

# 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 popsanych 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 popsanych 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, AŤ UŽ UŽIVATELŮ ČI JINÝCH OSOB, A POŠKOZENÍ JINÉHO MAJETKU A POVEDE KE ZNEPLATNĚNÍ JAKÉKOLI ZÁRUKY VZTAHUJÍCÍ SE NA PRODUKT.

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

© 2021 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

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

## Historie revizí

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 1000000041922 v03	Říjen 2021	Bylo přidáno upozornění na 7denní časový limit v části Kontroly sekvenčních běhů. Aktualizace pracovního postupu sekvenování přidáním části o vytvoření běhu pomocí softwaru Local Run Manager. Byl změněn limit stability. Byly přidány informace o typu BeachChipu Infinium Methylation EPIC. Aktualizace obrázků ikon na základě změn uživatelského rozhraní.
Dokument č. 1000000041922 v02	Listopad 2020	Aktualizovaný obrázek v části Ruční mytí, aby odpovídal novým mycím kazetám na reagentech a novým mycím kazetám na pufr. Stavový proužek byl aktualizován doplněním dalších barev.
Dokument č. 1000000041922 v01	Březen 2018	Do části Konfigurace nastavení systému 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 .....	1
Součásti přístroje .....	2
Základní informace o sadě reagensů .....	5
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 kyvety .....	15
Příprava knihoven na sekvenování .....	15
Nastavení sekvenačního běhu .....	16
Sledování postupu běhu .....	23
Automatické omytí po běhu .....	24
Kapitola 4 Skenování .....	25
Úvod .....	25
Pracovní postup skenování .....	26
Stažení složky DMAP .....	26
Vložení BeadChipu do adaptéru .....	27
Nastavení skenu .....	28
Sledování postupu skenu .....	30
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 .....	41
Úvod .....	41
Soubory řešení problémů .....	41
Odstranění chyb automatické kontroly .....	42
Zásobník na spotřebované reagenzie je plný .....	44

Pracovní postup rehybridizace .....	44
Chyby BeadChipu a skenování .....	46
Vlastní návody a složky návodů .....	48
Chybová zpráva RAID .....	48
Konfigurace nastavení systému .....	48
Příloha B Analýza v reálném čase .....	53
Přehled softwaru Real-Time Analysis .....	53
Pracovní postup softwaru Real-Time Analysis .....	54
Příloha C Výstupní soubory a složky .....	57
Výstupní soubory sekvenování .....	57
Struktura výstupní složky .....	60
Výstupní soubory skenování .....	61
Struktura výstupní složky skenování .....	61
Rejstřík .....	63
Technická pomoc .....	67

# Kapitola 1 Přehled

Popis této příručky .....	1
Úvod .....	1
Další zdroje .....	1
Součásti přístroje .....	2
Základní informace o sadě reagentů .....	5
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

### Funkce sekvenování

- ▶ **Vysoce výkonné sekvenování** – Diagnostický nástroj NextSeq™ 550Dx umožňuje sekvenovat knihovny DNA.
- ▶ **Analýza v reálném čase (software Real-Time Analysis, RTA)** – Provádí zpracování obrazu a přiřazení báze. Další informace naleznete v části *Analýza v reálném čase na straně 53*.
- ▶ **Možnost datové analýzy přímo v přístroji** – Analytické moduly softwaru Analysis Software určené pro běh mohou analyzovat data běhu.
- ▶ **Dva operační systémy („Dual Boot“)** – Diagnostický nástroj NextSeq 550Dx obsahuje samostatné pevné disky, které podporují diagnostický (Dx) a výzkumný (RUO) režim.

### 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, Infinium MethylationEPIC 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>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. 1000000030332)</i>	Obsahuje informace o čtečce RFID v přístroji, certifikace souladu s předpisy a informace o bezpečnosti.
<i>Referenční příručka pro režim výzkumu přístroje NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000041922)</i>	Obsahuje pokyny pro obsluhu přístroje a postupy při řešení problémů. Určeno k použití s přístrojem NextSeq 550Dx v režimu výzkumu spolu se softwarem NextSeq Control Software (NCS) v3.0.
<i>Systémová příručka přístroje NextSeq 550 (dokument č. 15069765)</i>	Obsahuje pokyny pro obsluhu přístroje a postupy při řešení problémů. Určeno pro práci s přístrojem NextSeq 550Dx v režimu výzkumu se softwarem NextSeq Control Software (NCS) verze 4.0 nebo novější.
<i>Systémová příručka přístroje NextSeq 550</i>	Obsahuje přehled součástí přístroje, návod k jeho použití a postupy údržby a řešení problémů.
<i>Nápověda k softwaru BaseSpace</i>	Obsahuje informace o používání systému BaseSpace™ Sequence Hub a dostupných možnostech analýzy.

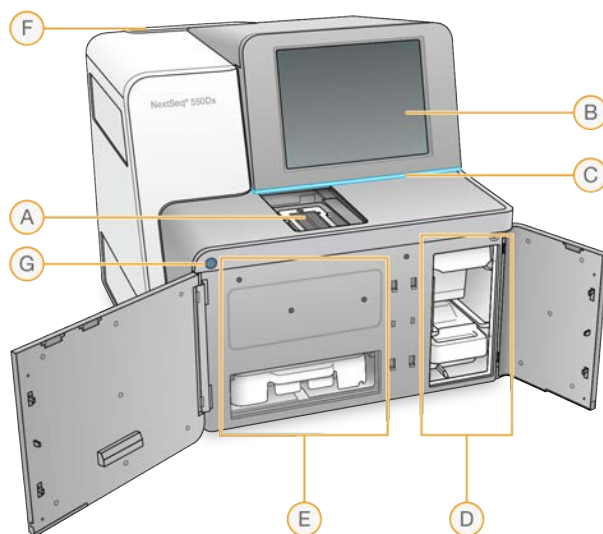
Na [stránce podpory přístroje NextSeq 550Dx](#) na webu společnosti Illumina naleznete dokumentaci, odkazy ke stažení softwaru, online školení a odpovědi na nejčastější dotazy.

Na [stránkách podpory systému NextSeq 550Dx](#) na webu společnosti Illumina naleznete dokumentaci, odkazy na 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 **Příhrádka pro snímání** – V průběhu sekvenačního běhu uchovává průtokovou kyvetu.
- B **Dotyková obrazovka** – Umožňuje nastavit a konfigurovat přístroj přes rozhraní obslužného softwaru.
- C **Stavový proužek** – Zobrazuje stav přístroje jako provádějící zpracování (modrá), vyžadující pozornost (oranžová), připravený k sekvenování (zelená), inicializace (střídající se modrá a bílá), ještě neproběhla inicializace (bílá) nebo vyžaduje mytí do 24 hodin (žlutá).
- D **Příhrádka na pufr** – Slouží k uchování kazety s pufrům a zásobníku na spotřebované reagentie.
- E **Příhrádka na reagentie** – Slouží k uložení kazety reagentií.
- 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.

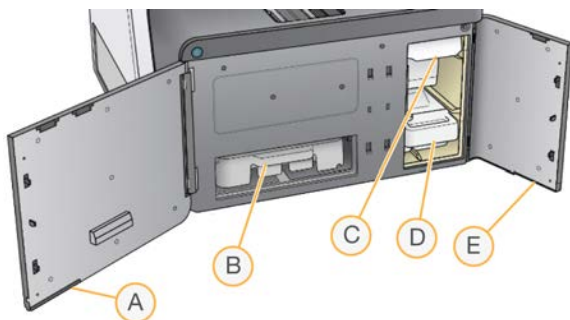
## Příhrádka pro snímání

V přihrádce pro snímání se nachází snímací prostor, který obsahuje tři zarovnávací piny pro umístění průtokové kyvety. Po vložení průtokové kyvety se dvířka přihrádky pro snímání automaticky uzavřou a komponenty se přesunou na svá místa.

## Příhrádky na reagentie a pufr

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

Obrázek 2 Příhrádky na reagentie a pufr



- A **Dvířka přihrádky na reagentie** – Přihrádka na reagentie se zavírá západkou vpravo pod dvířky. V přihrádce na reagentie se nachází kazeta reagentií.
- B **Kazeta reagentií** – Kazeta reagentií je předem naplněna jednorázovým spotřebním materiálem.
- C **Kazeta s pufrům** – Kazeta s pufrům je předem naplněna jednorázovým spotřebním materiálem.
- D **Zásobník na spotřebované reagentie** – Zde se po každém běhu shromáždí spotřebované reagentie určené k likvidaci.
- E **Dvířka přihrádky na pufr** – Přihrádka 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.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS)** – Řídící software vás provádí postupem nastavení sekvenačního běhu.
- ▶ **Software Real-Time Analysis (RTA)** – Software RTA provádí analýzu obrazů 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 *Analýza v reálném čase na straně 53*.

## Stavové ikony

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

Stavová ikona	Název stavu	Popis
	Stav OK	System je normální.
	Zpracování	System 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 prvním zapnutí přístroje naleznete v části *Spuštění přístroje na straně 9*.

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

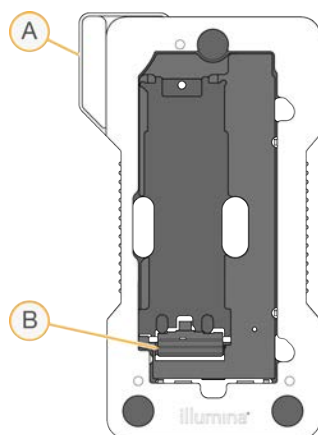
Stav napájení	Akce
Napájení přístroje je vypnuto	Přístroj zapnete stisknutím tlačítka.
Napájení přístroje je zapnuto	Přístroj vypnete stisknutím tlačítka. Na obrazovce se zobrazí dialogové okno, ve kterém je třeba potvrdit vypnutí přístroje.
Napájení přístroje je zapnuto	Přidržíte-li tlačítko napájení 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

## Základní informace o sadě reagentů

### Přehled spotřebního materiálu pro sekvenování

Spotřební materiál pro sekvenování, který je zapotřebí pro běh NextSeq 550Dx, je poskytován zvlášť v jednorázové sadě. Každá sada obsahuje jednu průtokovou kyvetu, kazetu reagentů, kazetu s pufrům a pufr pro ředění knihovny. Bližší informace viz příložená dokumentace k produktu *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 cyklů)*, *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cyklů)* nebo *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 cyklů)*.

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

## UPOZORNĚNÍ

Sady reagensů NextSeq 550Dx High Output Reagent verze 2.5 vyžadují NOS 1.3 nebo novější, aby přístroj přijal kazetu průtokové kyvety verze 2.5. Před přípravou vzorků a spotřebního materiálu proveďte aktualizace softwaru, abyste zabránili plýtvání reagensy nebo materiálem.



## POZNÁMKA

Před použitím uchovávejte spotřební materiál pro sekvenování v příslušných krabicích.

## Označení kompatibility sady

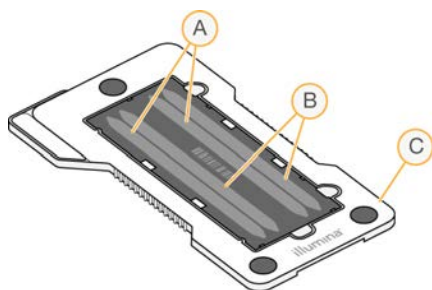
Komponenty sady jsou označeny barevně kódovanými indikátory, které znázorňují kompatibilitu mezi průtokovými kyvetami a kazetami reagensů. Vždy používejte kompatibilní kazetu reagensů a průtokovou kyvetu. Kazeta s pufrům je univerzální.

Každá průtoková kyveta a kazeta reagensů 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.

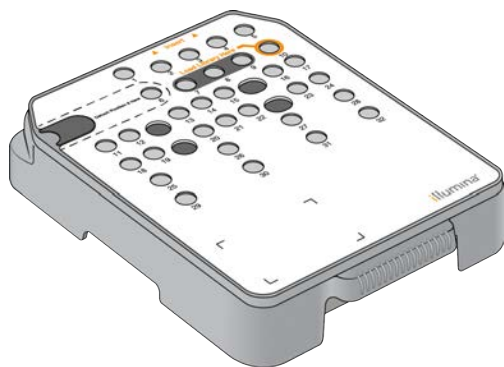
Přestože průtoková kyveta obsahuje čtyři cesty, sekvenuje se na ní pouze jediná knihovna nebo sada knihoven sloučených ve fondu. Knihovny jsou vloženy do kazety s reagenty z jednoho zásobníku a automaticky přeneseny na všechny čtyři cesty průtokové kyvety.

Každá cesta je snímána po malých částech, které se nazývají dlaždice. Další informace naleznete v části *Dlaždice průtokové kyvety na straně 57*.

## Základní informace o kazetě reagentů

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

Obrázek 5 Kazeta reagentů



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

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 reagenty.



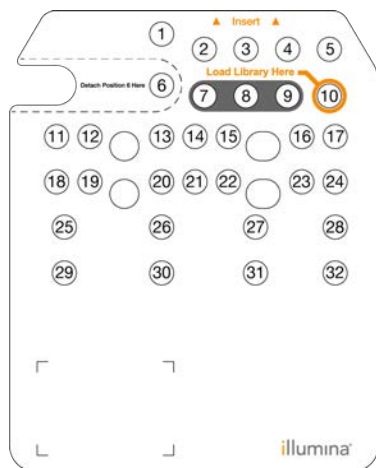
### VAROVÁNÍ

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. S použitými reagenty nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi.

Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete na bezpečnostních listech (SDS) na stránce [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## Vyhrazené zásobníky

Obrázek 6 Číslované zásobníky



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

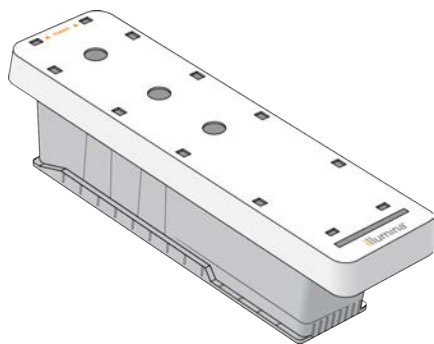
### Vyjímatelný zásobník na pozici č. 6

Předem naplněná kazeta zahrnuje denaturační reagensii na pozici 6, která obsahuje formamid. Zásobník na pozici 6 je vyjímatelný, aby bylo možné po sekvenačním běhu snáze zlikvidovat nepoužité reagensie. 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



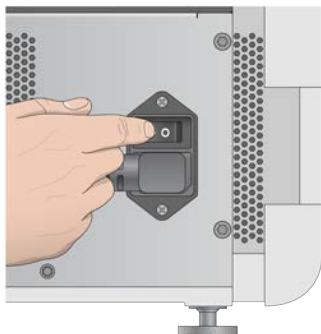
# Kapitola 2 Začínáme

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

## Spuštění přístroje

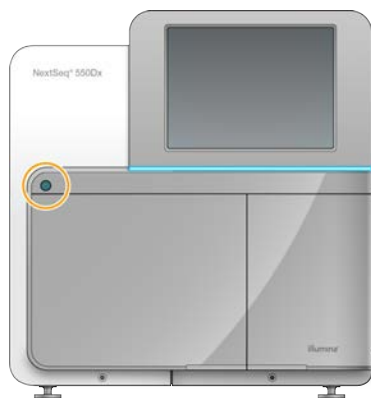
Vypínač napájení přepněte do polohy I (zapnuto).

**Obrázek 8** Vypínač napájení umístěný vzadu na přístroji



- 1 Stiskněte tlačítko napájení nad přihrádkou na reagenzie. Tímto tlačítkem zapnete přístroj a spustíte s ním spojený počítač a software.

**Obrázek 9** Tlačítko napájení umístěné vpředu na přístroji



- 2 Počkejte, až se načte operační systém.  
Software NextSeq Control Software (NCS) se spustí a inicializuje systém automaticky. Po skončení inicializace se objeví domovská obrazovka.
- 3 Zadejte své uživatelské jméno a heslo do softwaru Local Run Manager.  
Bližší informace o heslech naleznete v části *Uživatelská hesla na straně 1*. Bližší informace o nastavení účtu v softwaru Local Run Manager naleznete v části *Nastavení a úlohy správy na straně 1*.
- 4 Zvolte možnost **Login** (Přihlášení).  
Otevře se domovská obrazovka s ikonami pro sekvenování, program Local Run Manager, úpravy přístroje, a provedení mytí.

## Indikátory režimu přístroje

Výchozí režim přístroje NextSeq 550Dx je režim diagnostický. Následující údaje na obrazovce systému NOS představují režim přístroje.

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

## Přizpůsobení systémového nastavení

Obslužný software zahrnuje přizpůsobitelná nastavení systému pro identifikaci přístroje, předvolby vstupu, nastavení zvuku a umístění výstupní složky. Pokyny pro změnu nastavení konfigurace sítě najdete v kapitole *Konfigurace nastavení systému na straně 48*.

Možnosti přizpůsobení:

- ▶ Přizpůsobení identifikace přístroje (Avatar a přezdívka)
- ▶ Nastavení možnosti vstupu a zvukového indikátoru
- ▶ Úprava možností nastavení běhu
- ▶ Možnosti vypnutí
- ▶ Konfigurace spuštění přístroje po kontrole chyb před spuštěním
- ▶ Volba, zda se budou údaje o výkonu přístroje zasílat společnosti Illumina
- ▶ Výběr výstupní složky běhu

## Přizpůsobení avataru a přezdívky přístroje

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

## Nastavení možnosti klávesnice a zvukového indikátoru

- 1 Na domovské obrazovce vyberte možnost **Manage Instrument** (Upravit přístroj).
- 2 Vyberte možnost **System Customization** (Přizpůsobení systému).
- 3 Zaškrtnutím políčka **Use on-screen keyboard** (Použít klávesnici na obrazovce) použijete jako vstupní zařízení přístroje klávesnici na obrazovce.
- 4 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

- 5 Pomocí možnosti **Save** (Uložit) uložte nastavení a pokračujte na obrazovce dále.

## Úprava možností nastavení běhu

- 1 Na obrazovce Manage Instrument (Upravit přístroj) vyberte možnost **System Customization** (Přizpůsobení systému).
- 2 Zaškrtnutím políčka **Use Advanced Load Consumables** (Použit 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 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

S přístrojem NextSeq 550Dx se používá následující spotřební materiál a vybavení. Při přípravě spotřebního materiálu, sekvenování a údržbě systému se používá následující spotřební materiál a vybavení. Více informací naleznete v *příručce systému NextSeq 550*.

## Spotřební materiál pro sekvenování

Spotřební materiál	Dodavatel	Účel
Čisticí ubrousky se 70% isopropyl alkoholem nebo Ethanol, 70 %	VWR, katalogové číslo 95041-714 (nebo ekvivalentní) Dodavatel běžného laboratorního vybavení	Čištění průtokové kvety a obecné použití
Laboratorní utěrky, netkané	VWR, katalogové číslo 21905-026 (nebo ekvivalentní)	Čištění průtokové kvety a obecné použití



## Spotřební materiál pro údržbu a řešení problémů

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

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.

## Analýza

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

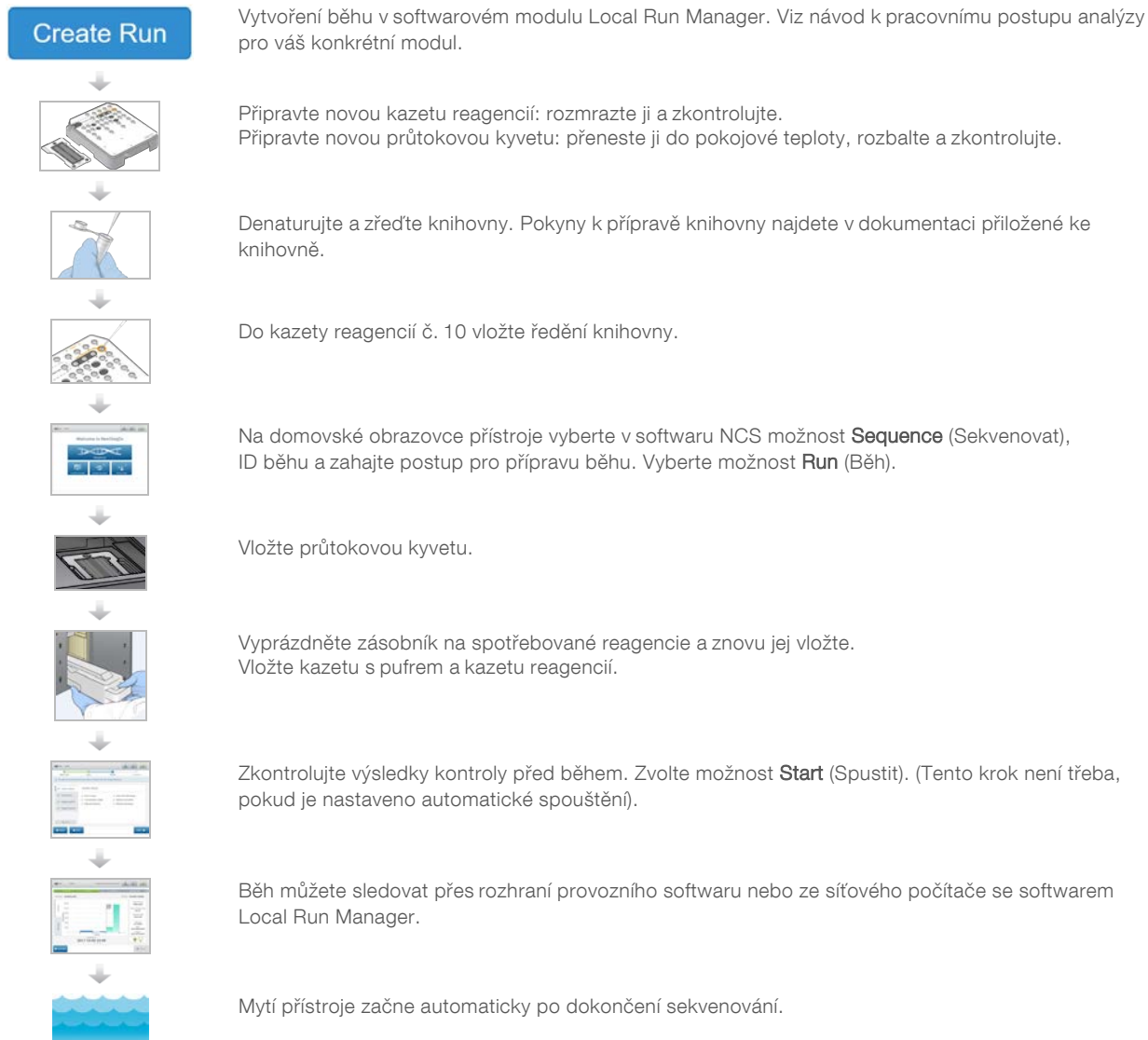
## Trvání sekvenačního běhu

Trvání sekvenačního běhu závisí na počtu provedených cyklů. Maximální délka běhu je běh s párovými konci o 150 cyklech, které se čtou jednotlivě ( $2 \times 150$ ) 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 ( $2 \times 151$ ), takže celkem 302 cyklů. Na konci běhu bude analyzováno  $2 \times 150$  cyklů. Cyklus navíc je zapotřebí pro výpočty fázování a předfázování.

## Pracovní postup sekvenování



## Příprava kazety reagensů

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

- 1 Ze skladovacích prostor s teplotou od  $-25\text{ °C}$  do  $-15\text{ °C}$  vyjměte kazetu reagensů.
- 2 Některou z následujících metod reagentie rozmrazte. Kazetu neponořujte. Po rozmrazení kazetu vysušte a teprve potom pokračujte na další krok.

Teplota	Doba rozmrazování	Limit stability
Vodní lázeň ( $15\text{ °C}$ až $30\text{ °C}$ )	60 minut	Nesmí přesáhnout 6 hodin
$2\text{ °C}$ až $8\text{ °C}$	7 hodin	Nesmí přesáhnout 7 dnů

**POZNÁMKA** Pokud se ve stejné vodní lázni rozmrazuje více než jedna kazeta, provádějte rozmrazování po delší dobu.

- 3 Pětkrát kazetu obraťte nahoru a dolů, aby se promíchaly reagenty.
- 4 Zkontrolujte dno kazety, zda se reagenty řádně rozmrazily a neobsahují žádné sraženiny. Zaměřte se zvláště na pozice 29, 30, 31 a 32, neboť jsou největší a jejich rozmrazení tvá 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. S použitými reagenty nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi.

Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete na bezpečnostních listech (SDS) na stránce [support.illumina.com/sds.html](http://support.illumina.com/sds.html).

## **Příprava průtokové kyvety**

- 1 Ze skladových prostor s teplotou 2–8 °C vyjměte krabici s novou průtokovou kyvetou.
- 2 Sejměte balící fólii a krabici 30 minut ponechte při pokojové teplotě.

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

## **Příprava knihoven na sekvenování**

Denaturujte a zředte knihovny na objem pro vložení 1,3 ml. V praxi může být koncentrace pro vložení různá podle přípravy knihovny a kvantifikačních metod. Ředění vzorků knihoven závisí na tom, nakolik komplexní jsou fondy oligonukleotidů. Pokyny k přípravě vzorků knihovny pro sekvenování včetně ředění a vkládání do fondu naleznete v návodu k použití sady pro přípravu příslušné knihovny. Na přístroji NextSeq 550Dx je třeba optimalizovat hustotu klastru.

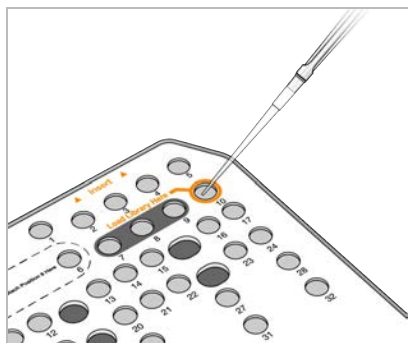
## **Denaturace a zředění knihoven**

Denaturujte a zředte 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 k přípravě knihovny najdete v dokumentaci přiložené ke knihovně.

## **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 1 ml pipety.
- 3 1,3 ml připravených knihoven vložte do zásobníku č. 10 označeného jako **Load Library Here** (Sem vložte knihovnu). Při rozptylování knihoven se nedotýkejte těsnicí fólie.

**Obrázek 10** Vložení knihoven



## Nastavení sekvenačního běhu

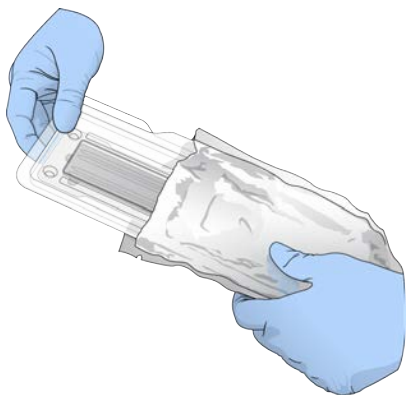
### Přihlášení do systému BaseSpace

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

### Vložení průtokové kyvety

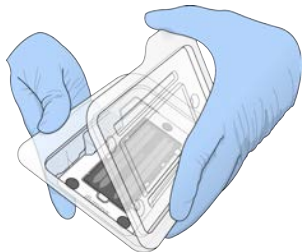
- 1 Odstraňte průtokovou kyvetu z předchozího běhu.
- 2 Z obalové fólie vyjměte průtokovou kyvetu.

**Obrázek 11** Odstraňte obalovou fólii



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

**Obrázek 12** Odstraňte obalové pouzdro

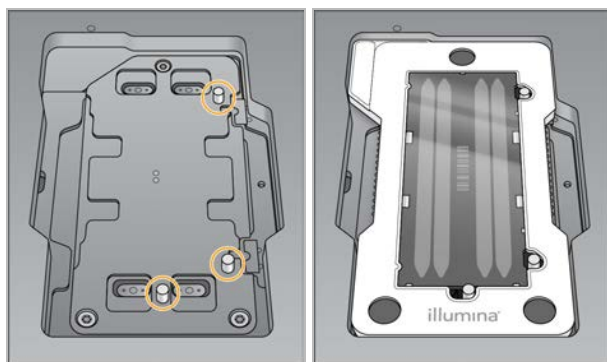


- 4 Ubruskem, který nepouští vlákna a je napuštěn alkoholem, vyčistěte skleněný povrch průtokové kyvety. Sklo osušte laboratorní utěrkou nepouštějící vlákna.

**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 přidržujte i zespodu druhou rukou.

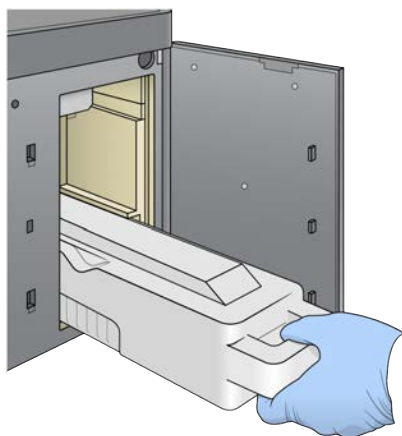


#### **VAROVÁNÍ**

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. S použitými reagenty nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi. Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete na bezpečnostních listech (SDS) na stránce [support.illumina.com/sds.html](https://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.

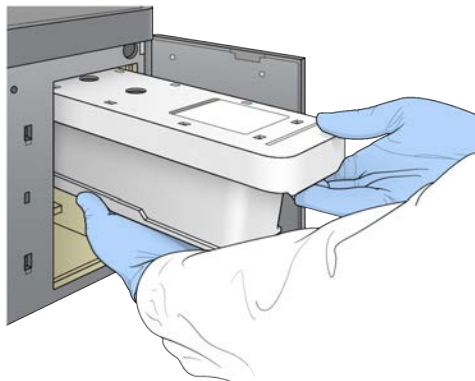
**Obrázek 15** Vložení zásobníku na spotřebované reagentie



## 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

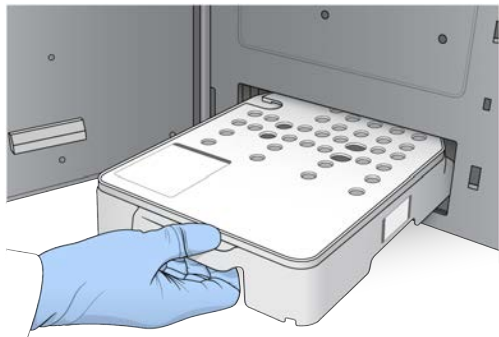
Tato sada reagensů obsahuje potenciálně nebezpečné chemické látky. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagenziemi nakládejte 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](https://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 reagensů

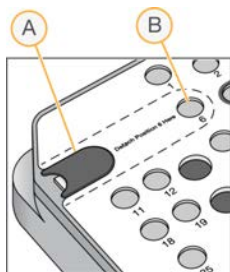


- 4 Zvolte možnost **Load** (Vložit).  
Software kazetu automaticky nastaví do správné pozice (zhruba 30 s), na obrazovce se objeví ID kazety a proběhne kontrola senzorů.
- 5 Vyberte možnost **Next** (Další).

## Odstranění použitého zásobníku na pozici č. 6

- 1 Jakmile z přístroje vyjmete kazetu s **použitou** reagensií, 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 reagentů 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.
  - ▶ **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.
- 4 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 rozevíracím 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**  – Kontrola proběhla.
- ▶ **Červený křížek**  – Kontrola neproběhla. V případě, že některé položky neprošly kontrolou, je třeba zásahu uživatele. Bližší informace naleznete v části *Odstranění chyb automatické kontroly na straně 42*.

Chcete-li zastavit probíhající kontrolu před spuštěním běhu, vyberte 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 Category (Kategorie).

Není-li přístroj nakonfigurován tak, aby se běh spustil automaticky, spusťte běh po dokončení automatické kontroly před spuštěním běhu.

## 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*.



### UPOZORNĚNÍ

Dbejte, abyste zůstali přihlášení do systému Windows. Pokud se v průběhu sekvenčního běhu ze systému Windows odhlásíte, běh se zastaví.

**POZNÁMKA** Nepoužívané reagensie nemohou v přístroji zůstat déle než 24 hodin.

## Sledování postupu běhu

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









**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	Local Run Manager	Výstupní složka
Připojeno		
Připojeno a probíhá přenos dat		
Odpojeno		
Zakázáno		

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, před zahájením dalšího běhu přeneste data ručně z počítače přístroje.

## Universal Copy Service

NextSeq 550Dx obsahuje službu Universal Copy Service. RTA2 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 sekvenačního běhu zahájí software automatické omytí po běhu, a to pomocí mycího roztoku, který se nachází v kazetě s puřem, a NaOCl, který se nachází v kazetě reagentů.

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.

# Kapitola 4 Skenování

Úvod .....	25
Pracovní postup skenování .....	26
Stažení složky DMAP .....	26
Vložení BeadChipu do adaptéru .....	27
Nastavení skenu .....	28
Sledování postupu skenu .....	30

## 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.

Provedte 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 26.

## 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 Spusťte 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 Spusťte 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 19** Vložení BeadChipu do adaptéru



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

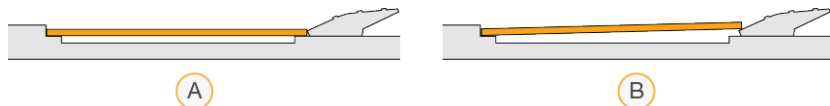
**Obrázek 20** Usazení a zabezpečení BeadChipu





- 4 Jemným uvolněním zadržující svorky BeadChip zabezpečte.
- 5 Zkontrolujte BeadChip z bočního pohledu, abyste se ujistili, že je v adaptéru usazen rovně. V případě potřeby upravte pozici BeadChipu.

**Obrázek 21** 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

- 1 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 reagensí a kazety pufru.

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



### VAROVÁNÍ

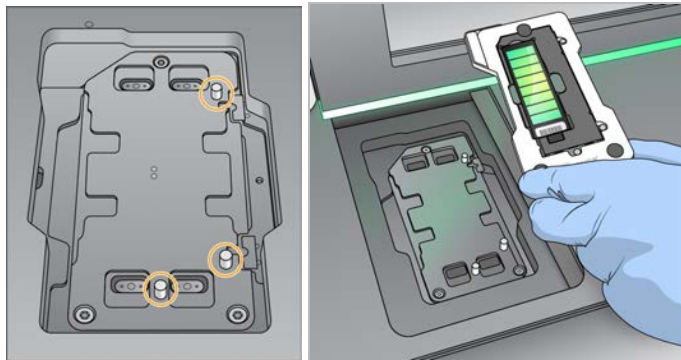
Tato sada reagensí obsahuje potenciálně nebezpečné chemické látky. Vdechováním, požitím, stykem s kůží a vniknutím do očí může dojít k poranění. Používejte ochranné pomůcky včetně ochranných brýlí, rukavic a laboratorního pláště, které jsou adekvátní pro možná rizika. S použitými reagentiemi nakládejte 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](https://support.illumina.com/sds.html).

- 2 Vyjměte průtokovou kyvetu z přihrádky pro snímání.
- 3 Zavřete dvířka přihrádky na reagentie a přihrádky na pufr.

## Vložení adaptéru BeadChipu

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

**Obrázek 22** Vložení adaptéru BeadChipu



- 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 46*.
- 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** ✅ – Kontrola proběhla.
- ▶ **Červený křížek** ❌ – Kontrola neproběhla. V případě, že některé položky neprošly kontrolou, je třeba zásahu uživatele. Bližší informace naleznete v části *Odstranění chyb automatické kontroly na straně 42*.

Chcete-li zastavit probíhající kontrolu před spuštěním běhu, vyberte 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 Category (Kategorie).

Není-li přístroj nakonfigurován tak, aby se běh spustil automaticky, spusťte běh po dokončení automatické kontroly před spuštěním běhu.

## Spuštění skenu

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

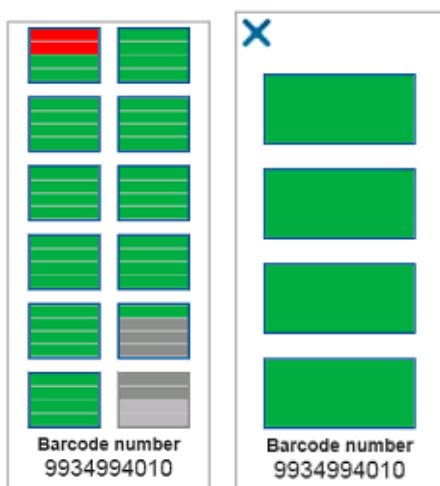
Bližší informace o konfiguraci systému a automatickém spuštění skenu po úspěšné kontrole naleznete v části *Úprava možností nastavení běhu na straně 11*.

## 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 23** 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 61*.

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 výměnu vzduchového filtru. Také popisují možnosti vypnutí a restartu přístroje.

- ▶ **Promývání přístroje** – Automatické promytí přístroje po každém sekvenačním běhu pomáhá udržovat přístroj v provozu. Za určitých okolností je však třeba provést i ruční mytí. Viz *Ruční mytí na straně 33*.
- ▶ **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.

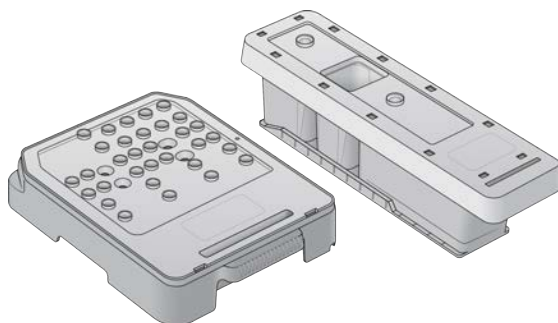
## Ruční mytí

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

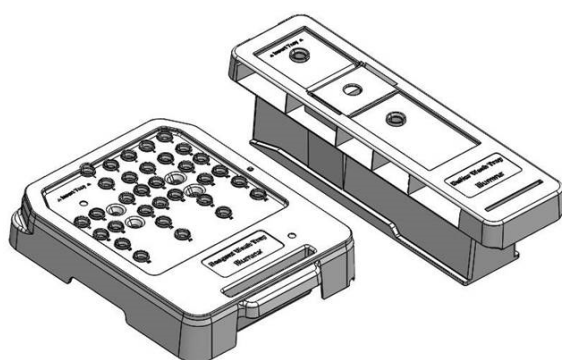
Typy mytí	Popis
Rychlé mytí Trvání: 20 minut	Propláchně systém mycím roztokem dodaným uživatelem. Roztok se skládá z vody laboratorní jakosti a prostředku Tween 20 (mycí kazeta s puřrem). <ul style="list-style-type: none"><li>• Pokud je přístroj nečinný a kazeta reagensů a kazeta s puřrem jsou na místě, je třeba toto mytí provádět každých 14 dní.</li><li>• Je-li přístroj v suchém stavu (kazety reagensů a s puřrem jsou odstraněny), je třeba toto mytí provádět každých 7 dní.</li></ul>
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 % chlornanu 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 24** Původní mycí kazeta reagensů a mycí kazeta s pufrem.



**Obrázek 25** Nová mycí kazeta reagensů a mycí kazeta s pufrem.



## Příprava ručního mytí po skončení běhu

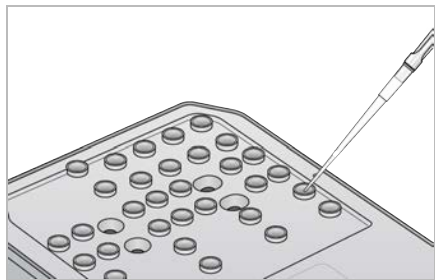
Rozhodněte se, zda připravíte ruční mytí po skončení běhu, které je popsáno níže, nebo zda zvolíte rychlé mytí (následující část). Chcete-li provést ruční mytí po skončení běhu, přeskočte část věnovanou rychlému mytí a pokračujte k části *Vložení použité průtokové kyvety a mycích kazet na straně 35*.

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)
- Obraťte 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:
  - Původní mycí kazeta s pufrem
    - ▶ 100% Tween 20 (62 µl)
    - ▶ Voda laboratorní jakosti (125 ml)
    - ▶ Do prostředního zásobníku mycí kazety s pufrem přidejte 125 ml mycího roztoku.
  - Nová mycí kazeta s pufrem
    - ▶ 100% Tween 20 (75 µl)
    - ▶ Voda laboratorní jakosti (150 ml)
    - ▶ Do prostředního zásobníku mycí kazety s pufrem přidejte 150 ml mycího roztoku.
- 5 Zvolte možnost **Perform Wash** (Provést mytí) a poté **Manual Post-Run Wash** (Ruční mytí po skončení běhu).

## Příprava rychlého mytí

Níže popsaným 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 Voda laboratorní jakosti	Použito k vytvoření 40 ml 0,05% mycího roztoku Tween 20 Vloženo do mycí kazety s pufrem (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 pufrem 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 reagenty a obsah zlikvidujte podle zavedených předpisů.



#### 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. S použitými reagenty nakládejte jako s chemickým odpadem a zlikvidujte je v souladu se zákony a normami platnými ve vaší zemi. Další informace týkající se ochrany životního prostředí, zdraví a bezpečnosti práce naleznete na bezpečnostních listech (SDS) na stránce [support.illumina.com/sds.html](https://support.illumina.com/sds.html).

- 3 Prázdný zásobník na spotřebované reagenty zasuňte nadoraz do přihrádky na pufr.
- 4 Pokud v přihrádce zůstala použitá kazeta s pufrem z předchozího běhu, vyjměte ji.
- 5 Vložte mycí kazetu s pufrem, která obsahuje mycí roztok.
- 6 Pokud v přihrádce zůstala použitá kazeta reagentů z předchozího běhu, vyjměte ji.
- 7 Vložte mycí kazetu reagentů.
- 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

Nové systémy se dodávají se třemi náhradními vzduchovými filtry. Ty by měly být uloženy a použity, když přístroj vyzve k výměně filtru.

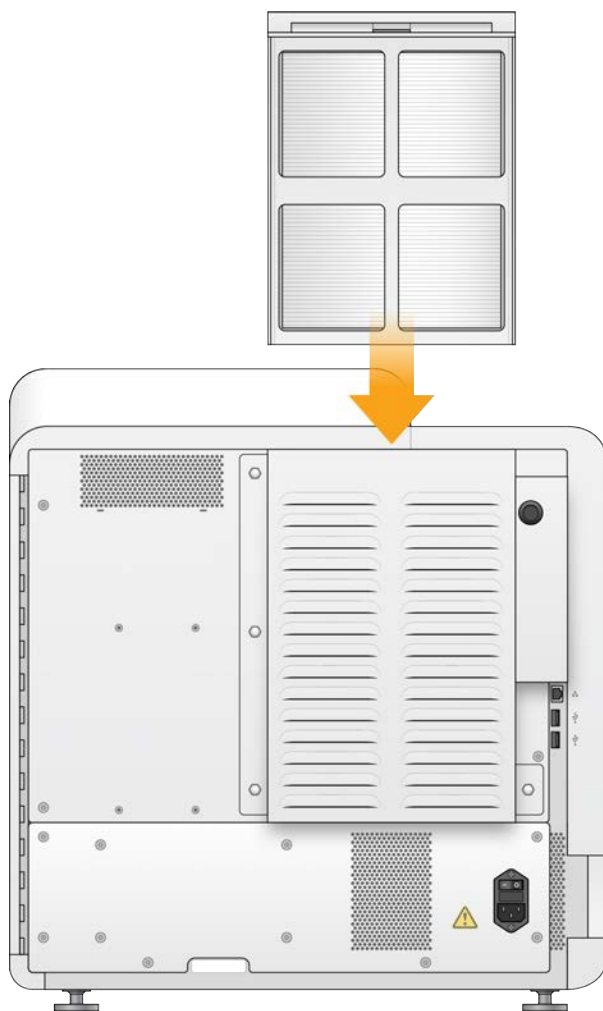
Vzduchový filtr zajišťuje správnou cirkulaci vzduchu v přístroji. Každých 90 dnů zobrazí software upozornění, že je třeba tento filtr vyměnit. Pokud se objeví toto upozornění, zvolte buď možnost **Remind in 1 day** (Připomenout o den později), nebo se řiďte následujícím postupem a vyberte možnost **Filter 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. Proto dbejte, aby byl 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) spusťte 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 Reboot / Shutdown (Restartovat/vypnout) zpřístupňuje tyto funkce:

- ▶ Reboot to RUO (Restartovat do režimu RUO) – Příklad se spustí v režimu výzkumu.
- ▶ Restart (Restartovat) – Příklad se spustí v diagnostickém režimu.
- ▶ Restart to Dx from RUO (Restartovat z výzkumného do diagnostického režimu) – Příklad se spustí v diagnostickém režimu.
- ▶ Shutdown (Vypnout) – Po opětovném zapnutí se přístroj spustí v diagnostickém režimu.
- ▶ 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 **Reboot / Shutdown** (Restartovat/vypnout).
- 3 Vyberte **Restart** (Restartovat).

## Vypnutí přístroje

- 1 Vyberte **Manage Instrument** (Upravit přístroj).
- 2 Vyberte **Reboot / Shutdown** (Restartovat/vypnout).
- 3 Zvolte možnost **Shutdown** (Vypnout).  
Příkazem Shutdown (Vypnout) bezpečně ukončíte software a vypnete 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. Do systému Windows se může vrátit pouze uživatel s oprávněním správce.

- 1 Vyberte **Manage Instrument** (Upravit přístroj).
- 2 Vyberte **Reboot / Shutdown** (Restartovat/vypnout).
- 3 Vyberte **Exit to Windows** (Skončit a přejít do systému Windows).



# Příloha A Řešení problémů

Úvod .....	41
Soubory řešení problémů .....	41
Odstranění chyb automatické kontroly .....	42
Zásobník na spotřebované reagenty je plný .....	44
Pracovní postup rehybridizace .....	44
Chyby BeadChipu a skenování .....	46
Vlastní návody a složky návodů .....	48
Chybová zpráva RAID .....	48
Konfigurace nastavení systému .....	48

## Úvod

V případě problémů v oblasti kvality nebo výkonnosti běhu se obraťte na technickou podporu společnosti Illumina. Podrobnosti naleznete v části *Technická pomoc na straně 67*.

## 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"><li>• Název běhu</li><li>• Počet cyklů v běhu</li><li>• Počet cyklů v každém čtení</li><li>• Zda je čtení indexovaným čtením</li><li>• Počet záběrů a dlaždic na průtokové kyvetě</li></ul>
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. 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 protokolů chyb (*ErrorLog*.txt)	Protokoly RTA	Protokol chyb RTA. Soubory protokolů chyb se aktualizují vždy, když dojde k chybě.
Soubory globálních protokolů (*GlobalLog*.tsv)	Protokoly RTA	Protokol všech událostí RTA. Soubory globálních protokolů se aktualizují během běhu.
Soubory protokolů cesty (*LaneLog*.txt)	Protokoly RTA	Protokoly RTA o událostech při zpracování. Soubory protokolů cesty 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 nevytvoří. 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 překrývání jednotlivých dlaždic.

## Odstranění chyb automatické kontroly

Pokud při automatické kontrole dojde k chybám, použijte následující doporučené kroky k jejich odstranění.

### Kontroly sekvenčních běhů

Pokud se nezdaří kontrola před spuštěním běhu, RFID kazety reagencí se neuzamkne a kazetu bude možné použít při následujícím běhu. Během inicializace řídicího softwaru, která může být nutná k vyřešení chyby, však dojde k uzamknutí RFID průtokové kyvety, kazety reagencí a kazety s pufrem. Před restartem systému musí uživatel z přístroje vyjmout průtokovou kyvetu, kazetu reagencí a kazetu s pufrem. RFID se navíc po propíchnutí těsnicí fólie uzamknou. Po načtení RFID průtokové kyvety softwarem se spustí 7hodinový časový limit, po kterém bude průtoková kyveta považována za uzamčenou a nepoužitelnou.

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 <b>Back</b> (Zpět) vraťte na krok vkládání a zopakujte nastavení běhu.
Required Software (Požadovaný software)	Chybí zásadně důležité součásti softwaru. Obratě se na technickou podporu společnosti Illumina.
Instrument Disk Space (Místo na disku přístroje)	Na pevném disku přístroje není dostatek místa k provedení běhu. Možná se nepřenese data z běhu předchozího. Vymažte data běhu z pevného disku přístroje.

Kontroly systému	Doporučený postup
Network Connection (Připojení k síti)	Síťové připojení bylo přerušeno. Zkontrolujte stav sítě i fyzické připojení k síti.
Network Disk Space (Místo na síťovém disku)	Síťový server je plný.
Teplota	Doporučený postup
Temperature (Teplota)	Obratě se na technickou podporu společnosti Illumina.
Temperature Sensors (Teplotní senzory)	Obratě se na technickou podporu společnosti Illumina.
Fans (Ventilátory)	Obratě se na technickou podporu společnosti Illumina.
Systém snímání	Doporučený postup
Imaging Limits (Limity snímání)	Obratě se na technickou podporu společnosti Illumina.
Z Steps-and-Settle	Obratě se na technickou podporu společnosti Illumina.
Bit Error Rate (Bitová chybovost)	Obratě 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"> <li>Na obrazovkách nastavení běhu se volbou <b>Back</b> (Zpět) vraťte ke kroku týkajícímu se průtokové kyvety. Dvířka přihrádky pro snímání se otevřou.</li> <li>Vyjměte a znovu vložte průtokovou kyvetu. Zkontrolujte, zda je správně usazena.</li> </ul>
Dodávka reagensů	Doporučený postup
Valve Response (Reakce ventilu)	Obratě se na technickou podporu společnosti Illumina.
Pump (Čerpadlo)	Obratě se na technickou podporu společnosti Illumina.
Buffer Mechanism (Mechanismus pufru)	Obratě 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 <b>Back</b> (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.



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.

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.
Auto-Center (Automatické vycentrování)	Vyjměte adaptér skenu BeadChip. Ujistěte se, že je BeadChip usazen v adaptéru, a poté adaptér znovu vložte.

## Zásobník na spotřebované reagensie je plný

Každý běh zahajujte s prázdným zásobníkem na spotřebované reagensie.

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 reagensie

- 1 Zvolte možnost **Raise Sippers** (Zdvihnout nasávací trubičky).
- 2 Vyjměte zásobník na spotřebované reagensie 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 reagensů. 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 puřem a kazetu reagensů 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 reagensí a kazetu s pufrům 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 reagensí.
- 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 pufrům a kazetu reagensí.
- 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:

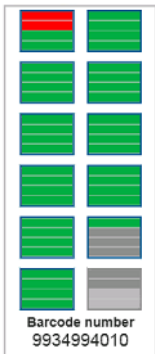
- ▶ Vyberte možnost **Rescan** (Přeskenovat). Software se pokusí přečíst čárový kód znovu.
- ▶ Vyberte textové pole a zadejte číselný čárový kód, jak je ukázáno na obrázku. V závislosti na BeadChipu může mít číslo čárového kódu až 12 číslic. Vyberte možnost **Save** (Uložit). Obrázek čárového kódu se 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](http://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 případě, 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. Na varování pole RAID může reagovat pouze správce. Budete-li používat přístroj pouze s jedním pevným diskem, můžete přijít o data.

## 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.

## Nastavení konfigurace sítě

- 1 Na obrazovce úprav přístroje zvolte možnost **System Configuration** (Konfigurace systému).
- 2 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.
- 3 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.
- 4 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.

- 5 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.
- 6 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** (Použití 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** (Použití 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 **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Odesílat výkonnostní údaje přístroje do společnosti 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.
    - ▶ Funkce je ve výchozím nastavení vypnutá. Chcete-li se přihlásit k této službě, povolte nastavení **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Odesílat výkonnostní údaje 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 Analýza v reálném čase

Přehled softwaru Real-Time Analysis .....	53
Pracovní postup softwaru Real-Time Analysis .....	54

## 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 provozní 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.

## 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 kvetě.
- ▶ Soubor `RTA.exe.config`, což je soubor softwarové konfigurace ve formátu XML.

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

## Výstupní soubory modulu RTA2

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

Typ souboru	Popis
Soubory přiřazení báze	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 klastr 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 klastr prochází filtry.
Soubory umístění klastrů	Soubory umístění klastrů (*.locs) obsahují koordináty X a Y pro každý klastr v dlaždici. Soubor umístění klastrů se vytváří pro 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 klastrů pro danou dlaždici.

RTA2 poskytuje metriku kvality běhu v reálném čase, kterou ukládá v podobě souborů InterOp. Soubory InterOp jsou binárním výstupem obsahujícím metriky dlaždice, cyklu a úrovně čtení.

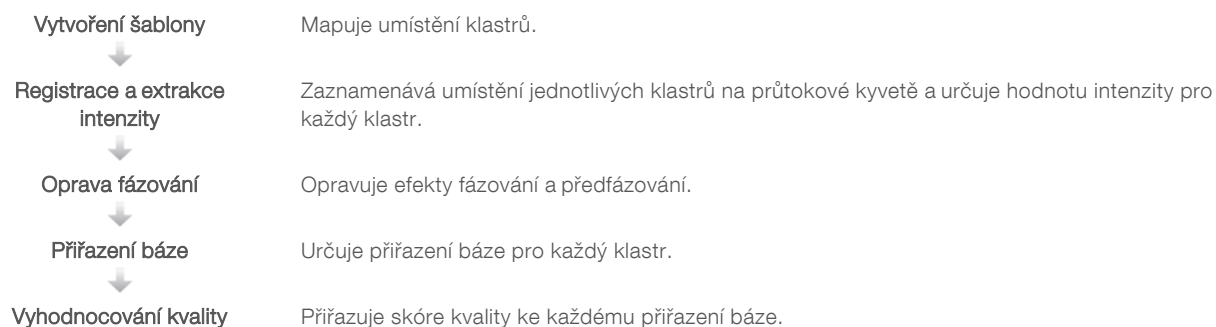
## Nakládání s chybami

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.
- ▶ \*LaneNLog\*.tsv obsahuje události při zpracování příslušné cesty.
- ▶ \*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 souřadnic 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 RTA2, 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 zarovná 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.

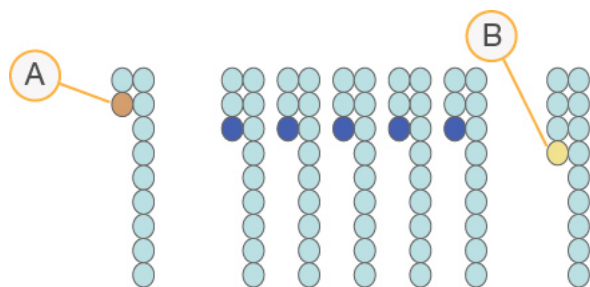
Pokud se u některých obrazů v cyklu registrace nezdaří, pro dotyčnou dlaždici v cyklu se nevytvoří žádná přiřazení databáze.

### 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 s bází, která fázuje.
- B Čtení s bází, která předfázuje.

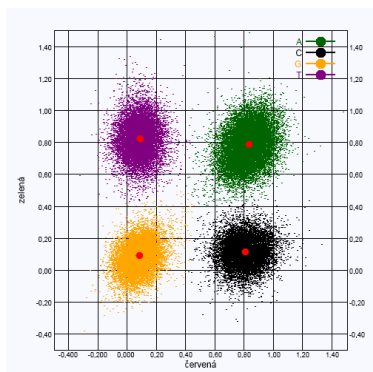
Modul RTA2 opravuje účinky fázování a předfázování, což maximalizuje kvalitu dat v každém cyklu během běhu.

## 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 Přiřazení 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 projdou filtrem (PF), když v prvních 25 cyklech maximálně jedno přiřazení báze nedosáhne ryzosti < 0,63. Na klastry, které filtrem neprojdou, se nepoužije přiřazení báze.

## 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)
<b>Q20</b>	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 indicií použije k vyhledání skóre kvality v tabulce kvality. Tabulky kvality jsou vytvořeny tak, aby poskytovaly optimálně přesné předpovědi kvality pro běhy generované prostřednictvím specifické konfigurace platformy pro sekvenování a verze chemického složení.

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

# Příloha C Výstupní soubory a složky

Výstupní soubory sekvenování .....	57
Struktura výstupní složky .....	60
Výstupní soubory skenování .....	61
Struktura výstupní složky skenování .....	61

## Výstupní soubory sekvenování

Typ souboru	Popis souboru, umístění a název
Soubory přiřazení báze	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 klastru pro každou cestu. Soubory umístění klastrů jsou výsledkem vytváření šablony. Data\Intensities\L00[X] – soubory jsou uloženy v jedné složce pro každou cestu. s_[cesta].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. 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.

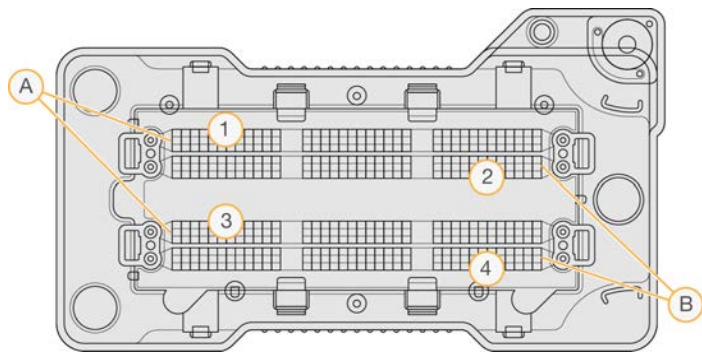
Tabulka 2 Dlaždice průtokové kyvety

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

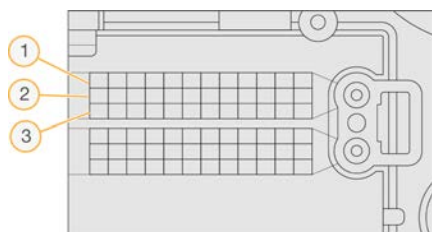


- A Pár cest A – cesty 1 a 3
- B Pár cest B – cesty 2 a 4

## 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

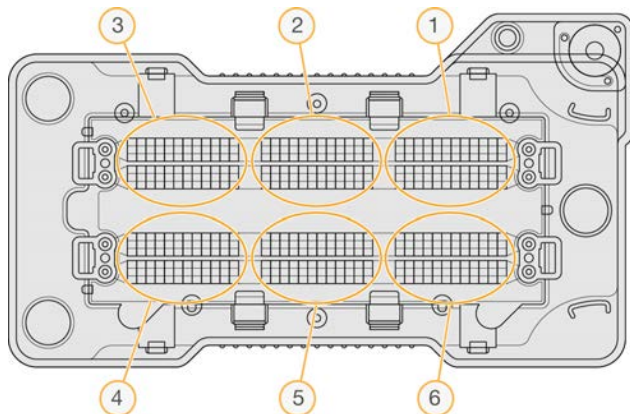


## Číslování kamery

Přístroj NextSeq 550Dx používá ke snímání průtokové kvyety 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.

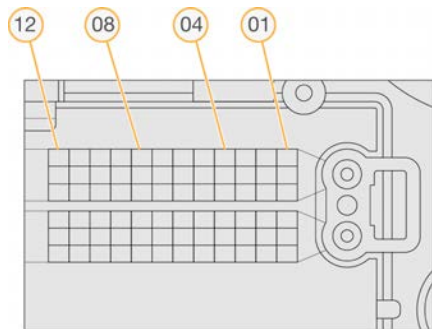
**Obrázek 33** Kamera a číslování segmentů (Zobrazena průtoková kvjeta s vysokým výkonem)



## 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 57](#).



## Struktura výstupní složky

Provozní software vytváří název výstupní složky automaticky.

### 📁 Data

#### 📁 Intenzity

##### 📁 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

#### 📁 Zaostrění

📁 L001 – Zaostrění obrazů pro cestu 1.

📁 L002 – Zaostrění obrazů pro cestu 2.

📁 L003 – Zaostrění obrazů pro cestu 3.

📁 L004 – Zaostrění obrazů pro cestu 4.

### 📁 InterOp – Binární soubory

📁 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.

📄 RTAComplete.txt

📄 RTAConfiguration.xml

📄 RunInfo.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. <b>[čárovýkód]_[vzorek].gtc</b>
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). <b>[čárovýkód]_[vzorek]_[část]_[záběr]_[kamera]_[dlaždice]_[kanál].jpg</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Čárový kód</b> – Název souboru začíná čárovým kódem BeadChipu.</li> <li>• <b>Vzorek</b> – oblast BeadChipu, která je číslovaná jako řádek (R0X) odshora dolů a sloupec (C0X) zleva doprava.</li> <li>• <b>Část</b> – číslovaný řádek v rámci vzorku.</li> <li>• <b>Záběr</b> – BeadChipy jsou snímány jako kolekce překrývajících se dlaždic. K sejmutí části se tedy použije pouze 1 záběr.</li> <li>• <b>Kamera</b> – Kamera použitá k sejmutí obrázku.</li> <li>• <b>Dlaždice</b> – Oblast snímání definovaná jako pole pohledu kamery.</li> <li>• <b>Kanál</b> – Kanál je buď červený, nebo zelený.</li> </ul>

## Struktura výstupní složky skenování

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

📁 [Čárový kód]

📁 **Config** (Konfigurace)

📄 Effective.cfg – Zaznamenává nastavení konfigurace použitá 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 29
  - orientace BeadChipu 27
  - přehled 5
- aktualizace softwaru 37
- algoritmus programu Phred 56
- analýza
  - výstupní soubory 57
- analýza, primární
  - čistota signálu 56

## B

- BaseSpace 49
  - přihlášení 16
- BeadChip
  - adaptér 5, 27
  - analýza 1
  - čárový kód nelze přečíst 46
  - orientace čárového kódu 27
  - selhání registrace 46
  - typy 1
  - vložení 29

## C

- cykly ve čtení 13

## Č

- číslování cest 58
- číslování dlaždic 59
- číslování kamer 59
- číslování záběrů 58
- čištění spotřebního materiálu 11

## D

- Decode File Client 25
  - přístup pomocí BeadChipu 27
  - přístup pomocí účtu 26
- délka čtení 13-14
- dokumentace 1, 67

## E

- empirické fázování 54

## F

- fázování, předfázování 54
- filtr ryzosti 56
- formamid, pozice 6 20

## G

- generování klastru 23
- generování klastrů 13

## C

- chlornan sodný, mytí 34

## C

- Chybová zpráva RAID 48

## C

- chyby a varování 4

## C

- chyby a výstrahy 53

## C

- chyby kontroly před spuštěním běhu 42

## I

- ikony
  - chyby a varování 4
  - stav 4
- informace o indexování 56
- intenzity 55

**K**

- kazeta reagensů
  - přehled 7
  - zásobník č. 28 34
  - zásobník č. 6 20
- kazeta s pufrům 8, 19
- klastry procházející filtrem 56
- klávesnice 10
- kompatibilita
  - průtoková kyveta, kazeta reagensů 5
  - sledování pomocí RFID 5, 7
- komponenty
  - příhrádka na pufr 3
  - příhrádka na reagensie 3
  - příhrádka pro snímání 3
  - stavový proužek 3
- Konfigurace 49
- konfigurace BaseSpace 21
- kontrola před spuštěním běhu 22, 29

**M**

- metrika
  - přiřazení báze 55
- 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 1
- nastavení běhu, pokročilá možnost 11
- nastavení konfigurace 48
- nastavení systému 10

**O**

- omytí po běhu 24
- online školení 1

**P**

- parametry běhu
  - režim BaseSpace 21
  - samostatný režim 21
  - úprava parametrů 21
- páry cest 58
- pokročilá možnost vložení 11
- pokyny pro vodu laboratorní jakosti 12
- pomoc 67
- pracovní postup
  - BeadChip 29
  - chlornan sodný 34
  - informace o indexování 56
  - kazeta reagensů 19
  - kazeta s pufrům 19
  - kontrola před spuštěním běhu 22, 29
  - metriky běhu 23
  - pokročilá možnost vložení 11
  - průtoková kyveta 16
  - přehled 14, 26
  - přihlášení k systému BaseSpace 16
  - příprava průtokové kyvety 15
  - režim BaseSpace 21
  - samostatný režim 21
  - sekvenování 54
  - spotřebované reagensie 17
  - trvání běhu 13-14
- pracovní postup sekvenování 14, 54
- pravděpodobnost chyby 56
- prevence 33
- preventivní údržba 33
- procházející filtrem (PF) 56
- průtoková kyveta
  - balení 15
  - číslo záběru 58
  - číslování cest 58
  - číslování dlaždic 59
  - čištění 15
  - dlaždice 57
  - pár cest 6
  - přehled 6
  - rehybridizace 44
  - snímání 59
  - zarovnávací piny 16
- přenos dat
  - skenování dat 31
  - universal copy service 23
- příhrádka na pufr 3
- příhrádka na reagensie 3
- příhrádka pro snímání 3

- přiřazení báze 55
  - informace o indexování 56
- přístroj
  - avatar 10
  - indikátory režimu 10
  - nastavení konfigurace 48
  - přezdívká 10
  - restart 39
  - spuštění 9
  - tlačítko napájení 4
  - vypnout 39

## R

- reagencie
  - správná likvidace 19
  - v sadě 5
- rehybridizace primeru 44
- rehybridizace, čtení 1 44
- restart 39
  - přístroj 39
- restart do režimu výzkumu 10
- režim RUO 10
- RunInfo.xml 41, 57

## Ř

- řešení problémů
  - kontrola před spuštěním běhu 42
  - metriky s nízkou kvalitou 44
  - nahrazení souborů manifestů a klastrů 47
  - nelze přečíst čárový kód BeadChipu 46
  - selhání registrace skenu 46
  - soubory specifické pro běh 41
  - soubory specifické pro sken 42
  - zásobník na spotřebované reagencie 44
- řídící software 4

## S

- samostatná konfigurace 21
- sekvenování
  - úvod 13
  - uživatelé dodaný spotřební materiál 11
- skóre kvality 56
- sledování pomocí RFID 5
- složka DMAP
  - Decode File Client 25
  - stažení 26
- snímání, dvoukanálové sekvenování 55

- software
  - analýza obrazů, přiřazení báze 4
  - automatická aktualizace 38
  - inicializace 9
  - nastavení konfigurace 48
  - přístrojový 4
  - ruční aktualizace 38
  - trvání běhu 13-14
- software BlueFuse Multi 1
- software Real-Time Analysis 4
  - fázování 54
  - pracovní postup 54
  - výsledky 57
- soubory filtrů 57
- soubory GTC 61
- soubory InterOp 41, 57
- soubory locs 57
- soubory přiřazení bází 57
- spotřební materiál 5
  - běhy sekvenování 11
  - 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 reagencie
  - likvidace 17, 35
  - plný zásobník 44
- stavové výstrahy 4
- stavový proužek 3

## T

- technická 67
- technická pomoc 67
- tlačítko napájení 4, 9
- trvání běhu 13-14

## U

- údržba 33
- údržba přístroje
  - spotřební materiál 12
- umístění klastru
  - soubory 57
  - vytvoření šablony 54
- umístění složky 21
- Universal Copy Service 23

- upravit přístroj
  - vypnout 39
  - vypnutí 39
- uživatelé dodaný spotřební materiál 11-12
- uživatelské jméno a heslo 9
- uživatelské jméno a heslo do systému 9

## V

- vložení BeadChipu 29
- vstupní soubory, sken
  - složka DMAP 25
  - složka DMAP, stažení 26
  - soubory klastrů 25, 47
  - soubory manifestů 25, 47
- vypínač napájení 9
- vypnutí přístroje 39
- výstupní soubory 57
- výstupní soubory skenu
  - GTC, IDAT 61
- výstupní soubory, sekvenování 57
- výstupní soubory, sken
  - GTC, IDAT 61
- vytvoření šablony 54
- vzduchový filtr 3, 36

## W

- Windows
  - ukončení 39

## Z

- zákaznická podpora 67
- zvuk 10

# Technická pomoc

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

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

Telefonní čísla na 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, Čína	800960230	
Irsko	+353 180 093 6608	+353 016950506
Itálie	+39 800 985 513	+39 236 003 759
Japonsko	0800.111.5011	
Jižní Korea	+82 80 234 5300	
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	
Spojené království	+44 800 012 6019	+44 207 305 7197
Španělsko	+34 911 899 417	+34 800 300 143
Švédsko	+46 850 619 671	+46 200 883 979
Švýcarsko	+41 565 800 000	+41 800 200 442
Taiwan, Čína	00806651752	
Ostatní země	+44.1799.534000	

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

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







Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Kalifornie 92122 U.S.A.

+1 800 809 ILMN (4566)

+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

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

© 2021 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

**illumina®**