrů 56
- soubory GTC 60
- soubory InterOp 40, 56
- soubory locs 56
- soubory přiřazení bází 56

soubory protokolů

- GlobalLog 52
- LaneNLog 52
- spotřební materiál 5
 - běhy sekvenování 12
 - kazeta reagentů 7
 - kazeta s pufrem 8
 - mycí spotřební materiál 33
 - průtoková kyveta 6
 - spotřební materiál pro mytí 34
 - údržba přístroje 12
 - voda laboratorní jakosti 12
- spotřebované reagenty
 - likvidace 17, 35
 - plný zásobník 43
- stavové výstrahy 4
- stavový proužek 2

T

- technická 65
- technická pomoc 65
- tlačítko napájení 4, 9
- trvání běhu 13-14

U

- údržba 33
- údržba přístroje
 - spotřební materiál 12
- umístění klastru
 - soubory 56
 - vytvoření šablony 52
- umístění složky 21
- upravit přístroj
 - vypnout 39
- uživatелеm dodaný spotřební materiál 12
- uživatelské jméno a heslo 9
- uživatelské jméno a heslo do systému 9

V

- vložení BeadChipu 30
- vstupní soubory, sken
 - složka DMAP 26
 - složka DMAP, stažení 27
 - soubory klastrů 26, 47
 - soubory manifestů 26, 47
- vypínač napájení 9
- vypnutí přístroje 39

výstupní soubory 56
výstupní soubory skenu
 GTC, IDAT 60
výstupní soubory, sekvenování 56
výstupní soubory, sken
 GTC, IDAT 60
vytvoření šablony 52
vzduchový filtr 3, 36

W

Windows
 ukončit 39

Z

zákaznická podpora 65
zvuk 10

Technická pomoc

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

Web: www.illumina.com
E-mail: techsupport@illumina.com

Telefonní čísla na zákaznickou podporu společnosti Illumina

Oblast	Bezplatná linka	Regionální linka
Severní Amerika	+1 800 809 4566	
Austrálie	+1.800.775.688	
Belgie	+32 800 771 60	+32 340 029 73
Čína	400 066 5835	
Dánsko	+45 808 201 83	+45 898 711 56
Finsko	+358 800 918 363	+358 974 790 110
Francie	+33 805 102 193	+33 170 770 446
Hongkong	800960230	
Irsko	+353 180 093 6608	+353 016 950 506
Itálie	+39 800 985 513	+39 236 003 759
Japonsko	0800.111.5011	
Německo	+49 800 101 4940	+49 893 803 5677
Nizozemsko	+31 800 022 2493	+31 207 132 960
Norsko	+47 800 168 36	+47 219 396 93
Nový Zéland	0800.451.650	
Rakousko	+43 800 006 249	+43 192 865 40
Singapur	+1 800 579 2745	
Španělsko	+34 911 899 417	+34 800 300 143
Spojené království	+44 800 012 6019	+44 207 305 7197
Švédsko	+46 850 619 671	+46 200 883 979
Švýcarsko	+41 565 800 000	+41 800 200 442
Tchaj-wan	00806651752	
Ostatní země	+44.1799.534000	

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

Dokumentace k produktu – je k dispozici ke stažení z webu společnosti Illumina ve formátu PDF. Přejděte na web support.illumina.com, vyberte produkt a potom vyberte možnost **Documentation & Literature** (Dokumentace a literatura).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Kalifornie 92122 U.S.A.

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Pouze pro výzkumné účely. Není určeno pro diagnostické postupy.

© 2018 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

illumina®