

NextSeq 550Dx s istraživačkim načinom rada

Referentni priručnik za instrument



Ovaj dokument i njegov sadržaj vlasništvo su tvrtke Illumina, Inc. i njezinih povezanih društava („Illumina”) te su namijenjeni isključivo za ugovornu upotrebu klijentima u vezi s proizvodima opisanim u njemu. Dokument i njegov sadržaj ne smiju se upotrebljavati ni distribuirati ni u koju drugu svrhu niti se smiju na neki drugi način prenositi, otkrivati ili reproducirati bez prethodnog pisanog odobrenja tvrtke Illumina. Illumina ovim dokumentom ne prenosi nikakve licence zaštićene svojim pravom na patent, žig, autorskim pravom ili običajnim pravom ni slična prava bilo koje treće strane.

Kvalificirano i odgovarajuće obučeno osoblje mora se strogo i bez iznimki pridržavati uputa u ovom dokumentu da bi se zajamčila pravilna i sigurna upotreba proizvoda opisanih u njemu. Prije upotrebe proizvoda nužno je s razumijevanjem pročitati cjelokupan sadržaj dokumenta.

AKO UPUTE U DOKUMENTU NE PROČITATE U CIJELOSTI TE IH SE NE PRIDRŽAVATE BEZ IZNIMKI, MOŽE DOĆI DO OŠTEĆENJA PROIZVODA, OZLJEDA KORISNIKA ILI DRUGIH OSOBA I DO OŠTEĆENJA DRUGE IMOVINE TE SE TIME PONIŠTAVAJU SVA JAMSTVA ZA PROIZVODE.

ILLUMINA NE PREUZIMA ODGOVORNOST ZA ŠTETE NASTALE USLIJED NEPRAVILNE UPOTREBE PROIZVODA KOJI SU OPISANI U OVOM DOKUMENTU (UKLJUČUJUĆI DIJELOVE TIH PROIZVODA I SOFTVER).

© 2021. Illumina, Inc. Sva prava pridržana.

Svi su žigovi vlasništvo tvrtke Illumina, Inc. i njezinih vlasnika. Konkretno informacije o žigovima potražite na adresi www.illumina.com/company/legal.html.

Povijest revizija

| Dokument | Datum | Opis promjene |
|-------------------------------------|-------------------|--|
| Broj dokumenta 1000000041922 v03 | listopad 2021. | U odjeljak Provjere za obrade sekvenciranjem dodana je obavijest o 7-dnevnom mjeracu vremena. Ažuriran je odjeljak Tijek rada sekvenciranja dodavanjem dijela o stvaranju obrade pomoću softvera Local Run Manager. Promijenjeno ograničenje stabilnosti Dodan Infinium Methylation EPIC u vrste pločica BeadChip Ažurirane slike ikona tako da odražavaju promjene u korisničkom sučelju. |
| Broj dokumenta 1000000041922 v02 | studeni 2020. | Ažurirana slika u odjeljku Izvođenje ručnog ispiranja tako da prikazuje nove spremnike reagensa za ispiranje i pufera za ispiranje. Ažurirane informacije o statusnoj traci dodatnim bojama. |
| Broj dokumenta 1000000041922 v01 | ožujak 2018. | U odjeljak Prilagodba postavki sustava dodane su informacije o servisu za nadzor Illumina Proactive. |
| Broj dokumenta 1000000041922 v00 | studeni 2017. | Početno izdanje. |

Sadržaj

| | |
|--|----|
| Poglavlje 1 Pregled | 1 |
| O ovom priručniku | 1 |
| Uvod | 1 |
| Dodatni resursi | 2 |
| Dijelovi instrumenta | 3 |
| Pregled kompleta s reagensima | 6 |
| Pregled potrošnog materijala za sekvenciranje | 6 |
| | |
| Poglavlje 2 Početak rada | 11 |
| Uključivanje instrumenta | 11 |
| Prilagodba postavki sustava | 12 |
| Potrošni materijal i oprema koju mora pribaviti korisnik | 13 |
| | |
| Poglavlje 3 Sekvenciranje | 15 |
| Uvod | 15 |
| Tijek rada sekvenciranja | 16 |
| Priprema spremnika reagensa | 16 |
| Priprema protočnog članka | 17 |
| Priprema biblioteka za sekvenciranje | 17 |
| Postavljanje obrade sekvenciranjem | 18 |
| Praćenje napretka obrade | 25 |
| Automatsko ispiranje nakon obrade | 26 |
| | |
| Poglavlje 4 Skeniranje | 27 |
| Uvod | 27 |
| Tijek rada skeniranja | 28 |
| Preuzimanje mape DMAP | 28 |
| Umetanje pločice BeadChip u prilagodnik | 29 |
| Postavljanje skeniranja | 30 |
| Praćenje napretka skeniranja | 32 |
| | |
| Poglavlje 5 Održavanje | 35 |
| Uvod | 35 |
| Provođenje ručnog ispiranja | 35 |
| Zamjena filtra za zrak | 38 |
| Ažuriranja softvera | 39 |
| Mogućnosti ponovnog pokretanja i isključivanja | 41 |
| | |
| Dodatak A Otklanjanje poteškoća | 43 |
| Uvod | 43 |
| Otklanjanje poteškoća s datotekama | 43 |
| Rješavanje pogrešaka automatske provjere | 44 |
| Spremnik potrošenih reagensa je pun | 46 |

| | |
|--|----|
| Tijek rada ponovne hibridizacije | 46 |
| BeadChip i pogreške u skeniranju | 48 |
| Prilagođeni recepti i mape s receptima | 50 |
| Poruka o pogrešci RAID-a | 50 |
| Konfiguracija postavki sustava | 50 |
| | |
| Dodatak B Real-Time Analysis | 55 |
| Pregled softvera Real-Time Analysis | 55 |
| Tijek rada softvera Real-Time Analysis | 56 |
| | |
| Dodatak C Izlazne datoteke i mape | 59 |
| Izlazne datoteke pri sekvenciranju | 59 |
| Struktura izlazne mape | 61 |
| Izlazne datoteke pri skeniranju | 62 |
| Struktura izlazne mape pri skeniranju | 63 |
| | |
| Kazalo | 65 |
| | |
| Tehnička pomoć | 69 |

Poglavlje 1 Pregled

| | |
|---|---|
| O ovom priručniku | 1 |
| Uvod | 1 |
| Dodatni resursi | 2 |
| Dijelovi instrumenta | 3 |
| Pregled kompleta s reagensima | 6 |
| Pregled potrošnog materijala za sekvenciranje | 6 |

O ovom priručniku

U ovom se referentnom priručniku za instrument navode upute za upotrebu instrumenta NextSeq 550Dx u istraživačkom načinu rada (RUO).

Uvod

Značajke sekvenciranja

- ▶ **Sekvenciranje velikog kapaciteta** – instrument NextSeq™ 550Dx omogućuje sekvenciranje DNA biblioteka.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** – izvodi obradu slika i otkrivanje baza. Da biste saznali više, pročitajte odjeljak *Real-Time Analysis* na stranici 55.
- ▶ **Sposobnost analize podataka na instrumentu** – moduli za analizu softvera Analysis Software navedeni za obradu mogu analizirati podatke dobivene odradom.
- ▶ **Podizanje sustava u dva načina** – instrument NextSeq 550Dx ima zasebne diskovne pogone koji podržavaju dijagnostički (Dx) i istraživački (RUO) način rada.

Značajke skeniranja mrežice

- ▶ **Skeniranje mrežice integrirano u kontrolni softver** – instrument NextSeq 550Dx omogućuje prijelaz sa skeniranja mrežica na sekvenciranje uz veliku količinu podataka i obratno na istom instrumentu uz upotrebu istog kontrolnog softvera.
- ▶ **Unaprijeđene mogućnosti snimanja** – sustav za snimanje instrumenta NextSeq 550Dx obuhvaća softver i izmjene postolja koji omogućuju snimanje većih površina radi skeniranja pločica BeadChip.
- ▶ **Vrsta pločice Beadchip** – među kompatibilnim su vrstama pločice BeadChip CytoSNP-12, CytoSNP-850K, Infinium MethylationEPIC i Karyomap-12.
- ▶ **Prilagodnik za BeadChip** – prilagodnik za BeadChip namijenjen ponovnoj upotrebi omogućuje lako umetanje pločica BeadChip u instrument.
- ▶ **Analiza podataka** – pomoću softvera BlueFuse® Multi analizirajte podatke iz mrežice.

Dodatni resursi

Na web-mjestu tvrtke Illumina za preuzimanje je dostupna sljedeća dokumentacija.

| Resurs | Opis |
|--|---|
| <i>Vodič za pripremu mjesta za instrument NextSeq 550Dx (broj dokumenta: 100000009869)</i> | Sadrži specifikacije laboratorijskog prostora, potrebne specifikacije električne mreže i mjere zaštite okoliša. |
| <i>Vodič za sigurnost i sukladnost instrumenta NextSeq 550Dx (br. dokumenta 100000009868)</i> | Navodi informacije o sigurnosnim napomenama, izjavama o sukladnosti i oznakama na instrumentu. |
| <i>Vodič za sukladnost RFID čitača (br. dokumenta 1000000030332)</i> | Navodi informacije o RFID čitaču koji je dio instrumenta, certifikatima o sukladnosti i sigurnosnim napomenama. |
| <i>Referentni vodič za instrument NextSeq 550Dx s istraživačkim načinom rada (br. dokumenta 1000000041922)</i> | Navodi upute za korištenje instrumenta i postupke otklanjanja poteškoća. Namijenjeno korištenju s instrumentom NextSeq 550Dx s istraživačkim načinom rada sa softverom NextSeq Control Software (NCS) v3.0. |
| <i>Vodič za sustav NextSeq 550 (br. dokumenta 15069765)</i> | Navodi upute za korištenje instrumenta i postupke otklanjanja poteškoća. Namijenjeno korištenju s instrumentom NextSeq 550Dx u načinu za istraživanje sa softverom NextSeq Control Software (NCS) v4.0 ili novijim. |
| <i>Vodič za sustav NextSeq 550</i> | Donosi pregled komponenti instrumenta, upute za korištenje instrumenta te postupke održavanja i otklanjanja poteškoća. |
| <i>Pomoć za BaseSpace</i> | Donosi informacije o korištenju servisa BaseSpace™ Sequence Hub i dostupnim mogućnostima analize. |

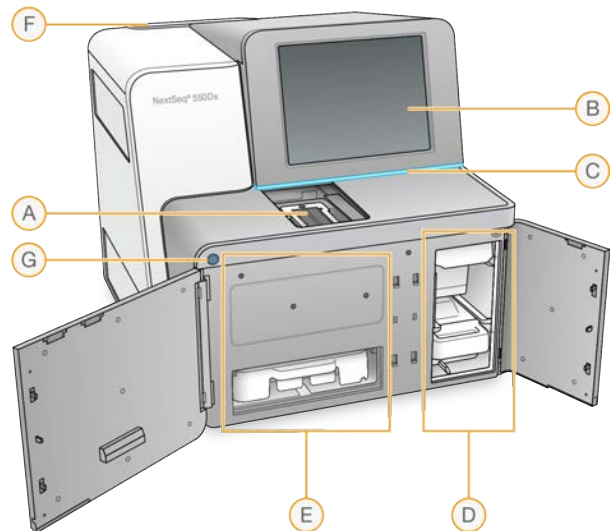
Posjetite [stranicu s podrškom za instrument NextSeq 550Dx](#) na web-mjestu tvrtke Illumina da biste pristupali dokumentaciji, preuzimanjima softvera, obuci putem interneta i odgovorima na česta pitanja.

Posjetite [stranice za podršku instrumenta NextSeq 550Dx](#) na web-mjestu tvrtke Illumina da biste pristupili dokumentaciji, preuzimanjima softvera, mrežnoj obuci i najčešćim pitanjima.

Dijelovi instrumenta

Instrument NextSeq 550Dx sastoji se od monitora s dodirnim zaslonom, trake statusa i 4 odjeljka.

Slika 1 Dijelovi instrumenta



- A **Odjeljak za snimanje** – u njemu se nalazi protočni članak tijekom obrade sekvenciranjem.
- B **Monitor s dodirnim zaslonom** – omogućuje konfiguraciju i postavljanje na instrumentu putem sučelja operacijskog softvera.
- C **Traka statusa** – ukazuje na status instrumenta, primjerice obrada u tijeku (plavo), potrebno je obratiti pažnju (narančasto), spremno za sekvenciranje (zeleno), inicijaliziran (izmjena plavog i bijelog), još nije inicijaliziran (bijelo) ili nužno je ispiranje u naredna 24 sata (žuto).
- D **Odjeljak za pufer** – sadrži spremnik pufera i spremnik potrošenih reagensa.
- E **Odjeljak za reagense** – sadrži spremnik reagensa.
- F **Odjeljak s filtrom za zrak** – sadrži filter za zrak. Filtru pristupajte sa stražnje strane instrumenta.
- G **Gumb za uključivanje/isključivanje** – uključuje ili isključuje instrument i računalo instrumenta.

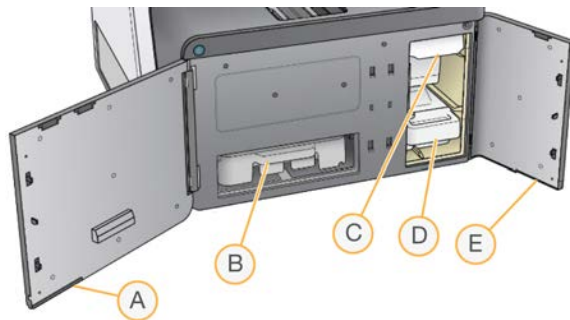
Odjeljak za snimanje

U odjeljku za snimanje nalazi se postolje s trima polugicama za poravnavanje kojima se namješta protočni članak. Nakon umetanja protočnog članka vratašca odjeljka za snimanje automatski se zatvaraju, a komponente sjedaju na svoje mjesto.

Odjeljci za reagense i pufer

Za postavljanje obrade sekvenciranjem na instrumentu NextSeq 550Dx potreban je pristup odjeljcima za reagense i pufer kako bi se umetnuo potrošni materijal i ispraznio spremnik potrošenih reagensa.

Slika 2 Odjeljci za reagens i pufer



- A **Vrata odjeljka za reagens** – zatvaraju odjeljak za reagente zasunom smještenim u donjem desnom dijelu vrata. U odjeljku za reagens nalazi se spremnik reagensa.
- B **Spremnik reagensa** – spremnik reagensa unaprijed je napunjen potrošni materijal za jednokratnu upotrebu.
- C **Spremnik pufera** – spremnik pufera unaprijed je napunjen potrošni materijal za jednokratnu upotrebu.
- D **Spremnik potrošenih reagensa** – nakon svake obrade prikupljaju se potrošeni reagensi radi bacanja u otpad.
- E **Vrata odjeljka za pufer** – zatvaraju odjeljak za pufer zasunom smještenim u donjem lijevom kutu vrata.

Odjeljak filtra za zrak

U odjeljku filtra za zrak koji se nalazi na poledini instrumenta nalazi se filtar za zrak. Zamijenite filtar za zrak svakih 90 dana. Da biste saznali više o zamjeni filtra, pročitajte [Zamjena filtra za zrak na stranici 38](#).



Softver instrumenta NextSeq 550Dx




Softver instrumenta obuhvaća integrirane aplikacije za izvođenje obrade sekvenciranjem.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS)** – kontrolni softver vodi vas kroz korake postavljanja obrade sekvenciranjem.
- ▶ **Softver Real-Time Analysis (RTA)** – RTA izvodi analizu slika i prepoznavanje baza tijekom obrade. Instrument NextSeq 550Dx primjenjuje RTA v2 koji donosi važne razlike u arhitekturi i značajkama u odnosu na prethodne verzije. Da biste saznali više, pročitajte odjeljak [Real-Time Analysis na stranici 55](#).

Ikone statusa

Ikona statusa u gornjem desnom kutu NCS-a ukazuje na bilo kakve promjene uvjeta tijekom postavljanja obrade ili same obrade.

| Ikona statusa | Naziv statusa | Opis |
|---|---------------|-----------------------|
|  | U redu | Sustav radi normalno. |
|  | Obrada | Sustav obrađuje. |

| Ikona statusa | Naziv statusa | Opis |
|---|--------------------|--|
|  | Upozorenje | Pojavilo se upozorenje. Upozorenja ne prekidaju obradu niti zahtijevaju neku radnju prije nastavka. |
|  | Pogreška | Pojavila se pogreška. Pogreške zahtijevaju da se prije nastavka obrade izvrši neka radnja. |
|  | Potreban je servis | Pojavila se obavijest koja zahtijeva pozornost. Dodatne informacije potražite u poruci. |

Kad se promijene neki uvjeti, ta ikona bljeska kako bi vas upozorila. Odaberite ikonu da bi vam se prikazao opis stanja. Odaberite **Acknowledge** (Prihvati) da biste prihvatili poruku i **Close** (Zatvori) da biste zatvorili dijaloški okvir.

NAPOMENA

Potvrdom da je poruka viđena ikona se resetira i poruka zasivljuje. Poruka je i dalje vidljiva korisniku ako odabere ikonu, ali nestaje kad se ponovno pokrene NCS.

Gumb za uključivanje/isključivanje

Gumbom za uključivanje/isključivanje na prednjoj strani instrumenta NextSeq 550Dx uključuje se napajanje instrumenta i računala instrumenta. Gumb za uključivanje/isključivanje izvodi sljedeće radnje, ovisno o stanju napajanja instrumenta: Prema zadanim postavkama, NextSeq 550Dx se podiže u dijagnostičkom načinu rada.

Da biste saznali više o početnom napajanju instrumenta, pročitajte odjeljak *Uključivanje instrumenta na stranici 11*.

Da biste saznali više o isključivanju instrumenta, pročitajte odjeljak *Isključivanje instrumenta na stranici 41*.

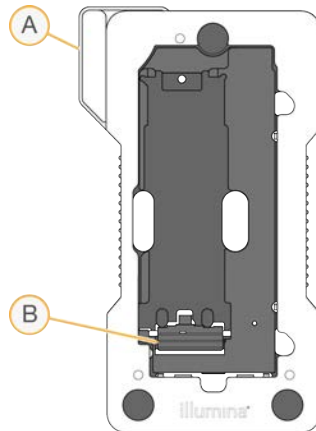
| Stanje napajanja | Radnja |
|-------------------------------------|---|
| Napajanje instrumenta je isključeno | Pritisnite gumb za uključivanje. |
| Instrument je uključen | Pritisnite gumb za isključivanje. Na zaslonu se pojavljuje dijaloški okvir kojim se potvrđuje isključivanje instrumenta. |
| Napajanje instrumenta je uključeno | Pritisnite i držite gumb za uključivanje/isključivanje 10 sekundi da biste uzrokovali nasilno isključivanje instrumenta i računala instrumenta. Tu metodu isključivanja instrumenta primjenjujte samo ako instrument ne reagira. |

NAPOMENA Isključivanjem instrumenta tijekom obrade sekvenciranjem obrada se trenutačno prekida. Prekidanje obrade je konačno. Potrošni materijal za obradu ne može se ponovno upotrebljavati, a podaci dobiveni sekvenciranjem iz te obrade neće se spremiti.

Pregled prilagodnika za BeadChip za ponovnu upotrebu

Prilagodnik za BeadChip za ponovnu upotrebu drži BeadChip tijekom skeniranja. BeadChip se pričvršćuje u utor prilagodnika pomoću kvačice za držanje. Zatim se prilagodnik za BeadChip umeće na postolje u odjeljku za snimanje.

Slika 3 Prilagodnik za BeadChip za ponovnu upotrebu



- A Prilagodnik za BeadChip
- B Kvačica za držanje

Pregled kompleta s reagensima

Pregled potrošnog materijala za sekvenciranje

Potrošni materijal za sekvenciranje koji je obavezan za upotrebu instrumenta NextSeq 550Dx priložen je zasebno kao komplet za jednokratnu upotrebu. Svaki komplet sadrži jedan protočni članak, spremnik reagensa, spremnik pufera i pufer za razrjeđivanje biblioteke. Da biste saznali više, pročitajte informativne preglede *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2 (300 ciklusa)*, *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 ciklusa)* ili *NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (75 ciklusa)*.

Protočni članak, spremnik reagensa i spremnik pufera upotrebljavaju radiofrekvencijsku identifikaciju (RFID) za precizno praćenje potrošnog materijala i kompatibilnost.

OPREZ

Uz komplete NextSeq 550Dx High Output Reagent v2.5 nužan je sustav NOS 1.3 ili noviji da bi instrument prihvaćao spremnik protočnog članka v2.5. Prije pripreme uzoraka i potrošnog materijala ažurirajte softver da ne biste morali baciti reagense i/ili uzorke.



NAPOMENA

Potrošni materijal za sekvenciranje držite u pripadajućim kutijama do upotrebe.

Označavanje kompatibilnosti kompleta

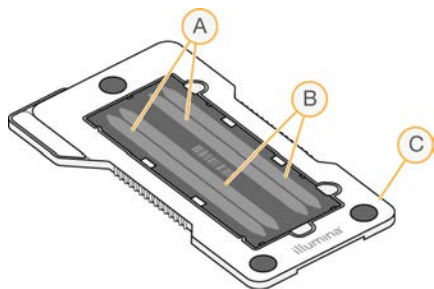
Komponente kompleta označene su indikatorima u raznim bojama kako bi se pokazala kompatibilnost između protočnih članaka i spremnika reagensa. Uvijek upotrebljavajte kompatibilan spremnik reagensa i protočni članak. Spremnik pufera je univerzalan.

Svaki protočni članak i spremnik reagensa imaju naljepnicu **High** (Veliki) ili **Mid** (Srednji). Kad pripremate potrošni materijal za obradu, uvijek provjerite naljepnicu.

| Vrsta kompleta | Oznaka na naljepnici |
|---|---|
| Komponente kompleta velikog kapaciteta |  |
| Komponente kompleta srednjeg kapaciteta |  |

Pregled protočnog članka

Slika 4 Spremnik protočnog članka



- A Par staza A – staze 1 i 3
- B Par staza B – staze 2 i 4
- C Okvir spremnika protočnog članka

Protočni članak stakleni je supstrat na kojem se generiraju klasteri i izvodi reakcija sekvenciranja. Protočni članak nalazi se u spremniku protočnog članka.

Protočni članak sastoji se od 4 staze koje se snimaju u paru.

- ▶ Staze 1 i 3 (par staza A) snimaju se istovremeno.
- ▶ Staze 2 i 4 (par staza B) snimaju se po dovršetku snimanja para staza A.

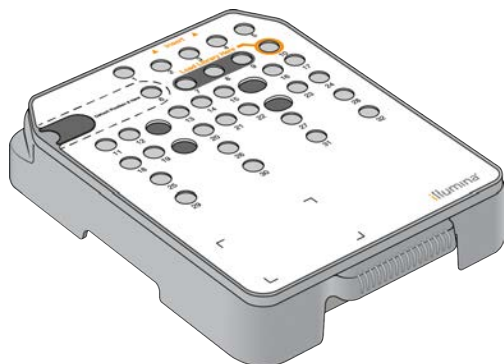
Protočni članak ima 4 staze, ali se samo jedna jedina biblioteka ili niz biblioteka organiziranih u skupove sekvencira na njoj. Biblioteke se umeću u spremnik reagensa iz jednog rezervoara i automatski se prenose na protočni članak na sve 4 staze.

Svaka se staza snima kroz mala područja snimanja nazvana kvadratići. Da biste saznali više, pročitate [Kvadratići protočnog članka na stranici 59](#).

Pregled spremnika reagensa

Spremnik reagensa potrošni je materijal za jednokratnu upotrebu s RFID praćenjem i rezervoarima zatvorenim folijom koji su unaprijed napunjeni reagensima za klasteriranje i sekvenciranje.

Slika 5 Spremnik reagensa



Spremnik reagensa sadrži namjenski rezervoar za umetanje pripremljenih biblioteka. Nakon početka obrade biblioteke se automatski prenose iz rezervoara u protočni članak.

Nekoliko rezervoara rezervirano je za automatsko ispiranje nakon obrade. Otopina za ispiranje ubrizgava se iz spremnika pufra u rezervirane rezervoare kroz sustav, a zatim do spremnika upotrijebljenih reagensa.

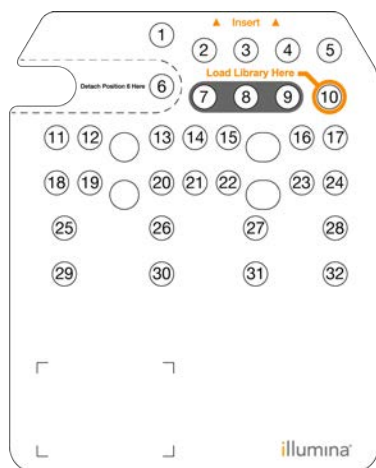


UPOZORENJE

Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku katu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti potražite u sigurnosno-tehničkom listu na adresi support.illumina.com/sds.html.

Rezervirani rezervoari

Slika 6 Numerirani rezervoari



| Položaj | Opis |
|----------|---|
| 7, 8 i 9 | Rezervirani za neobavezne prilagođene primere |
| 10 | Umetanje biblioteka |

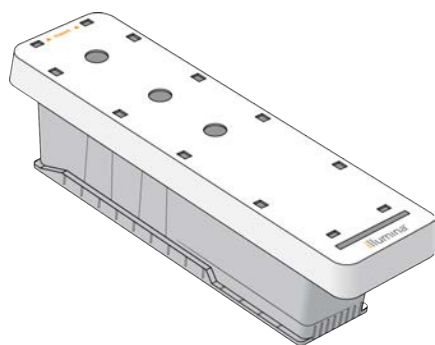
Uklonjivi rezervoar na položaju br. 6

Unaprijed napunjeni spremnik reagensa sadrži reagens s formamidom za denaturiranje na položaju br. 6. Radi lakšeg sigurnog bacanja neiskorištenog reagensa u otpad nakon obrade sekvenciranjem, rezervoar na položaju 6 je uklonjiv. Da biste saznali više, pročitajte *Uklanjanje iskorištenog rezervoara s položaja br. 6 na stranici 22*.

Pregled spremnika pufera

Spremnik pufera posuda je za jednokratnu upotrebu koja sadrži tri rezervoara unaprijed napunjena puferima i otopinom za ispiranje. Sadržaj spremnika pufera dovoljan je za sekvenciranje jednog protočnog članka.

Slika 7 Spremnik pufera



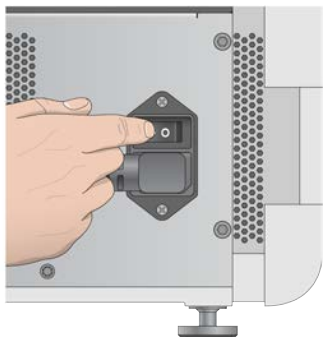
Poglavlje 2 Početak rada

| | |
|--|----|
| Uključivanje instrumenta | 11 |
| Prilagodba postavki sustava | 12 |
| Potrošni materijal i oprema koju mora pribaviti korisnik | 13 |

Uključivanje instrumenta

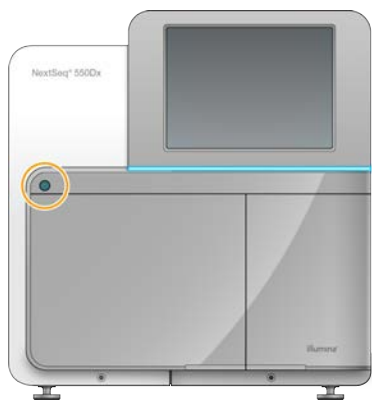
Prekidač napajanja prebacite u položaj I (uključeno).

Slika 8 Prekidač za uključivanje/isključivanje na poledini instrumenta



- 1 Pritisnite gumb za uključivanje/isključivanje iznad odjeljka za reagense. Tim se gumbom uključuje napajanje instrumenta i pokreću integrirano računalo instrumenta i softver.

Slika 9 Prekidač za uključivanje/isključivanje na prednjem dijelu instrumenta



- 2 Pričekajte da se dovrši učitavanje operacijskog sustava. NextSeq Control Software (NCS) automatski pokreće i inicijalizira sustav. Nakon dovršetka koraka inicijalizacije otvara se početni zaslon.
- 3 Unesite korisničko ime i lozinku za Local Run Manager. Da biste saznali više o lozinkama, pročitajte odjeljak *Korisničke lozinke na stranici 1*. Da biste saznali više o postavljanju računa u softveru Local Run Manager, pročitajte odjeljak *Administrative Settings and Tasks (Administratorske postavke i zadaci) na stranici 1*.
- 4 Odaberite **Login** (Prijava). Otvara se početni zaslon s ikonama Sequence (Sekvenciranje), Local Run Manager, Manage Instrument (Upravljanje instrumentom) i Perform Wash (Ispiranje).

Indikatori načina rada instrumenta

Zadani način rada instrumenta NextSeq 550Dx dijagnostički je način rada. Sljedeće na zaslonu NCS upućuje na način rada instrumenta.

| Način rada | Početni zaslon | Boja trake | Usmjerenje ikone statusa |
|--------------------------|---|------------|--------------------------|
| Dijagnostički način rada | Welcome to NextSeqDx (Dobro došli u NextSeqDx) | Plava | Vodoravno |
| Istraživački način rada | Welcome to NextSeq (Dobro došli u NextSeq) | Narančasta | Okomito |

Prilagodba postavki sustava

Operacijski softver obuhvaća prilagodljive postavke sustava za identifikaciju instrumenta, preferencije unosa, postavke zvuka i lokaciju izlazne mape. Da biste promijenili postavke konfiguracije mreže, pročitajte odjeljak *Konfiguracija postavki sustava na stranici 50*.

Mogućnosti prilagodbe:

- ▶ prilagodba identifikacije instrumenta (avatar i nadimak)
- ▶ Postavljanje mogućnosti unosa i zvučnog indikatora
- ▶ postavljanje mogućnosti postavljanja obrade
- ▶ mogućnosti isključivanja
- ▶ konfiguracija pokretanja instrumenta nakon provjere prije obrade
- ▶ odabir slanja podataka o radnim svojstvima instrumenta tvrtki Illumina
- ▶ određivanje izlazne mape obrade

Prilagodba avatara i nadimka instrumenta

- 1 Na početnom zaslonu odaberite **Manage Instrument** (Upravljanje instrumentom).
- 2 Odaberite **System Customization** (Prilagodba sustava).
- 3 Da biste dodijelili željenu sliku instrumentu, odaberite **Browse** (Pregledaj) i pronađite sliku.
- 4 U polje Nick Name (Nadimak) unesite željeni naziv instrumenta.
- 5 Odaberite **Save** (Spremi) da biste spremili postavke i prešli na sljedeći zaslon. Slika i naziv pojavljuju se gornjem lijevom kutu svakog zaslona.

Postavljanje mogućnosti tipkovnice i zvučnog indikatora

- 1 Na početnom zaslonu odaberite **Manage Instrument** (Upravljanje instrumentom).
- 2 Odaberite **System Customization** (Prilagodba sustava).
- 3 Potvrdite okvir **Use on-screen keyboard** (Upotrijebi zaslonsku tipkovnicu) da biste aktivirali zaslonsku tipkovnicu za unos podataka u instrument.
- 4 Potvrdite okvir **Play audio** (Reproduciraj zvuk) da biste uključili zvučne indikatore za sljedeće događaje:
 - ▶ nakon inicijalizacije instrumenta
 - ▶ po pokretanju obrade
 - ▶ kad se pojave određene pogreške
 - ▶ kad je nužna interakcija korisnika
 - ▶ po završetku obrade

- 5 Odaberite **Save** (Spremi) da biste spremili postavke i prešli na sljedeći zaslom.

Postavljanje mogućnosti postavljanja obrade

- 1 Na zaslonu Manage Instrument (Upravljanje instrumentom) odaberite **System Customization** (Prilagodba sustava).
- 2 Potvrdite okvir **Use Advanced Load Consumables** (Upotrijebi napredno učitavanje potrošnog materijala) da biste omogućili učitavanje cjelokupnog potrošnog materijala za obradu s jednog zaslona.
- 3 Potvrdite okvir **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Preskoči potvrdu provjere prije obrade) da biste automatski pokrenuli sekvenciranje nakon uspješne automatske provjere.
- 4 Odaberite **Save** (Spremi) da biste spremili postavke i napustili zaslon.

Postavljanje mogućnosti automatskog pražnjenja

- 1 Na zaslonu Manage Instrument (Upravljanje instrumentom) odaberite **System Customization** (Prilagodba sustava).
- 2 Potvrdite okvir **Purge Consumables at End of Run** (Isprazni potrošni materijal na kraju obrade) da biste automatski nakon svake obrade ispraznili neupotrijebljene reagense iz spremnika reagensa u spremnik potrošenih reagensa.

NAPOMENA Za automatsko pražnjenje potrošnog materijala potrebno je dodatno vrijeme u tijeku rada.

- 3 Odaberite **Save** (Spremi) da biste spremili postavke i izašli sa zaslona.

Potrošni materijal i oprema koju mora pribaviti korisnik

Na instrumentu NextSeq 550Dx primjenjuje se sljedeći potrošni materijal i oprema. Sljedeći potrošni materijal i oprema upotrebljavaju se za pripremu potrošnog materijala, sekvenciranje i održavanje instrumenta. Da biste saznali više, pročitajte *Vodič za sustav NextSeq 550*.

Potrošni materijal za sekvenciranje

| Potrošni materijal | Dobavljač | Svrha |
|--|---|--|
| Alkoholne maramice sa 70 % izopropila ili 70-postotni etanol | VWR, kataloški broj 95041-714 (ili ekvivalent) Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora | Čišćenje protočnog članka i općenita namjena |
| Laboratorijske maramice koje ne ispuštaju mnogo dlačica | VWR, kataloški broj 21905-026 (ili ekvivalent) | Čišćenje protočnog članka i općenita namjena |

Potrošni materijal za održavanje i otklanjanje poteškoća

| Potrošni materijal | Dobavljač | Svrha |
|-------------------------------------|---|--|
| NaOCl, 5 % (natrijev hipoklorit) | Sigma-Aldrich, kat. broj 239305 (ili ekvivalentni proizvod laboratorijske kvalitete) | Pranje instrumenta pomoću ručnog ispiranja nakon obrade; razrijeđeno na 0,12-postotnu otopinu |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, kataloški broj P7949 | Pranje instrumenta pomoću mogućnosti ručnog pranja; razrijeđeno na 0,05-postotnu otopinu |
| Voda, laboratorijske kvalitete | Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora | Pranje instrumenta (ručno pranje) |
| Filtar za zrak | Illumina, kat. broj 20022240 | Čišćenje zraka koji instrument uzima radi hlađenja |

Smjernice za vodu laboratorijske kvalitete

Za postupke na instrumentu uvijek upotrebljavajte vodu ili deioniziranu vodu laboratorijske kvalitete. Nipošto nemojte upotrebljavati vodu iz slavine. Upotrebljavajte samo sljedeće razrede vode ili njihove ekvivalente:

- ▶ deionizirana voda
- ▶ Illumina PW1
- ▶ voda od 18 megaoma (MΩ)
- ▶ voda Milli-Q
- ▶ voda Super-Q
- ▶ voda za primjenu u molekularnoj biologiji

Oprema

| Stavka | Izvor |
|--|---|
| Zamrzivač, od -25 °C do -15 °C, bez stvaranja leda | Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora |
| Hladnjak, od 2 °C do 8 °C | Bilo koji dobavljač laboratorijskog pribora |

Poglavlje 3 Sekvenciranje

| | |
|--|----|
| Uvod | 15 |
| Tijek rada sekvenciranja | 16 |
| Priprema spremnika reagensa | 16 |
| Priprema protočnog članka | 17 |
| Priprema biblioteka za sekvenciranje | 17 |
| Postavljanje obrade sekvenciranjem | 18 |
| Praćenje napretka obrade | 25 |
| Automatsko ispiranje nakon obrade | 26 |

Uvod

Da biste izveli obradu sekvenciranjem na instrumentu NextSeq 550Dx, pripremite spremnik reagensa i protočni članak, a zatim pratite upute softvera da biste postavili i pokrenuli obradu. Generiranje i sekvenciranje klastera izvodi se na instrumentu. Nakon obrade automatski počinje ispiranje instrumenta pomoću komponenti već umetnutih u instrument.

Generiranje klastera

Tijekom generiranja klastera pojedinačne molekule DNA vežu se za površinu protočnog članka, a potom se amplificiraju radi formiranja klastera.

Sekvenciranje

Klasteri se snimaju pomoću dvokanalnog kemijskog postupka sekvenciranja i kombinacija filtriranja specifičnih za svaki od fluorescentno označenih nukleotida. Nakon dovršetka snimanja nekog kvadratića na protočnom članku snima se sljedeći kvadratić. Taj se postupak ponavlja za svaki ciklus sekvenciranja. Nakon analize slika softver provodi određivanje baza, filtriranje i ocjenjivanje kvalitete.

Analiza

Kako obrada odmiče, operacijski softver automatski prenosi datoteke s otkrivenim bazama (BCL datoteke) na navedenu izlaznu lokaciju radi sekundarne analize.

Trajanje obrade sekvenciranjem

Trajanje obrade sekvenciranjem ovisi o broju izvedenih ciklusa. Maksimalna dužina obrade jest obrada od 150 ciklusa s uparenim krajevima za svako očitavanje (2 x 150) te do 8 ciklusa za svako od 2 očitavanja indeksa.

Broj ciklusa u očitavanju

U obradi sekvenciranjem broj ciklusa koji se izvedu u jednom očitavanju veći je za jedan od broja analiziranih ciklusa. Tijekom obrade uparenih krajeva u 150 ciklusa, primjerice, provedu se očitavanja 151 ciklusa (2 x 151), tj. ukupno 302 ciklusa. Na kraju obrade analizira se 2 x 150 ciklusa. Taj je dodatni ciklus nužan za izračune pri određivanju faza i predfaza.

Tijek rada sekvenciranja

Create Run



Stvorite obradu u softverskom modulu Local Run Manager. Pogledajte vodič kroz tijek rada analize baš za svoj modul.



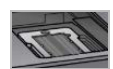
Pripremite novi spremnik reagensa: odmrznite ga i provjerite.
Pripremite nov protočni članak: ostavite da poprimi sobnu temperaturu, otpakirajte i provjerite.



Denaturirajte i razrijedite biblioteke. Upute pronađite na informativnom pregledu pripreme biblioteke.



Stavite otopinu biblioteke u spremnik reagensa u rezervoar br. 10.



Na početnom zaslonu NCS-a na instrumentu odaberite **Sequence** (Sekvenciraj), ID obrade i počnite prolaziti kroz korake postavljanja obrade. Odaberite **Run** (Obrada).



Umetnite protočni članak.



Ispraznite i ponovno umetnite spremnik potrošenih reagensa.
Umetnite spremnik pufera i spremnik reagensa.



Pregledajte rezultate provjere prije obrade. Odaberite **Start** (Pokreni). (Nije obavezno uz konfiguraciju da se automatski pokreće.)



Nadzirite obradu putem sučelja operacijskog softvera ili s umreženog računala sa softverom Local Run Manager.

Ispiranje instrumenta počinje automatski nakon dovršetka sekvenciranja.

Priprema spremnika reagensa

Pripazite da pažljivo slijedite smjernice povezane sa spremnikom reagensa da bi sekvenciranje bilo uspješno.

- 1 Izvadite spremnik reagensa iz spremišta u kojem je temperatura od $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- 2 Odaberite neku od navedenih metoda otapanja reagensa. Nemojte uranjati spremnik u tekućinu. Nakon otapanja spremnika osušite ga prije prelaska na sljedeći korak.

| Temperatura | Vrijeme odmrzavanja | Granica stabilnosti |
|---|---------------------|---------------------------|
| vodena kupelj temperature od $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ | 60 minuta | Ne smije premašiti 6 sati |
| od $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ | 7 sati | Ne smije premašiti 7 dana |

NAPOMENA Ako se u istoj vodenoj kupelji odmrzava više spremnika, vrijeme odmrzavanja se produžuje.

- 3 Preokrenite spremnik pet puta da biste promiješali reagense.
- 4 Pregledajte dno spremnika da biste se uvjerali da su reagensi otopljeni i ne sadrže talog. Provjerite da su položaji 29, 30, 31 i 32 otopljeni jer su oni najveći i treba im najviše vremena da se otope.
- 5 Nježno lupnite o stol da biste smanjili broj mjehurića zraka.
Da biste postigli najbolje rezultate, odmah umetnite uzorak i postavite obradu.



UPOZORENJE

Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti potražite u sigurnosno-tehničkom listu na adresi support.illumina.com/sds.html.

Priprema protočnog članka

- 1 Izvadite kutiju s novim protočnim člankom iz skladišta u kojem je temperatura između 2 °C i 8 °C.
- 2 Izvadite pakiranje s folijom iz kutije i odložite 30 minuta na sobnoj temperaturi.

NAPOMENA Ako je folija na pakiranju netaknuta, protočni članak može ostati na sobnoj temperaturi do 12 sati. Nemojte ponovno hladiti i zagrijavati protočni članak.

Priprema biblioteka za sekvenciranje

Denaturirajte i razrijedite biblioteke na ulazni volumen od 1,3 ml. U praksi ulazna koncentracija može se razlikovati ovisno o pripremi biblioteke i metodama kvantifikacije. Razrjeđivanje biblioteka uzoraka ovisi o složenosti oligonukleotidnih skupova. Upute za pripremu biblioteka uzoraka za sekvenciranje, uključujući razrjeđivanje biblioteka i stvaranje skupova, potražite u odjeljku Upute za upotrebu primjenjivog kompleta za pripremu biblioteka. Nužna je optimizacija gustoće klastera na instrumentu NextSeq 550Dx.

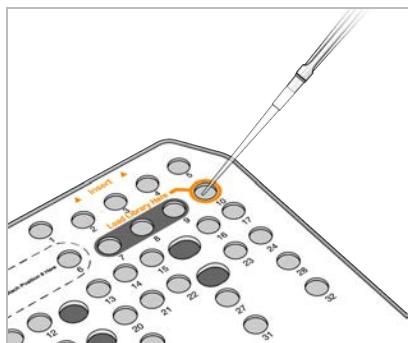
Denaturiranje i razrjeđivanje biblioteka

Denaturirajte i razrijedite biblioteke na početnu zapreminu od 1,3 ml i početnu koncentraciju 1,8 pM. U praksi ulazna koncentracija može se razlikovati ovisno o pripremi biblioteke i metodama kvantifikacije. Upute potražite na informativnom pregledu za pripremu biblioteka.

Umetanje biblioteka u spremnik reagensa

- 1 Očistite zaštitnu foliju koja prekriva rezervoar br. 10 s oznakom **Load Library Here** (Ovdje umetnite biblioteku) krpicom koja ne ostavlja vlakna.
- 2 Probušite foliju čistim vrhom pipete od 1 ml.
- 3 Umetnite 1,3 ml pripremljenih biblioteka u rezervoar br. 10 označen s „**Load Library Here**“ (Ovdje umetnite biblioteke). Izbjegavajte dodirivanje zaštitne folije prilikom pipetiranja biblioteka.

Slika 10 Umetanje biblioteka



Postavljanje obrade sekvenciranjem

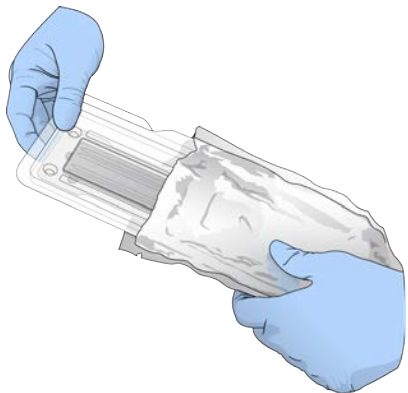
Prijava u BaseSpace

- 1 Unesite korisničko ime i lozinku za BaseSpace.
- 2 Odaberite **Next** (Dalje).

Umetanje protočnog članka

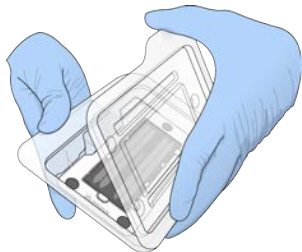
- 1 Uklonite iskorišten protočni članak iz prethodne obrade.
- 2 Izvadite protočni članak iz folije u koju je zapakiran.

Slika 11 Uklanjanje folije



- 3 Otvorite pakiranje od prozirne plastike i izvadite protočni članak.

Slika 12 Vađenje iz pakiranja

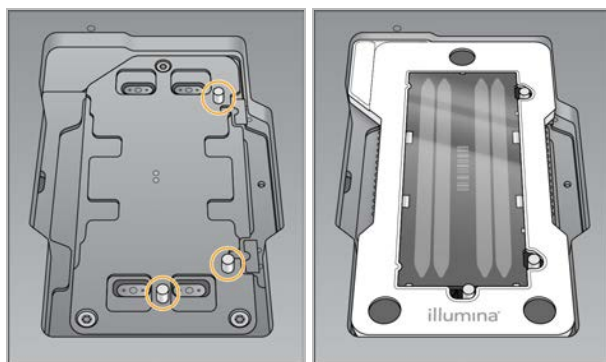


- 4 Očistite staklenu površinu protočnog članka alkoholnom maramicom koja ne ostavlja vlakna. Osušite staklo laboratorijskom krpicom koja ne ostavlja vlakna.

NAPOMENA Staklena površina protočnog članka mora biti čista. Ako je potrebno, ponovite korak čišćenja.

- 5 Poravnajte protočni članak koristeći se klinovima za poravnavanje i postavite ga na postolje.

Slika 13 Umetanje protočnog članka



- 6 Odaberite **Load** (Umetanje).
Vrata se automatski zatvaraju: ID protočnog članka pojavljuje se na zaslonu te se provjeravaju senzori.

NAPOMENA Držite ruke dalje od vrata protočnog članka dok se zatvaraju da biste izbjegli prignječenje.

- 7 Odaberite **Next** (Dalje).

Pražnjenje spremnika potrošenog reagensa

- 1 Otvorite vrata spremnika pufera sa zasunom u donjem lijevom kutu vrata.
- 2 Uklonite spremnik potrošenih reagensa i bacite sadržaj u otpad u skladu s primjenjivim normama.

Slika 14 Uklanjanje spremnika potrošenih reagensa



NAPOMENA Dok uklanjate spremnik, stavite drugu ruku ispod njega kao potporu.

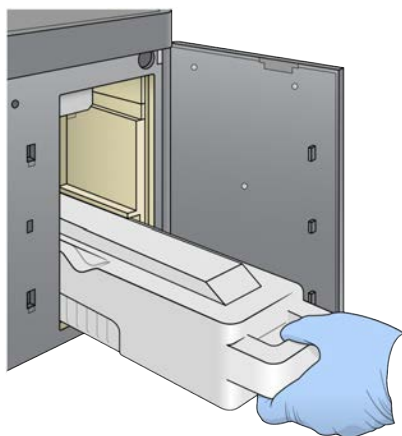


UPOZORENJE

Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti potražite u sigurnosno-tehničkom listu na adresi support.illumina.com/sds.html.

- 3 Klizanjem umetnite prazan spremnik potrošenih reagensa u odjeljak za pufer dok se ne zaustavi. Zvuk klika označit će da je spremnik na svom mjestu.

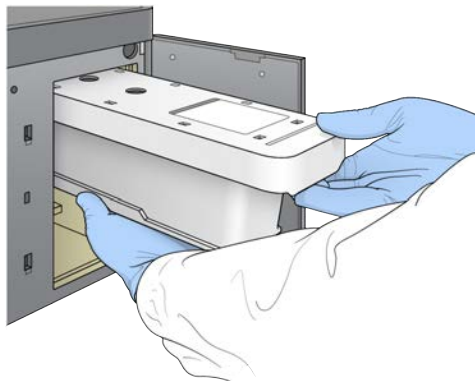
Slika 15 Umetanje praznog spremnika potrošenih reagensa



Umetanje spremnika pufera

- 1 Uklonite upotrijebljeni spremnik pufera iz gornjeg odjeljka.
Za podizanje i vađenje spremnika pufera potrebno je upotrijebiti malo sile.
- 2 Klizanjem umetnite novi spremnik pufera u odjeljak za pufer dok se ne zaustavi.
Zvučni klik označit će da je spremnik namješten; na zaslonu se pojavljuje ID spremnika pufera te se provjerava senzor.

Slika 16 Umetanje spremnika pufera



- 3 Zatvorite vrata spremnika pufera i odaberite **Next** (Dalje).

Umetanje spremnika reagensa

- 1 Otvorite vrata odjeljka za reagense pomoću zasuna u donjem desnom kutu vrata.
- 2 Iz odjeljka za reagense izvadite upotrijebljeni spremnik reagensa. Neiskorišteni sadržaj bacite u otpad u skladu s primjenjivim normama.



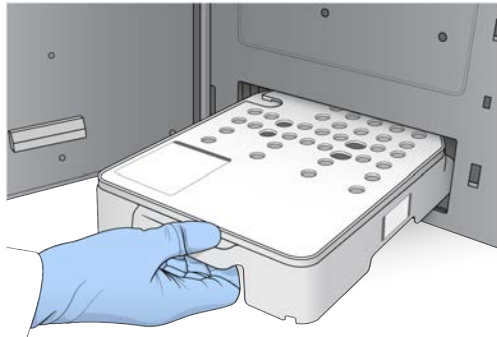
UPOZORENJE

Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku katu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti potražite u sigurnosno-tehničkom listu na adresi support.illumina.com/sds.html.

NAPOMENA Radi lakšeg sigurnog bacanja neiskorištenog reagensa u otpad, rezervoar na položaju 6 je uklonjiv. Da biste saznali više, pročitajte *Uklanjanje iskorištenog rezervoara s položaja br. 6* na stranici 22.

- 3 Klizanjem umetnite spremnik reagensa u odjeljka za reagense dok se spremnik ne zaustavi te zatvorite vrata odjeljka za reagense.

Slika 17 Umetanje spremnika reagensa

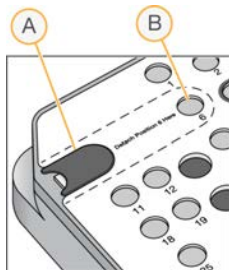


- 4 Odaberite **Load** (Umetanje).
Softver automatski pomiče spremnik na njegovo mjesto (~30 sekundi), ID spremnika reagensa pojavljuje se na zaslonu te se provjeravaju senzori.
- 5 Odaberite **Next** (Dalje).

Uklanjanje iskorištenog rezervoara s položaja br. 6

- 1 Kad uklonite **iskorišteni** spremnik reagensa iz instrumenta, uklonite zaštitni gumeni poklopac s utora uz položaj br. 6.

Slika 18 Uklonjivi položaj 6



- A Zaštitni gumeni poklopac
- B Položaj 6

- 2 Pritisnite prozirni, plastični jezičac dolje i povucite ulijevo da biste izbacili rezervoar.
- 3 Bacite rezervoar u otpad u skladu s primjenjivim normama.

Određivanje parametara obrade


Koraci na zaslonu Run Setup (Postavljanje obrade) razlikuju se ovisno o konfiguraciji sustava:

- ▶ **BaseSpace ili BaseSpace Onsite** – na zaslonu Run Setup (Postavljanje obrade) navode se obrade koje su postavljene putem kartice BaseSpace Prep (Priprema za BaseSpace). Ako se željena obrada ne pojavi na zaslonu Run Setup (Postavljanje obrade), provjerite je li obrada označena za sekvenciranje na servisu BaseSpace.
- ▶ **Standalone** (Samostalno) – na zaslonu Run Setup (Postavljanje obrade) navedena su polja za definiranje parametara obrade.

Odabir dostupne obrade (konfiguracija za BaseSpace)

- 1 Na popisu dostupnih obrada odaberite naziv obrade.
Strelicama kretanja nagore i nadolje krećite se po popisu ili unesite naziv obrade u polje za pretraživanje.
- 2 Odaberite **Next** (Dalje).
- 3 Potvrdite parametre obrade.
 - ▶ **Run Name** (Naziv obrade) – naziv obrade koji joj je dodijeljen na servisu BaseSpace.
 - ▶ **Library ID** (ID biblioteke) – naziv biblioteka sa skupovima koji im je dodijeljen na servisu BaseSpace.
 - ▶ **Recipe** (Recept) – naziv recepta za **NextSeq High** (NextSeq velikog kapaciteta) ili **NextSeq Mid** (NextSeq srednjeg kapaciteta) ovisno o spremniku reagensa koji se upotrebljava za obradu.
 - ▶ **Read Type** (Vrsta očitavanja) – Single Read (Jedno očitavanje) ili Paired End (Upareni kraj).
 - ▶ **Read Length** (Dužina očitavanja) – broj ciklusa za svako očitavanje.
 - ▶ **[neobavezno]** Prilagođeni primeri, ako je to primjenjivo.
 - ▶ **Run parameters** (Parametri obrade) – promijenite broj očitavanja ili broj ciklusa po očitavanju.
 - ▶ **Custom primers** (Prilagođeni primeri) – promijenite postavke za prilagođene primere. Da biste saznali više, pročitajte *Vodič za prilagođene primere za NextSeq (br. dokumenta: 15057456)*.
 - ▶ **Purge consumables for this run** (Isprazni potrošni materijal iz ove obrade) – promijenite tu postavku da biste automatski ispraznili potrošni materijal nakon trenutne obrade.
- 4 Odaberite **Next** (Dalje).

Unos parametara obrade (samostalna konfiguracija)





- 1 Unesite željeni naziv obrade.
- 2 **[neobavezno]** Unesite željeni ID biblioteke.
- 3 Odaberite vrstu očitavanja: **Single Read** (Jedno očitavanje) ili **Paired End** (Upareni kraj).
- 4 Unesite broj ciklusa za svako očitavanje u obradi sekvenciranjem.
 - ▶ **Read 1** – unesite neku vrijednost do 151 ciklusa.
 - ▶ **Index 1** – unesite broj ciklusa potrebnih za primer za Index 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** – unesite broj ciklusa potrebnih za primer za Index 2 (i5).
 - ▶ **Read 2** – unesite neku vrijednost do 151 ciklusa. Ta je vrijednost obično isti broj ciklusa kao za Read 1.Kontrolni softver potvrđuje vaše unose prema sljedećim kriterijima:
 - ▶ ukupan broj ciklusa ne smije premašiti maksimalan dopušten broj ciklusa
 - ▶ ciklusa za Read 1 ima više od 5, koliko ih je potrebno za generiranje predloška
 - ▶ ciklusa za očitavanja indeksa (Index Read) nema više od ciklusa za Read 1 i Read 2
- 5 **[neobavezno]** Ako upotrebljavate prilagođene primere, potvrdite okvir za korištenje primere. Da biste saznali više, pročitajte *Vodič za prilagođene primere za NextSeq (br. dokumenta: 15057456)*.
 - ▶ **Read 1** – prilagođeni primer za Read 1.
 - ▶ **Index 1** – prilagođeni primer za Index 1.
 - ▶ **Index 2** – prilagođeni primer za Index 2.
 - ▶ **Read 2** – prilagođeni primer za Read 2.
- 6 **[neobavezno]** Odaberite gumb **Advanced Settings**  (Napredne postavke) da biste promijenili parametre obrade.

- ▶ Na padajućem popisu Recipe (Recept) odaberite recept. Navedeni su samo kompatibilni recepti.
- ▶ **Output folder location** (Lokacija izlazne mape) – promijenite lokaciju izlazne mape za trenutačnu obradu. Odaberite **Browse** (Pregledaj) da biste otišli na neku mrežnu lokaciju.
- ▶ **Included file** (Uvrštena datoteka) – odaberite datoteke koje će biti uvrštene u izlaznu mapu, a koje bi mogle biti korisne u slučaju daljnje analize. Primjerice, datoteke manifesta i popisi uzoraka.
- ▶ **Purge consumables for this run** (Isprazni potrošni materijal iz ove obrade) – promijenite tu postavku da biste automatski ispraznili potrošni materijal nakon trenutačne obrade.
- ▶ **Use run monitoring for this run** (Upotrijebi praćenje obrade za ovu obradu) – promijenite tu postavku da biste upotrijebili praćenje obrade na servisu BaseSpace.

7 Odaberite **Next** (Dalje).

Pregled provjere prije obrade

Softver provodi automatiziranu provjeru sustava prije obrade. Tijekom te provjere na zaslonu se pojavljuju sljedeći indikatori:

- ▶ **Siva kvačica**  – provjera još nije provedena.
- ▶ **Ikona napretka**  – provjera je u tijeku.
- ▶ **Zelena kvačica**  – provjera je uspješno završena.
- ▶ **Crveni križić**  – provjera nije prošla. Za sve stavke koje ne prođu provjeru nužna je neka radnja prije nastavka. Pročitajte *Rješavanje pogrešaka automatske provjere na stranici 44*.

Da biste zaustavili automatiziranu provjeru prije obrade koja je u tijeku, odaberite gumb **Cancel** (Odustani). Da biste ponovno pokrenuli provjeru, odaberite gumb **Retry** (Ponovno pokušaj). Provjera se nastavlja od prve nedovršene ili neuspjele provjere.

Da biste prikazali rezultate svake pojedine provjere u kategoriji, odaberite karticu Category (Kategorija).

Ako instrument nije konfiguriran za automatsko pokretanje obrade, pokrenite obradu nakon dovršetka automatizirane provjere prije obrade.

Pokretanje obrade

Kad završi automatska provjera prije obrade, odaberite **Start** (Pokreni). Time počinje obrada sekvenciranjem.

Da biste konfigurirali sustav da automatski pokrene obradu nakon uspješne provjere, pročitajte *Postavljanje mogućnosti postavljanja obrade na stranici 13*.



OPREZ

Svakako ostanite prijavljeni u Windows. Ako se tijekom obrade sekvenciranjem odjavite iz sustava Windows, obrada će se zaustaviti.

NAPOMENA Reagensi ne mogu biti u stanju mirovanja u instrumentu duže od 24 sata.

Praćenje napretka obrade

- 1 Pratite napredak obrade, intenzitete i ocjenjivanje kvalitete putem mjernih podataka koji se pojavljuju na zaslону.









NAPOMENA Kad odaberete Home (Početak), nije se moguće vratiti na prikaz mjernih podataka. No, mjerni su podaci dostupni na servisu BaseSpace ili se mogu prikazati na samostalnom računalu pomoću programa Sequencing Analysis Viewer (SAV).

Ciklusi mjernih podataka o obradi

Mjerni podaci o obradi pojavljuju se u različitim točkama tijekom obrade.

- ▶ Tijekom koraka generiranja klastera ne pojavljuju se mjerni podaci.
- ▶ Prvih 5 ciklusa rezervirano je za generiranje predloška.
- ▶ Mjerni podaci o obradi pojavljuju se nakon 25. ciklusa, uključujući gustoću klastera, klasterne koji prolaze filtar, prinos i rezultate provjere kvalitete.

Prijenos podataka

| Status | Local Run Manager | Izlazna mapa |
|-----------------------------|---|---|
| Povezan |  |  |
| Povezan i podaci se prenose |  |  |
| Nije povezan |  |  |
| Onemogućen |  |  |

Ako se tijekom obrade prekine prijenos podataka, podaci se privremeno pohranjuju na računalu instrumenta. Kad se veza ponovno uspostavi, prijenos podataka se automatski nastavlja. Ako se veza ponovno ne uspostavi prije završetka obrade, ručno prenesite podatke s računala instrumenta prije početka naredne obrade.

Univerzalni servis za kopiranje

NextSeq 550Dx obuhvaća Univerzalni servis za kopiranje. RTA 2 zahtijeva od servisa da kopira datoteke s izvorišne na određenu lokaciju, pri čemu servis obrađuje zahtjeve za kopiranje redosljedom njihova primanja. Ako se dogodi iznimka, datoteka se ponovno stavlja u red čekanja na kopiranje na temelju broja datoteka u redu čekanja na kopiranje.

Sequencing Analysis Viewer

Softver Sequencing Analysis Viewer pokazuje mjerne podatke o sekvenciranju generirane tijekom obrade. Mjerni se podaci pojavljuju u obliku crteža, grafikona i tablica utemeljenih na podacima koje je generirao RTA i zapisanih u datotekama o internim operacijama (InterOp). Mjerni podaci se ažuriraju s napretkom obrade. U bilo kojem trenutku tijekom obrade odaberite **Refresh** (Osvježi) da biste prikazali ažurirane mjerne podatke. Da biste saznali više, pročitajte *Korisnički priručnik za Sequencing Analysis Viewer (broj dijela: 15020619)*.

Sequencing Analysis Viewer uključen je u softver koji je instaliran na računalo instrumenta. Sequencing Analysis Viewer možete instalirati i na drugo računalo spojeno na istu mrežu kao instrument za daljinski nadzor mjernih podataka.

Automatsko ispiranje nakon obrade

Kad se dovrši obrada sekvenciranjem, softver pokreće automatsko ispiranje nakon obrade pomoću otopine za ispiranje koja se nalazi u spremniku pufera i natrijeva hipoklorita (NaOCl) iz spremnika reagensa. Automatsko ispiranje nakon obrade traje oko 90 minuta. Kad je ispiranje dovršeno, gumb Home (Početak) postaje aktivan. Tijekom ispiranja rezultati sekvenciranja ostaju vidljivi na zaslonu.

Nakon ispiranja

Nakon ispiranja dozatori ostaju u donjem položaju kako zrak ne bi ušao u sustav. Ostavite spremnike gdje jesu do sljedeće obrade.

Poglavlje 4 Skeniranje

| | |
|---|----|
| Uvod | 27 |
| Tijek rada skeniranja | 28 |
| Preuzimanje mape DMAP | 28 |
| Umetanje pločice BeadChip u prilagodnik | 29 |
| Postavljanje skeniranja | 30 |
| Praćenje napretka skeniranja | 32 |

Uvod

Za izvođenje skeniranja na instrumentu NextSeq 550Dx trebate sljedeće komponente za obradu:

- ▶ hibridiziranu i obojenu pločicu BeadChip
- ▶ prilagodnik za BeadChip za ponovnu upotrebu
- ▶ datoteke Decode Map (DMAP) za BeadChip koji upotrebljavate
- ▶ datoteku manifesta za vrstu pločice BeadChip koju upotrebljavate
- ▶ datoteku klastera za vrstu pločice BeadChip koju upotrebljavate

Izlazne datoteke generiraju se tijekom skeniranja, a zatim stavljaju u red čekanja na prienos u navedenu izlaznu mapu.

Izvedite analizu pomoću softvera BlueFuse Multi koji zahtijeva da podaci dobiveni skeniranjem budu u formatu datoteke za otkrivanje genotipa (GTC). Prema zadanim postavkama instrument NextSeq 550Dx generira normalizirane podatke i povezana otkrivanja genotipa u obliku GTC datoteke. Možete i konfigurirati instrument da generira dodatne datoteke s podacima o intenzitetu (IDAT). Da biste saznali više, pročitajte *Konfiguracija skeniranja pločice BeadChip na stranici 52*.

Decode File Client

Mapa DMAP sadrži informacije kojima se identificiraju lokacije zrnaca na pločici BeadChip i kvantificira signal povezan sa svakim zrcem. Mapa DMAP jedinstvena je za svaki crtični kôd pločice BeadChip.

Uslužni program Decode File Client omogućuje preuzimanje mapa DMAP izravno s poslužitelja tvrtke Illumina pomoću standardnog HTTP protokola.

Da biste pristupili programu Decode File Client, idite na [stranicu s podrškom za Decode File Client](https://support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html) na web-mjestu tvrtke Illumina (support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html). Instalirajte Decode File Client na računalo s pristupom mrežnoj lokaciji na kojoj se nalazi mapa DMAP.

Da biste saznali više, pročitajte *Preuzimanje mape DMAP na stranici 28*.

Datoteke manifesta i datoteka klastera

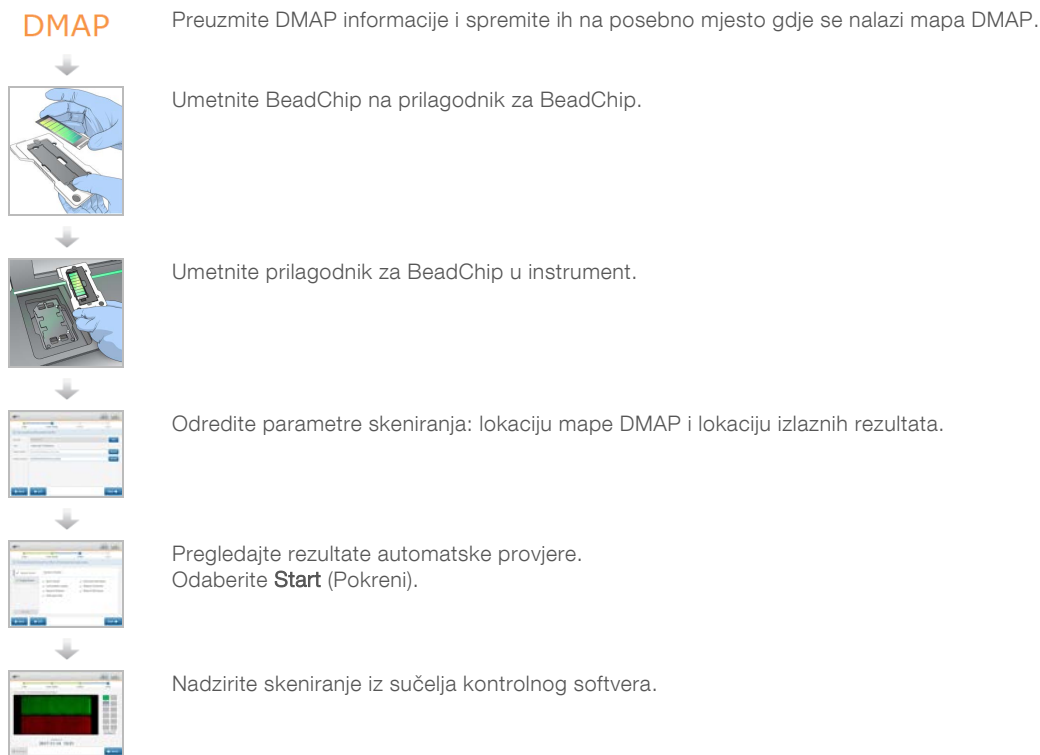
Za svaki BeadChip softver zahtijeva pristup datoteci manifesta i datoteci klastera. Svaka datoteka manifesta i klastera jedinstvena je za određenu vrstu pločice BeadChip. Pazite da upotrebljavate datoteke klastera koje imaju NS550 u nazivu datoteke. Te su datoteke kompatibilne sa sustavom NextSeq 550Dx.

- ▶ **Datoteka manifesta** – u datotekama manifesta opisuje se SNP ili sadržaj sonde na pločici BeadChip. Datoteke manifesta imaju format datoteke *.bpm.
- ▶ **Datoteke klastera** – u datotekama klastera opisuju se položaji klastera za Illumininu genotipizacijsku mrežicu te se upotrebljava prilikom analize podataka za otkrivanje genotipa. Datoteke klastera imaju format datoteke *.egt.

Lokacija datoteka navedena je na zaslonu BeadChip Scan Configuration (Konfiguracija skeniranja pločice BeadChip) Na početnom zaslonu softvera NCS odaberite **Manage Instrument** (Upravljanje instrumentom), **System Configuration** (Konfiguracija sustava), a zatim **BeadChip Scan Configuration** (Konfiguracija skeniranja pločice BeadChip).

Prilikom instalacije instrumenta NextSeq 550Dx predstavnik tvrtke Illumina preuzima te datoteke i u kontrolnom softveru navodi stazu do njih. Nema potrebe da se te datoteke mijenjaju osim u slučaju njihova gubitka ili ako je dostupna nova verzija. Da biste saznali više, pročitajte odjeljak *Zamjena datoteka manifesta i datoteka klastera na stranici 49.*

Tijek rada skeniranja



Preuzimanje mape DMAP

Mapi DMAP možete pristupiti pomoću klijenta za dekodiranje datoteka putem računala ili pločice BeadChip (zadani prikaz).

Pristup mapi DMAP putem računala

- 1 Na glavnoj kartici softvera Decode File Client odaberite mogućnost preuzimanja:
 - ▶ AutoPilot (Automatski pilot)
 - ▶ All BeadChips not yet downloaded (Sve pločice BeadChip još nisu preuzete)
 - ▶ All BeadChips (Sve pločice BeadChip)
 - ▶ BeadChips by Purchase Order (Pločice BeadChip prema narudžbenici)
 - ▶ BeadChips by barcode (Pločice BeadChip prema crtičnom kodu)
- 2 Unesite tražene podatke.

- 3 Pronađite mapu DMAP koju želite preuzeti.
- 4 Provjerite imate li dovoljno slobodnog prostora na odredištu za preuzimanje.
- 5 Pokrenite preuzimanje. Prikažite status preuzimanja na kartici Download Status (Status preuzimanja) i Log (Zapisnik).
- 6 Spremite mapu DMAP na navedenu lokaciju mape DMAP.

Pristup mapi DMAP od strane pločice BeadChip

- 1 Identificirajte pločice BeadChip koristeći se dvjema od sljedećih mogućnosti:
 - ▶ Crtični kôd pločice BeadChip
 - ▶ ID kutije s pločicama BeadChip
 - ▶ Broj narudžbenice
 - ▶ Broj računa
- 2 Pronađite mapu DMAP koju želite preuzeti.
- 3 Provjerite imate li dovoljno slobodnog prostora na odredištu za preuzimanje.
- 4 Pokrenite preuzimanje. Prikažite status preuzimanja na kartici Download Status (Status preuzimanja) i Log (Zapisnik).
- 5 Spremite mapu DMAP na navedenu lokaciju mape DMAP.

Umetanje pločice BeadChip u prilagodnik

- 1 Pritisnite dolje kvačicu za držanje prilagodnika. Kvačica se lagano nagine unatrag da bi se otvorila.
- 2 Držeći BeadChip za rubove, usmjerite BeadChip tako da crtični kôd bude blizu kvačice za držanje i postavite BeadChip u utor prilagodnika.

Slika 19 Umetanje pločice BeadChip u prilagodnik



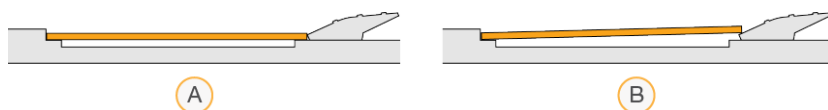
- 3 Pomoću otvora sa svake strane pločice BeadChip provjerite je li BeadChip dobro namješten u utoru prilagodnika.

Slika 20 Namještanje i učvršćivanje pločice BeadChip



- 4 Blago otpustite kvačicu za držanje da biste učvrstili BeadChip.
- 5 Pregledajte BeadChip sa strane da biste se uvjerali da je posve ravan u prilagodniku. Ako je potrebno, ponovno namjestite BeadChip.

Slika 21 Provjera položaja pločice BeadChip



- A Pravilan položaj – kad se otpusti kvačica, BeadChip stoji ravno u prilagodniku.
B Nepravilan položaj – kad se kvačica otpusti, BeadChip nije posve ravan.

Postavljanje skeniranja

- 1 Na početnom zaslonu odaberite **Experiment** (Eksperiment), a zatim **Scan** (Skeniranje). Naredbom Scan (Skeniranje) otvaraju se vrata odjeljka za snimanje, izbacuje potrošni materijal iz prethodne obrade (ako ga ima) i otvara niz zaslona za postavljanje skeniranja. Kratak zastoj je normalan.

Vađenje potrošnog materijala za sekvenciranje

Ako je upotrijebljen potrošni materijal za sekvenciranje u uređaju kad postavljate skeniranje, softver će od vas zatražiti da prije prijelaza na sljedeći korak uklonite spremnik reagensa i spremnik pufera.

- 1 Ako se to od vas zatraži, uklonite upotrijebljen potrošni materijal za sekvenciranje preostao iz prethodne obrade sekvenciranjem.
 - a Iz odjeljka za reagense izvadite spremnik reagensa. Neiskorišteni sadržaj bacite u otpad u skladu s primjenjivim normama.
 - b Iz odjeljka za pufer izvadite upotrijebljeni spremnik pufera.



UPOZORENJE

Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku katu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti potražite u sigurnosno-tehničkoj listu na adresi support.illumina.com/sds.html.

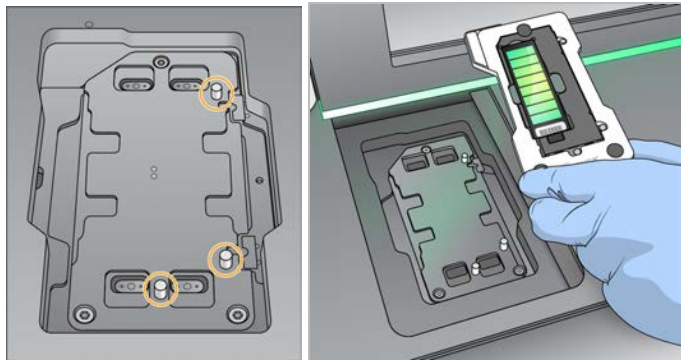
- 2 Iz odjeljka za slikanje izvadite protočni članak.

- 3 Zatvorite vrata spremnika reagensa i pufera.

Umetanje prilagodnika za BeadChip

- 1 Pomoću zatika za poravnanje pozicionirajte prilagodnik za BeadChip na postolje.

Slika 22 Umetanje prilagodnika za BeadChip



- 2 Odaberite **Load** (Umetanje).
Vrata se automatski zatvaraju, na zaslonu se prikazuje ID pločice BeadChip te se provjeravaju senzori. Kratak zastoj je normalan. Ako se crtični kod pločice BeadChip ne može očitati, pojavljuje se dijaloški okvir koji omogućuje ručni unos crtičnog koda. Pročitajte odjeljak *Softver ne može očitati crtični kod pločice BeadChip na stranici 48*.
- 3 Odaberite **Next** (Dalje).

Postavljanje skeniranja

- 1 Na zaslonu Scan Setup (Postavljanje skeniranja) potvrdite sljedeće informacije:
 - ▶ **Barcode** (Crtični kôd) – softver očitava crtični kôd pločice BeadChip kad se umetne BeadChip. Ako je crtični kôd ručno unesen, za dodatne promjene pojavljuje se gumb Edit (Uredi).
 - ▶ **Type** (Vrsta) – polje s vrstom pločice BeadChip automatski se popunjava na temelju crtičnog koda pločice BeadChip.
 - ▶ **DMAP Location** (Lokacija DMAP-a) – lokacija mape DMAP navedena je na zaslonu za konfiguraciju skeniranja pločice BeadChip. Da biste promijenili tu lokaciju samo za trenutno skeniranje, odaberite **Browse** (Pregledaj) i idite na točnu lokaciju.
 - ▶ **Output Location** (Lokacija izlaznih datoteka) – lokacija izlaznih datoteka navedena je na zaslonu za konfiguraciju skeniranja pločice BeadChip. Da biste promijenili tu lokaciju samo za trenutno skeniranje, odaberite **Browse** (Pregledaj) i idite na željenu lokaciju.
- 2 Odaberite **Next** (Dalje).

Pregled provjere prije obrade

Softver provodi automatiziranu provjeru sustava prije obrade. Tijekom te provjere na zaslonu se pojavljuju sljedeći indikatori:

- ▶ **Siva kvačica** 🚫 – provjera još nije provedena.
- ▶ **Ikona napretka** 🔄 – provjera je u tijeku.
- ▶ **Zelena kvačica** ✅ – provjera je uspješno završena.

- ▶ **Crveni križić** ✖ – provjera nije prošla. Za sve stavke koje ne prođu provjeru nužna je neka radnja prije nastavka. Pročitajte *Rješavanje pogrešaka automatske provjere na stranici 44*.

Da biste zaustavili automatiziranu provjeru prije obrade koja je u tijeku, odaberite gumb **Cancel** (Odustani). Da biste ponovno pokrenuli provjeru, odaberite gumb **Retry** (Ponovno pokušaj). Provjera se nastavlja od prve nedovršene ili neuspjele provjere.

Da biste prikazali rezultate svake pojedine provjere u kategoriji, odaberite karticu Category (Kategorija).

Ako instrument nije konfiguriran za automatsko pokretanje obrade, pokrenite obradu nakon dovršetka automatizirane provjere prije obrade.

Pokretanje skeniranja

Kad završi automatska provjera, odaberite **Start** (Pokreni). Time počinje skeniranje.

Da biste konfigurirali sustav da automatski pokrene skeniranje nakon uspješne provjere, pročitajte *Postavljanje mogućnosti postavljanja obrade na stranici 13*.

Praćenje napretka skeniranja

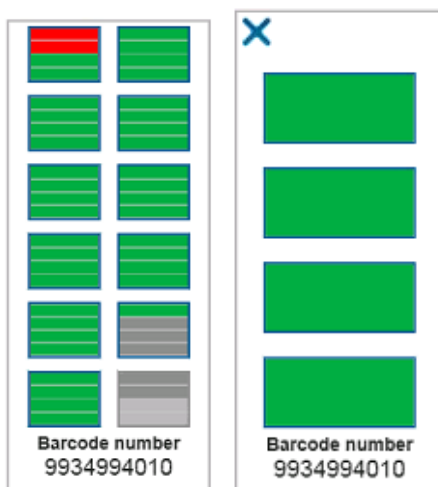
- 1 Pratite tijek skeniranja koristeći se slikom pločice BeadChip. Svaka boja na slici ukazuje na status skeniranja.

- ▶ **svijetlosiva** – nije skenirano
- ▶ **tamnosiva** – skenirano, ali nije registrirano
- ▶ **zelena** – uspješno skenirano i registrirano
- ▶ **crvena** – skeniranje i registracija nisu uspjeli

Ako registracija ne uspije, možete ponovno skenirati uzorke koji sadrže odjeljke koji nisu uspješno obrađeni. Pročitajte *Neuspjelo skeniranje pločice BeadChip na stranici 48*.

- 2 Odaberite sliku pločice BeadChip da biste mijenjali prikaz između punog prikaza i detaljnog prikaza odabranog uzorka.
 - ▶ Puni prikaz prikazuje uzorke na pločici BeadChip i odjeljke u svakom uzorku.
 - ▶ Detaljni prikaz prikazuje svaki odjeljak u odabranom uzorku.

Slika 23 Slika pločice BeadChip: puni i detaljni prikaz



NAPOMENA Prekidanje skeniranja je konačno. Ako prekinete skeniranje prije njegova dovršetka, podaci dobiveni skeniranjem *neće* se spremići.

Prijenos podataka

Po dovršetku skeniranja podaci se stavljaju u red čekanja na prijenos u izlaznu mapu skeniranja. Podaci se privremeno zapisuju na računalo instrumenta. Privremena se mapa automatski briše s računala instrumenta kad se pokrene sljedeće skeniranje.

Vrijeme potrebno za prijenos podataka ovisi o vašoj mrežnoj vezi. Prije početka sljedećeg skeniranja provjerite jesu li podaci doista zapisani u izlaznu mapu. Da biste to provjerali, pogledajte nalaze li se GTC datoteke u mapi s crtičnim kodom. Da biste saznali više, pročitajte *Struktura izlazne mape pri skeniranju na stranici 63*.

Ako se prekine veza, prijenos podataka automatski se nastavlja kad se veza ponovno uspostavi. Svaka datoteka ima mjerač vremena postavljen na 1 sat kad se stavi u red čekanja za prijenos u izlaznu mapu. Kad mjerač vremena istekne ili se instrument ponovno pokrene prije dovršetka prijenosa, podaci se neće zapisati u izlaznu mapu.

Poglavlje 5 Održavanje

| | |
|--|----|
| Uvod | 35 |
| Provođenje ručnog ispiranja | 35 |
| Zamjena filtra za zrak | 38 |
| Ažuriranja softvera | 39 |
| Mogućnosti ponovnog pokretanja i isključivanja | 41 |

Uvod

Postupci održavanja obuhvaćaju ručna ispiranja instrumenta i zamjenu filtra za zrak. Opisane su i mogućnosti isključivanja i ponovnog podizanja instrumenta.

- ▶ **Ispiranja instrumenta** – automatsko ispiranje nakon obrade nakon svake obrade sekvenciranjem održava radne značajke instrumenta. No, povremeno je uz određene uvjete nužno ručno ispiranje. Pročitajte odjeljak *Provođenje ručnog ispiranja na stranici 35*.
- ▶ **Zamjena filtra za zrak** – redovita zamjena filtra za zrak osigurava pravilan protok zraka kroz instrument.

Preventivno održavanje

Illumina preporučuje da svake godine zakažete uslugu preventivnog održavanja. Ako niste pod servisnim ugovorom, obratite se voditelju odnosa s korisnicima za regiju ili službi za podršku tvrtke Illumina da biste dogovorili servis za preventivno održavanje koji se plaća.

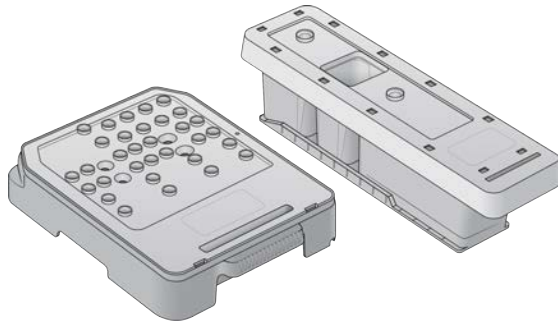
Provođenje ručnog ispiranja

Ručna ispiranja pokreću se s početnog zaslona. Mogućnosti ispiranja obuhvaćaju brzo ispiranje i ručno ispiranje poslije obrade.

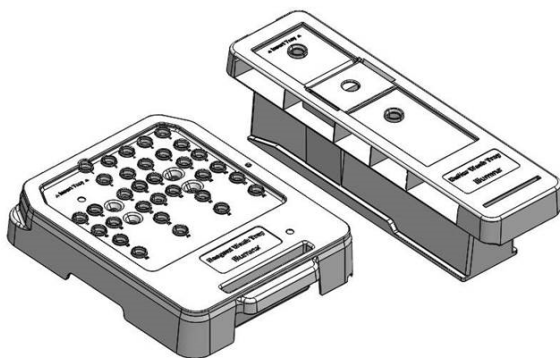
| Vrste ispiranja | Opis |
|---|---|
| Brzo ispiranje Trajanje: 20 minuta | Ispire sustav otopinom za ispiranje koju pribavlja korisnik, a koju čine voda laboratorijske kvalitete i Tween 20 (spremnik pufera za ispiranje). <ul style="list-style-type: none">• Potrebno svakih 14 dana kad je instrument u mirovanju s umetnutim spremnikom reagensa i spremnikom pufera.• Potrebno svakih 7 dana kad je instrument u suhom stanju (spremnik reagensa i spremnik pufera su izvađeni). |
| Ručno ispiranje nakon obrade Trajanje: 90 minuta | Ispire sustav otopinom za ispiranje koju pribavlja korisnik, a koju čine voda laboratorijske kvalitete, Tween 20 (spremnik pufera za ispiranje) i natrijev hipoklorit koncentracije 0,12 % (spremnik reagensa za ispiranje). Potrebno ako nije provedeno automatsko ispiranje nakon obrade. |

Za ručno ispiranje potrebni su spremnik reagensa za ispiranje i spremnik pufera za ispiranje koji dolaze s instrumentom te upotrijebljen protočni članak. Upotrijebljen protočni članak može se upotrijebiti najviše 20 puta za ispiranje instrumenta.

Slika 24 Prvotni izgled spremnika reagensa za ispiranje i pufera za ispiranje.



Slika 25 Novi izgled spremnika reagensa za ispiranje i pufera za ispiranje.



Priprema za ručno ispiranje nakon obrade

Odaberite pripremu za ručno ispiranje nakon obrade kao što je opisano u nastavku ili pripremu za brzo ispiranje (sljedeći odjeljak). Ako ste namjeravali izvesti ručno ispiranje nakon obrade, preskočite odjeljak o brzom ispiranju i prijdite na *Umetanje upotrijebljenog protočnog članka i spremnika za ispiranje* na stranici 37.

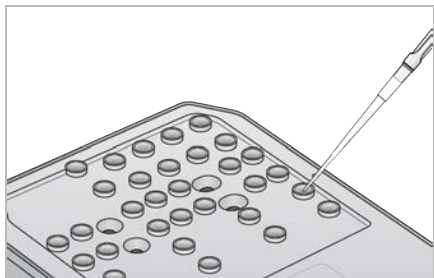
| Potrošni materijal koji mora pribaviti korisnik | Volumen i opis |
|---|--|
| NaOCl | 1 ml, razrijeđen na 0,12 % Stavljeno u spremnik reagensa za ispiranje (položaj br. 28) |
| 100% Tween 20 Voda laboratorijske kvalitete | Upotrijebljena za izradu 125 ml otopine za ispiranje Tween 20 koncentracije 0,05 % Stavljeno u spremnik pufera za ispiranje (srednji rezervoar) |

NAPOMENA Uvijek upotrebljavajte svježu otopinu natrijeva hipoklorita (NaOCl) pripremljenu u posljednja **24 sata**. Ako napravite volumen veći od 1 ml, pohranite preostalu otopinu na temperaturi između 2 °C i 8 °C za upotrebu u sljedeća 24 sata. U suprotnom, bacite preostalu otopinu NaOCl.

- Pomiješajte sljedeće volumene u epruveti za mikrocentrifugu da biste dobili 1 ml natrijeva hipoklorita koncentracije 0,12 %:
 - ▶ NaOCl (24 µl) koncentracije 5 %
 - ▶ Voda laboratorijske kvalitete (976 µl)
- Preokrenite epruvetu da biste promiješali.

- 3 Dodajte 1 ml 0,12-postotnog natrijeva hipoklorita u spremnik reagensa za ispiranje. Odgovarajući rezervoar je ekvivalentan položaju br.28 na unaprijed napunjenom spremniku.

Slika 26 Umetanje natrijeva hipoklorita



- 4 Kombinirajte sljedeće volumene da biste dobili otopinu za ispiranje Tween 20 koncentracije 0,05 %:

Prvotni izgled spremnika pufera za ispiranje

 - ▶ 100% Tween 20 (62 µl)
 - ▶ Voda laboratorijske kvalitete (125 ml)
 - ▶ Dodajte 125 ml otopine za ispiranje u središnji rezervoar spremnika pufera za ispiranje.

Novi izgled spremnika pufera za ispiranje

 - ▶ 100% Tween 20 (75 µl)
 - ▶ Voda laboratorijske kvalitete (150 ml)
 - ▶ Dodajte 150 ml otopine za ispiranje u središnji rezervoar spremnika pufera za ispiranje.
- 5 Odaberite **Perform Wash** (Ispiranje), a zatim **Manual Post-Run Wash** (Ručno ispiranje nakon obrade).

Priprema za brzo ispiranje

Možete se pripremiti za brzo ispiranje slijedeći upute u nastavku kao alternativu postupku *Priprema za ručno ispiranje nakon obrade na stranici 36*.

| Potrošni materijal koji mora pribaviti korisnik | Volumen i opis |
|---|--|
| 100% Tween 20 Voda laboratorijske kvalitete | Upotrijebljena za izradu 40 ml otopine za ispiranje Tween 20 koncentracije 0,05 % Umeće se u spremnik pufera za ispiranje (središnji rezervoar) |

- 1 Kombinirajte sljedeće volumene da biste dobili otopinu za ispiranje Tween 20 koncentracije 0,05 %:
 - ▶ 100% Tween 20 (20 µl)
 - ▶ voda laboratorijske kvalitete (40 ml)
- 2 Dodajte 40 ml otopine za ispiranje u središnji rezervoar spremnika pufera za ispiranje.
- 3 Odaberite **Perform Wash** (Ispiranje), a zatim **Quick Wash** (Brzo ispiranje).

Umetanje upotrijebljenog protočnog članka i spremnika za ispiranje

- 1 Ako nema upotrijebljenog protočnog članka, umetnite ga. Odaberite **Load** (Umetanje), a zatim **Next** (Dalje).

- Uklonite spremnik potrošenih reagensa i bacite sadržaj u otpad u skladu s primjenjivim normama.



UPOZORENJE

Taj skup reagensa sadrži potencijalno opasne kemikalije. Uslijed udisanja, gutanja te dodira s kožom i očima može doći do tjelesnih ozljeda. Nosite zaštitnu opremu, uključujući zaštitu za oči, rukavice i laboratorijsku kutu prikladnu za rizik od izlaganja. Iskorištenim reagensima rukujte kao kemijskim otpadom i zbrinite ih u skladu odgovarajućim regionalnim, nacionalnim i mjesnim zakonima i propisima. Dodatne informacije o zaštiti okoliša, zdravlja i sigurnosti potražite u sigurnosno-tehničkom listu na adresi support.illumina.com/sds.html.

- Klizanjem umetnite prazan spremnik potrošenih reagensa u odjeljak za pufer dok se ne zaustavi.
- Uklonite potrošeni spremnik pufera iz prethodne obrade ako je još umetnut.
- Umetnite spremnik pufera za ispiranje koji sadrži otopinu za ispiranje.
- Uklonite potrošeni spremnik reagensa iz prethodne obrade ako je još umetnut.
- Umetnite spremnik reagensa za ispiranje.
- Odaberite **Next** (Dalje). Automatski se pokreće provjera prije ispiranja.

Pokretanje ispiranja

- Odaberite **Start** (Pokreni).
- Kad se ispiranje dovrši, odaberite **Home** (Početak).

Nakon ispiranja

Nakon ispiranja dozatori ostaju u donjem položaju kako zrak ne bi ušao u sustav. Ostavite spremnike gdje jesu do sljedeće obrade.

Zamjena filtra za zrak

Novi sustavi dolaze s tri rezervna filtra za zrak. Njih treba pohraniti i upotrijebiti kad instrument od vas zatraži da zamijenite filter.

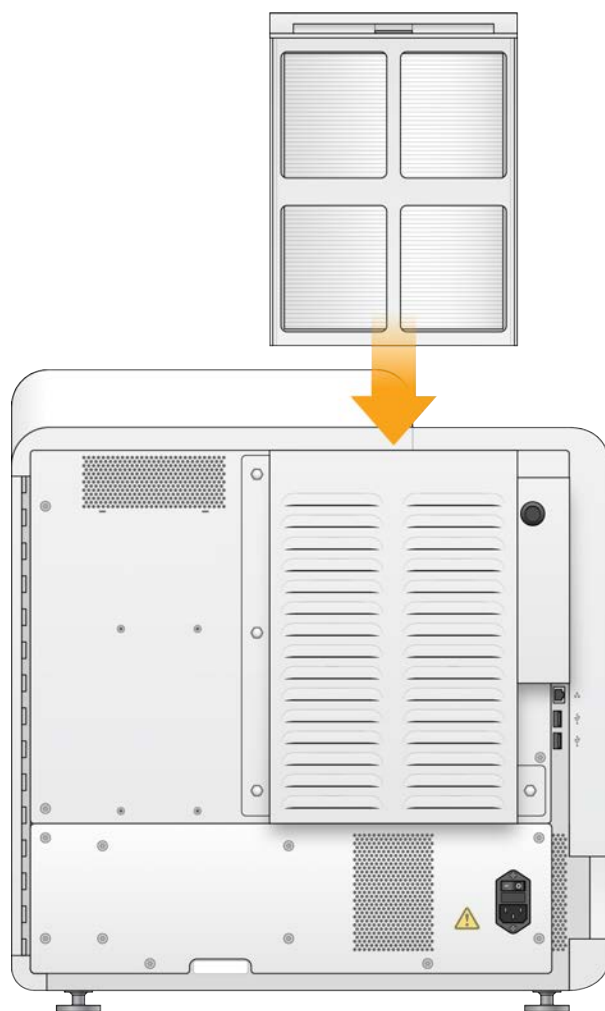
Filter za zrak osigurava protok zraka kroz instrument. Softver prikazuje obavijest da je svakih 90 dana potrebno promijeniti filter za zrak. Kad se to od vas zatraži, odaberite **Remind in 1 day** (Podsjeti me za 1 dan) ili slijedite sljedeći postupak i odaberite **Filter Changed** (Filter je promijenjen). Odbrojavanje od 90 dana resetira sljedeći odabir **Filter Changed** (Filter je promijenjen).

- Izvadite novi filter za zrak iz pakiranja i na okviru filtra zabilježite datum kad ste ga postavili.
- Na poleđini instrumenta pritisnite nadolje vrh ladice s filtrom da biste oslobodili ladicu.
- Primite vrh ladice s filtrom i povucite nagore da biste ladicu posve podigli iz instrumenta.
- Uklonite stari filter za zrak i bacite ga u otpad.
- U ladicu umetnite novi filter za zrak.

NAPOMENA Filter za zrak ne funkcionira pravilno ako je postavljen naopako. Pripazite da filter za zrak umetnete u ladicu tako da vidite zelenu strelicu "Up" (Gore), a da ne vidite naljepnicu s upozorenjem. Strelica mora pokazivati prema ručki ladice za filter.

- Gurnite ladicu s filtrom u instrument. Gurnite vrh ladice s filtrom nadolje dok ne klikne na mjesto.

Slika 27 Umetanje filtra za zrak




Ažuriranja softvera

Ažuriranja softvera oblikovana su u softverski paket pod nazivom System Suite koji obuhvaća sljedeći softver:

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

Softverska ažuriranja možete instalirati automatski pomoću internetske veze ili pak ručno s mreže ili USB pogona.

- ▶ **Automatska ažuriranja** – za instrumente povezane na mrežu s pristupom internetu; kad je dostupno ažuriranje, ikona upozorenja  pojavljuje se na gumbu Manage Instrument (Upravljaj instrumentom) na početnom zaslonu.
- ▶ **Ručna ažuriranja** – preuzmite program za instalaciju paketa System Suite sa [stranice s podrškom za instrument NextSeq 550Dx](#) na web-mjestu tvrtke Illumina.

Automatsko ažuriranje softvera

- 1 Odaberite **Manage Instrument** (Upravljanje instrumentom).
- 2 Odaberite **Software Update** (Ažuriranje softvera).
- 3 Odaberite **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Instaliraj ažuriranje već preuzeto sa servisa BaseSpace).
- 4 Odaberite **Update** (Ažuriraj) da biste pokrenuli ažuriranje. Otvara se dijaloški okvir u kojem se potvrđuje ta naredba.
- 5 Pratite upite čarobnjaka za instalaciju:
 - a prihvatite licencni ugovor
 - b pregledajte napomene uz izdanje
 - c pregledajte popis softvera uključenog u ažuriranje

Kad se ažuriranje dovrši, kontrolni softver automatski se ponovno pokreće.

NAPOMENA Ako je u to uključeno ažuriranje firmvera, nakon ažuriranja firmvera obavezno je automatsko ponovno pokretanje sustava.

Ručno ažuriranje softvera

- 1 Preuzmite program za instalaciju paketa System Suite s web-mjesta tvrtke Illumina i spremite ga na neku mrežnu lokaciju.
Možete i kopirati datoteku za instalaciju softvera na prijenosni USB pogon.
- 2 Odaberite **Manage Instrument** (Upravljanje instrumentom).
- 3 Odaberite **Software Update** (Ažuriranje softvera).
- 4 Odaberite **Manually install the update from the following location** (Ručno instaliraj ažuriranje sa sljedeće lokacije).
- 5 Odaberite **Browse** (Pregledaj) da biste otišli na lokaciju datoteke za instalaciju softvera, a zatim odaberite **Update** (Ažuriraj).
- 6 Pratite upite čarobnjaka za instalaciju:
 - a prihvatite licencni ugovor
 - b pregledajte napomene uz izdanje
 - c pregledajte popis softvera uključenog u ažuriranje

Kad se ažuriranje dovrši, kontrolni softver automatski se ponovno pokreće.

NAPOMENA Ako je u to uključeno ažuriranje firmvera, nakon ažuriranja firmvera obavezno je automatsko ponovno pokretanje sustava.

Mogućnosti ponovnog pokretanja i isključivanja

Pristupite sljedećim značajkama tako da odaberete gumb Reboot / Shutdown (Ponovno podizanje / isključivanje):

- ▶ Reboot to RUO (Ponovno podizanje u načinu rada RUO) – instrument se pokreće u istraživačkom načinu rada.
- ▶ Restart (Ponovno pokretanje) – instrument se pokreće u dijagnostičkom načinu rada.
- ▶ Restart to Dx from RUO (Ponovno pokretanje u načinu Dx iz načina RUO) – instrument se pokreće u dijagnostičkom načinu rada.
- ▶ Shutdown (Isključivanje) – kad se ponovno uključi, instrument će se pokrenuti u dijagnostičkom načinu rada.
- ▶ Exit to Windows (Izlaz u Windows) – ovisno o dozvolama, možete zatvoriti NCS i prikazati Windows.

Ponovno pokretanje u dijagnostičkom načinu rada

Pomoću naredbe Restart (Ponovno pokreni) isključite instrument na siguran način i ponovno ga pokrenite u dijagnostičkom načinu rada. Dijagnostički način rada zadani je način pokretanja sustava.

- 1 Odaberite **Manage Instrument** (Upravljanje instrumentom).
- 2 Odaberite **Reboot / Shutdown** (Ponovno podigni / isključi).
- 3 Odaberite **Restart** (Ponovno pokreni).

Isključivanje instrumenta

- 1 Odaberite **Manage Instrument** (Upravljanje instrumentom).
- 2 Odaberite **Reboot / Shutdown** (Ponovno podigni / isključi).
- 3 Odaberite **Shutdown** (Isključi).

Naredbom Shutdown (Isključi) sigurno se isključuju softver i napajanje instrumenta. Pričekajte barem 60 sekundi prije ponovnog uključivanja instrumenta.

NAPOMENA Prema zadanim postavkama instrument se prilikom pokretanja podiže u dijagnostičkom načinu rada.



OPREZ

Nemojte premještati instrument. Nepravilnim pomicanjem instrumenta možete utjecati na optičko poravnanje i ugroziti integritet podataka. Ako uređaj morate premjestiti na drugu lokaciju, obratite se predstavniku tvrtke Illumina.

Exit to Windows (Izlaz u Windows)

Naredba Exit to Windows (Izlaz u Windows) omogućuje pristup operacijskom sustavu instrumenta i bilo kojoj mapi na računalu instrumenta. Ta naredba na siguran način isključuje softver i izlazi u Windows. Samo administrator korisnika može izaći u Windows.

- 1 Odaberite **Manage Instrument** (Upravljanje instrumentom).
- 2 Odaberite **Reboot / Shutdown** (Ponovno podigni / isključi).
- 3 Odaberite **Exit to Windows** (Izlaz u Windows).

Dodatak A Otklanjanje poteškoća

| | |
|--|----|
| Uvod | 43 |
| Otklanjanje poteškoća s datotekama | 43 |
| Rješavanje pogrešaka automatske provjere | 44 |
| Spremnik potrošenih reagensa je pun | 46 |
| Tijek rada ponovne hibridizacije | 46 |
| BeadChip i pogreške u skeniranju | 48 |
| Prilagođeni recepti i mape s receptima | 50 |
| Poruka o pogrešci RAID-a | 50 |
| Konfiguracija postavki sustava | 50 |

Uvod

Ako imate problema s kvalitetom obrade ili radnim značajkama, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. Pročitajte odjeljak *Tehnička pomoć na stranici 69*.

Otklanjanje poteškoća s datotekama

Predstavnik službe za tehničku podršku tvrtke Illumina može zatražiti primjerke datoteka specifičnih za obradu ili skeniranje radi otklanjanja poteškoća. Obično se pri otklanjanju poteškoća upotrebljavaju sljedeće datoteke.

Otklanjanje poteškoća s datotekama za obrade sekvenciranjem

| Ključna datoteka | Mapa | Opis |
|--|------------------|---|
| Datoteka s informacijama o obradi (RunInfo.xml) | Korijenska mapa | Sadrži sljedeće informacije: <ul style="list-style-type: none">• naziv obrade• broj ciklusa u obradi• broj ciklusa u svakom očitavanju• je li očitavanje indeksirano• broj gredica i kvadratića na protočnom članku |
| Datoteka s parametrima obrade (RunParameters.xml) | Korijenska mapa | Sadrži informacije o parametrima i komponentama obrade. Među tim su informacijama RFID, serijski broj, broj dijela i datum isteka roka trajanja. |
| Datoteka RTA konfiguracije (RTAConfiguration.xml) | Korijenska mapa | Sadrži postavke RTA konfiguracije za obradu. Datoteka RTAConfiguration.xml stvara se na početku obrade. |
| Datoteke o internim operacijama (InterOp) (*.bin) | InterOp | Binarne datoteke za izvješćivanje. Datoteke o internim operacijama ažuriraju se tijekom obrade. |
| Datoteke zapisnika | Zapisnici | U datotekama zapisnika opisuju se svaki korak koji instrument izvodi u svakom ciklusu te se navode verzije softvera i firmvera korištene uz obradu. U datoteci pod nazivom [NazivInstrumenta]_CurrentHardware.csv navode se serijski brojevi dijelova instrumenta. |
| Datoteke sa zapisnicima pogrešaka (*ErrorLog*.txt) | Zapisnici za RTA | Zapisnik pogrešaka za RTA. Datoteke sa zapisnicima pogreška ažuriraju se svaki put kad se pojavi pogreška. |
| Globalne datoteke zapisnika (*GlobalLog*.tsv) | Zapisnici za RTA | Zapisnik o svim događajima RTA. Globalne datoteke zapisnika ažuriraju se tijekom obrade. |

| Ključna datoteka | Mapa | Opis |
|--|------------------|---|
| Datoteke zapisnika o stazama (*LaneLog*.txt) | Zapisnici za RTA | Zapisuje događaje obrade koju izvodi RTA. Datoteke zapisnika o stazama ažuriraju se tijekom obrade. |

RTA pogreške

Da biste otklonili RTA pogreške, prvo provjerite zapisnik o RTA pogreškama koji je pohranjen u mapi RTALogs (RTA Zapisnici). Kod uspješnih obrada nema te datoteke. Prilikom prijave problema službi za tehničku podršku tvrtke Illumina priložite zapisnik o pogreškama.

Otklanjanje poteškoća s datotekama za skeniranje mrežica

| Ključna datoteka | Mapa | Opis |
|--|-----------------|--|
| Datoteka s parametrima skeniranja (ScanParameters.xml) | Korijenska mapa | Sadrži informacije o parametrima skeniranja. Informacije obuhvaćaju datum skeniranja, crtični kôd pločice BeadChip te lokacije datoteka klastera i manifesta. |
| Datoteke zapisnika | Zapisnici | U datotekama zapisnika opisuje se svaki korak napravljen na instrumentu tijekom skeniranja. |
| Datoteke s mjernim podacima | [Crtični kôd] | Mjerni podaci navode se kao mjerni podaci za uzorak i odjeljak. [crtični kôd]_sample_metrics.csv – za svaki uzorak i kanal (crveni i zeleni) navode se podaci Percent Off Image (Postotak izvan slike), Percent Outliers (Postotak koji je izvan), P05, P50, P95, Avg FWHM Avg (Prosjeak FWHM prosjeak), FWHM Stddev (FWHM stand. devijacija) i Min Registration Score (Minimalan rezultat registriranja). [crtični kôd]_section_metrics.csv – za svaki odjeljak i kvadratić navode se podaci Laser Z-position (Z-položaj lasera), Through Focus Z-position (Z-položaj kroz fokus), Red FWHM (Crveni FWHM), Green FWHM (Zeleni FWHM), Red Avg Pixel Intensity (Prosječan intenzitet piksela za crveno), Green Avg Pixel Intensity (Prosječan intenzitet piksela za zeleno), Red Registration Score (Rezultat registriranja za crveno) i Green Registration Score (Rezultat registriranja za zeleno). |
| Datoteka ponovnog skeniranja | [Crtični kôd] | [crtični kôd]_rescan.flowcell – navodi lokacije kvadratića prilagođenih za ponovno skeniranje, što uključuje povećano preklapanje kvadratića s kvadratićem. |

Rješavanje pogrešaka automatske provjere

Ako se tijekom automatske provjere pojave pogreške, riješite pogrešku pomoću sljedećih preporučenih radnji.

Provjere za obrade sekvenciranjem

Ako provjera prije obrade ne uspije, RFID spremnika reagensa nije zaključan i može se upotrebljavati u narednoj obradi. No, RFID-ovi protočnog članka, spremnika s reagensima i spremnika s puferima bit će zaključani tijekom inicijalizacije kontrolnog softvera, što može biti potrebno za razrješavanje pogreške. Korisnik mora prije ponovnog pokretanja sustava iz instrumenta ukloniti protočni članak te spremnik s reagensima i puferima. Uz to se RFID-ovi potrošnog materijala zaključavaju nakon bušenja zaštitnih folija. Kad softver pročita RFID protočnog članka, pokreće se mjerač vremena koji odbrojava 7 sati do zaključavanja protočne ćelije, nakon čega će se ona smatrati neupotrebljivom.

| Provjere sustava | Preporučena radnja |
|------------------------------|---|
| Vrata zatvorena | Provjerite jesu li vrata odjeljaka zatvorena. |
| Umetnut potrošni materijal | Senzori za potrošni materijal nisu ga registrirali. Provjerite je li svaki potrošni materijal pravilno umetnut. Na zaslonima za postavljanje obrade odaberite Back (Natrag) da biste se vratili na korak umetanja i ponovite postavljanje obrade. |
| Obavezan softver | Nedostaju kritične softverske komponente. Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Prostor na disku instrumenta | Na tvrdom disku instrumenta nema dovoljno prostora za izvođenje obrade. Podaci iz prethodne obrade možda nisu preneseni. Očistite podatke o obradi s tvrdog diska instrumenta. |
| Mrežna veza | Mrežna veza je prekinuta. Provjerite status mreže i fizičku mrežnu vezu. |
| Prostor na mrežnom disku | Mrežni poslužitelj je pun. |

| Temperatura | Preporučena radnja |
|---------------------|---|
| Temperatura | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Senzori temperature | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Ventilatori | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |

| Sustav za snimanje | Preporučena radnja |
|-------------------------------|--|
| Ograničenja snimanja | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Z Steps-and-Settle | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Brzina pogreške u bitovima | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Registracija protočnog članka | Protočni članak možda nije dobro namješten. <ul style="list-style-type: none"> Na zaslonima za postavljanje obrade odaberite Back (Natrag) da biste se vratili na korak s protočnim člankom. Otvaraju se vrata odjeljaka za snimanje. Izvadite i ponovno umetnite protočni članak da biste se uvjerali da je dobro namješten. |

| Dotok reagensa | Preporučena radnja |
|--------------------------------|---|
| Odziv ventila | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Pumpa | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Mehanizam pufera | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Pražnjenje potrošenih reagensa | Ispraznite spremnik s potrošenim reagensima i ponovno umetnite prazan spremnik. |

Provjere za skeniranje mrežica

| Provjere sustava | Preporučena radnja |
|----------------------------|---|
| Vrata zatvorena | Provjerite jesu li vrata odjeljaka zatvorena. |
| Umetnut potrošni materijal | Senzori za potrošni materijal nisu ga registrirali. Provjerite je li svaki potrošni materijal pravilno umetnut. Na zaslonima za postavljanje obrade odaberite Back (Natrag) da biste se vratili na korak umetanja i ponovite postavljanje obrade. |
| Obavezan softver | Nedostaju kritične softverske komponente. Ručno ažurirajte softver da biste vratili sve softverske komponente. |

| Provjere sustava | Preporučena radnja |
|------------------------------|--|
| Provjera ulaznih datoteka | Provjerite da je staza do datoteke klastera i datoteke manifesta točna i da te datoteke postoje. |
| Prostor na disku instrumenta | Na tvrdom disku instrumenta nema dovoljno prostora za izvođenje obrade. Podaci iz prethodne obrade možda nisu preneseni. Očistite podatke o obradi s tvrdog diska instrumenta. |
| Mrežna veza | Mrežna veza je prekinuta. Provjerite status mreže i fizičku mrežnu vezu. |
| Prostor na mrežnom disku | Račun za BaseSpace je pun ili je mrežni poslužitelj pun. |

| Sustav za snimanje | Preporučena radnja |
|----------------------------|--|
| Ograničenja snimanja | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Z Steps-and-Settle | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Brzina pogreške u bitovima | Obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. |
| Automatsko centriranje | Izvadite prilagodnik za BeadChip. Provjerite je li BeadChip dobro namješten u prilagodniku, pa ponovno umetnite prilagodnik. |

Spremnik potrošenih reagensa je pun

Uvijek započnite obradu s praznim spremnikom potrošenih reagensa.

Ako počnete obradu a da prije niste ispraznili spremnik potrošenih reagensa, senzori sustava reći će softveru da pauzira obradu kad se spremnik posve napuni. Senzori sustava ne mogu pauzirati obradu tijekom stvaranja klastera, ponovne sinteza uparenih krajeva ili automatskog ispiranja nakon obrade.

Kad se obrada pauzira, otvara se dijaloški okvir s mogućnostima podizanja dozatora i pražnjenja punog spremnika.

Pražnjenje spremnika potrošenih reagensa

- 1 Odaberite **Raise Sippers** (Podigni dozatore).
- 2 Uklonite spremnik potrošenih reagensa i na odgovarajući način bacite njegov sadržaj u otpad.
- 3 Vratite prazan spremnik u odjeljak za pufer.
- 4 Odaberite **Continue** (Nastavak). Obrada se automatski nastavlja.

Tijek rada ponovne hibridizacije

Obrada ponovnom hibridizacijom može biti nužna ako mjerni podaci generirani tijekom prvih nekoliko ciklusa pokazuju intenzitete ispod 2500. Neke biblioteke s malom raznolikošću mogu pokazivati intenzitete ispod 1000, no to se očekuje i ne može se riješiti ponovnom hibridizacijom.

NAPOMENA Naredba End Run (Prekini obradu) je konačna. Obrada se ne može nastaviti, potrošni materijal za obradu ne može se ponovno upotrijebiti, a podaci dobiveni sekvenciranjem iz te obrade neće se spremiti.

Kad prekinete obradu, softver prije samog prekida obrade izvodi sljedeće korake:

- ▶ Stavlja protočni članak u sigurno stanje.
- ▶ Otključava RFID protočnog članka za neku kasniju obradu.
- ▶ Dodjeljuje protočnom članku datum isteka roka trajanja za ponovnu hibridizaciju.

- ▶ Zapisuje zapisnike o obradi za dovršene cikluse. Kašnjenje je normalno.
- ▶ Premošćuje automatsko ispiranje nakon obrade.

Kad pokrenete obradu ponovnom hibridizacijom, softver izvodi sljedeće korake da bi izvršio obradu:

- ▶ Stvara mapu obrade na temelju jedinstvenog naziva obrade.
- ▶ Provjerava da datum ponovne hibridizacije protočnog članka nije istekao.
- ▶ Puni reagense. Kašnjenje je normalno.
- ▶ Preskače korak klasteriranja.
- ▶ Uklanja prethodni primer za Read 1 (Očitanje 1).
- ▶ Hibridizira svježi primer za Read 1 (Očitanje 1).
- ▶ Nastavlja s očitanjem Read 1 (Očitanje 1) i ostatkom obrade na temelju navedenih parametara obrade.

Točke završetka obrade za ponovnu hibridizaciju

Kasnija ponovna hibridizacija moguća je samo ako ste zaustavili obradu u sljedećim točkama:

- ▶ **Nakon 5. ciklusa** – intenziteti se pojavljuju nakon registracije predloška za koju je potrebno prvih 5 ciklusa sekvenciranja. Iako je sigurno zaustaviti obradu nakon 1. ciklusa, preporučuje se zaustaviti obradu nakon 5. ciklusa. Nemojte prekinuti obradu tijekom generiranja klastera.
- ▶ **1. očitavanje ili indeksiranje 1. očitavanja** – zaustavite obradu *prije* početka ponovne sinteze uparenih krajeva. Protočni članak ne može se spremati za kasniju ponovnu hibridizaciju nakon početka ponovne sinteze uparenih krajeva.

Obavezan potrošni materijal

Za obradu s ponovnom hibridizacijom potrebni su novi spremnik reagensa za NextSeq 550Dx i spremnik za pufer bez obzira na to kad je obrada zaustavljena.

Završavanje trenutačne obrade

- 1 Odaberite **End Run** (Završi obradu). Kad se od vas zatraži da potvrdite naredbu, odaberite **Yes** (Da).
- 2 Kad se od vas zatraži da spremite protočni članak, odaberite **Yes** (Da). Imajte na umu datum isteka roka trajanja ponovne hibridizacije.
- 3 Uklonite spremljen protočni članak i odložite ga na temperaturi između 2 °C i 8 °C dok ne budete spremni za postavljanje obrade ponovnom hibridizacijom.

NAPOMENA Protočni članak možete pohraniti u trajanju do 7 dana na temperaturi između 2 °C i 8 °C u plastičnoj kutiji **bez** paketića isušivača (desikanta). Da biste postigli najbolje rezultate, ponovno hibridizirajte spremljen protočni članak unutar 3 dana.

Provođenje ručnog ispiranja

- 1 Na početnom zaslonu odaberite **Perform Wash** (Provedi ispiranje).
- 2 Na zaslonu Wash Selection (Odabir ispiranja) odaberite **Manual Post-Run Wash** (Ručno ispiranje nakon obrade). Pročitajte odjeljak *Provođenje ručnog ispiranja na stranici 35*.

NAPOMENA Ako iz zaustavljene obrade niste uklonili spremnik reagensa i spremnik pufera, možete ih upotrijebiti za ručno ispiranje. U suprotnom, provedite ručno ispiranje sa spremnikom reagensa za ispiranje i spremnikom pufera za ispiranje.

Postavljanje nove obrade na kartici BaseSpace Prep (Priprema za BaseSpace)

- 1 Ako je instrument konfiguriran za upotrebu servisa BaseSpace ili BaseSpace Onsite, postavite novu obradu na kartici Prep (Priprema) koristeći se istim parametrima kao u izvornoj obradi.

SAVJET Kliknite karticu Pools (Skupovi), odaberite odgovarajući ID skupa da biste zadržali postavke prethodne obrade, a zatim dodijelite jedinstveni naziv novoj obradi.

Postavljanje obrade na instrumentu

- 1 Pripremite novi spremnik reagensa.
- 2 Ako je spremljen protočni članak bio uskladišten, odložite ga na 15 – 30 minuta da dosegne sobnu temperaturu.
- 3 Očistite i umetnite spremljen protočni članak.
- 4 Uklonite spremnik potrošenih reagensa i na odgovarajući način bacite njegov sadržaj u otpad, a zatim ponovno umetnite prazan spremnik.
- 5 Umetnite nov spremnik pufera i spremnik reagensa.
- 6 Na zaslonu Run Setup (Pokretanje obrade) odaberite neku od sljedećih mogućnosti:
 - ▶ **BaseSpace ili BaseSpace Onsite** – odaberite obradu i potvrdite njene parametre.
 - ▶ **Standalone** (Samostalno) – unesite naziv obrade i navedite iste parametre kao za izvornu obradu.
- 7 Odaberite **Next** (Dalje) da biste nastavili s provjerom prije obrade i pokrenuli obradu.

BeadChip i pogreške u skeniranju

Softver ne može očitati crtični kôd pločice BeadChip

Kad se pojavi dijaloški okvir pogreške s crtičnim kodom, odaberite neku od sljedećih mogućnosti:

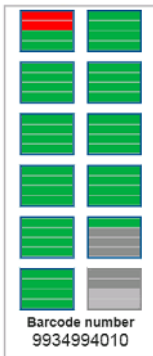
- ▶ Odaberite **Rescan** (Ponovno skeniraj). Softver će ponovno pokušati očitati crtični kôd.
- ▶ Odaberite tekstno polje i unesite numerički crtični kod kao što je prikazano na slici. Ovisno o pločici BeadChip, brojevi crtičnog koda imaju do 12 znamenki. Odaberite **Save** (Spremi). Slika crtičnog koda pohranjena je u izlaznoj mapi.
- ▶ Odaberite **Cancel** (Odustani). Vrata odjeljka za snimanje otvaraju se radi vađenja prilagodnika za BeadChip.

Neuspjelo skeniranje pločice BeadChip

Slike se registriraju nakon skeniranja. Registracijom se identificiraju zrnca povezivanjem lokacije na skeniranoj slici s informacijama navedenim na karti zrnaca ili u mapi DMAP.

Odjeljci koji ne prođu registraciju označeni su crvenom bojom na slici pločice BeadChip.

Slika 28 BeadChip na kojemu se vide odjeljci koji nisu uspješno prošli obradu



Nakon dovršetka skeniranja te kad se podaci dobiveni skeniranjem zapišu u izlaznu mapu, gumb Rescan (Ponovno skeniraj) postaje aktivan.

Kad se odabere gumb Rescan (Ponovno skeniraj), softver izvodi sljedeće korake:

- ▶ Ponovno skenira uzorke s odjeljcima koji nisu prošli obradu pomoću povećanog preklapanja kvadratića s kvadratićem.
- ▶ Generira izlazne datoteke u izvornoj izlaznoj mapi.
- ▶ Prepisuje prethodne izlazne datoteke za odjeljke koji nisu prošli obradu.
- ▶ Povećava brojač skeniranja za 1 za svako ponovno skeniranje, ali to radi u pozadini. Softver neće preimenovati izlaznu mapu.

Ponovno skeniranje ili pokretanje novog skeniranja

- 1 Odaberite **Rescan** (Ponovno skeniraj) da biste skenirali primjerke koji sadrže neispravne sekcije.
- 2 Ako je skeniranje i dalje neuspješno, završite ga.
- 3 Uklonite BeadChip i prilagodnik te pregledajte ima li na pločici BeadChip prašine ili naslage. Očistite naslage komprimiranim zrakom ili drugim načinom uklanjanja prašine komprimiranim plinom.
- 4 Ponovno umetnite BeadChip i pokrenite novo skeniranje.
Kad se pokrene novo skeniranje, softver izvodi sljedeće korake:
 - ▶ skenira cijeli BeadChip
 - ▶ generira izlazne datoteke u novoj izlaznoj mapi
 - ▶ povećava brojač skeniranja za 1 na temelju rednog broja zadnjeg ponovnog skeniranja.

Zamjena datoteka manifesta i datoteka klastera

- 1 Na stranici za podršku tvrtke Illumina (support.illumina.com) potražite BeadChip koji koristite pa kliknite karticu **Downloads** (Preuzimanja).
- 2 Preuzmite datoteke koje će biti zamijenjene ili ažurirane i kopirajte ih na željenu mrežnu lokaciju.

NAPOMENA Pripazite da odaberete datoteke manifesta i klastera koje su kompatibilne sa sustavom instrumenta NextSeq 550Dx. Kompatibilne datoteke imaju **NS550** u svom nazivu.

- 3 Samo ako se lokacija promijenila, na sljedeći način ažurirajte lokaciju na zaslonu BeadChip Scan Configuration (Konfiguracija skeniranja pločice BeadChip):

- a Na početnom zaslonu softvera NCS odaberite **Manage Instrument** (Upravljanje instrumentom).
 - b Odaberite **System Configuration** (Konfiguracija sustava).
 - c Odaberite **BeadChip Scan Configuration** (Konfiguracija skeniranja pločice BeadChip).
- 4 Odaberite **Browse** (Pregledaj) i idite na lokaciju gdje su zamijenjene ili ažurirane datoteke.

Prilagođeni recepti i mape s receptima

Nemojte mijenjati izvorne recepte. Uvijek napravite kopiju izvornog recepta s novim nazivom. Ako se izvorni recept izmijeni, alat za ažuriranje softvera više ne može prepoznati recept za daljnja ažuriranja i novije se verzije neće instalirati.

Pohranite prilagođene recepte u odgovarajuću mapu s receptima. Mape s receptima organizirane su na sljedeći način:

- 📁 **Custom**
 - 📁 **High** – prilagođeni recepti koji se upotrebljavaju s kompletom za velike količine.
 - 📁 **Mid** – prilagođeni recepti koji se upotrebljavaju s kompletom za srednje količine.
- 📁 **High** – izvorni recepti koji se upotrebljavaju s kompletom za velike količine.
- 📁 **Mid** – izvorni recepti koji se upotrebljavaju s kompletom za srednje količine.
- 📁 **Wash** – sadrži recept za ručno ispiranje.

Poruka o pogrešci RAID-a

Računalo instrumenta NextSeq 550Dx opremljeno je četirima tvrdim diskovima – dvama za dijagnostički način rada i dvama za istraživački način rada. Ako tvrdi disk počne otkazivati, sustav generira poruku o pogrešci RAID-a i predlaže da se obratite službi za tehničku podršku tvrtke Illumina. Obično je potrebno zamijeniti tvrdi disk.

Možete nastaviti s koracima postavljanja obrade i normalnim radom. Svrha je te poruke pravovremeno zakazivanje servisa kako bi se izbjegli prekidi u normalnom radu instrumenta. Upozorenje o RAID-u može potvrditi samo administrator. Upotreba instrumenta samo s jednim tvrdim diskom može dovesti do gubitka podataka.

Konfiguracija postavki sustava

Sustav se konfigurira tijekom instalacije. No, ako je potrebno nešto promijeniti ili se sustav mora ponovno konfigurirati, upotrijebite mogućnosti konfiguracije sustava. Samo administratorski račun za Windows ima dozvolu za pristup mogućnostima konfiguracije sustava.

- ▶ **Konfiguracija mreže** – nudi mogućnost postavljanja IP adrese, adrese poslužitelja naziva domene (domain name server, DNS), naziva računala i naziva domene.

Postavljanje konfiguracije mreže

- 1 Na zaslonu Manage Instrument (Upravljanje instrumentom) odaberite **System Configuration** (Konfiguracija sustava).
- 2 Odaberite **Obtain an IP address automatically** (Automatski pribavi IP adresu) da biste pribavili IP adresu pomoću DHCP poslužitelja.

NAPOMENA Dynamic Host Configuration Protocol (DHCP, Protokol za dinamičku konfiguraciju glavnog računala) standardni je mrežni protokol koji se upotrebljava na IP mrežama za dinamičku raspodjelu mrežnih konfiguracijskih parametara.

Možete i odabrati **Use the following IP address** (Upotrijebi sljedeću IP adresu) da biste na sljedeći način instrument ručno povezali s drugim poslužiteljem. Da biste saznali koje adrese pripadaju baš vašoj ustanovi, obratite se mrežnom administratoru.

- ▶ Unesite IP adresu. IP adresa je niz od 4 broja odijeljenih točkom, primjerice 168.62.20.37.
- ▶ Unesite masku podmreže, što je daljnja podjela IP mreže.
- ▶ Unesite zadani pristupnik – mrežni usmjernik koji povezuje lokalna računala s internetom.

- 3 Odaberite **Obtain a DNS server address automatically** (Automatski pribavi adresu DNS poslužitelja) da biste instrument povezali s poslužiteljem naziva domena povezanim s tom IP adresom.

Možete i odabrati **Use the following DNS server addresses** (Upotrijebi sljedeće adrese DNS poslužitelja) da biste instrument na sljedeći način ručno povezali s poslužiteljem naziva domena.

- ▶ Unesite željenu DNS adresu. DNS adresa je naziv poslužitelja koji se upotrebljava za prevodenje naziva domena u IP adrese.
- ▶ Unesite rezervnu adresu DNS-a. Rezerva se upotrebljava ako željeni DNS ne može prevesti određeni naziv domene u IP adresu.

- 4 Odaberite **Save** (Spremi) da biste prešli na zaslon Computer (Računalo).

NAPOMENA Naziv računala instrumenta dodijeljen je računalu instrumenta u trenutku proizvodnje. Svaka promjena naziva računala može utjecati na mogućnosti povezivanja i zahtijeva intervenciju mrežnog administratora.

- 5 Na sljedeći način povežite računalo instrumenta s domenom ili radnom grupom.

- ▶ **Za instrumente povezane s internetom** – odaberite **Member of Domain** (Član domene), a zatim unesite naziv domene povezan s internetskom vezom u vašoj ustanovi. Za promjene na razini domene nužni su administratorsko korisničko ime i lozinka.
- ▶ **Za instrumente koji nisu povezani s internetom** – odaberite **Member of Work Group** (Član radne grupe), a zatim unesite naziv radne grupe. Naziv radne grupe jedinstven je u vašoj ustanovi.

- 6 Odaberite **Save** (Spremi).

Postavljanje konfiguracije analize

- 1 Na zaslonu Manage Instrument (Upravljanje instrumentom) odaberite **System Configuration** (Konfiguracija sustava).
- 2 Odaberite **Analysis Configuration** (Konfiguracija analize).
- 3 Odaberite neku od sljedećih mogućnosti da biste naveli lokaciju na koju se podaci prenose radi daljnje analize.
 - ▶ Odaberite **BaseSpace** da biste podatke za sekvenciranje poslali na servis Illumina BaseSpace. **[neobavezno]** Potvrdite okvir **Output Folder** (Izlazna mapa), odaberite **Browse** (Pregledaj) i idite na sekundarnu mrežnu lokaciju da biste, osim na BaseSpace, BCL datoteke spremili i na toj lokaciji.
 - ▶ Odaberite **BaseSpace Onsite**. U polje Server Name (Naziv poslužitelja) unesite punu stazu do poslužitelja za BaseSpace Onsite. **[neobavezno]** Potvrdite okvir **Output Folder** (Izlazna mapa), odaberite **Browse** (Pregledaj) i idite na sekundarnu mrežnu lokaciju da biste, osim na poslužitelju za BaseSpace Onsite, BLC datoteke spremili i na toj lokaciji.

- ▶ Odaberite **Standalone instrument** (Samostalan instrument) da biste podatke spremili samo na mrežnu lokaciju. Odaberite **Browse** (Pregledaj) i idite na željenu mrežnu lokaciju. Kontrolni softver automatski će generirati naziv izlazne mape.
 - ▶ **[neobavezno]** Odaberite **Use Run Monitoring** (Upotrijebi praćenje obrade) da biste pratili obradu alatom za vizualizaciju na servisu BaseSpace. Za to su nužni prijava na BaseSpace i veza s internetom.
- 4 Ako ste odabrali BaseSpace ili BaseSpace Onsite, postavite parametre za BaseSpace na sljedeći način.
 - ▶ Unesite **User Name** (Korisničko ime) i **Password** (Lozinka) za BaseSpace da biste registrirali instrument na servisu BaseSpace.
 - ▶ Odaberite **Use default login and bypass the BaseSpace login screen** (Upotrijebi zadane podatke za prijavu i zaobiđi zaslon za prijavu servisa BaseSpace) da biste postavili registrirano korisničko ime i lozinku kao zadane podatke za prijavu. Tom se postavkom zaobilazi zaslon servisa BaseSpace tijekom postavljanja obrade.
- 5 Odaberite **Send Instrument Performance Data to Illumina** da biste omogućili uslugu proaktivnog praćenja tvrtke Illumina. Naziv postavke u sučelju softvera možda će se razlikovati od naziva u ovom vodiču, ovisno o verziji NCS-a koja se upotrebljava.

Dok je ta postavka uključena, podaci o radu instrumenta šalju se tvrtki Illumina. Na temelju tih podataka Illumina lakše otklanja poteškoće i prepoznaje potencijalne pogreške, što omogućuje proaktivno održavanje i minimiziranje praznog hoda instrumenta. Dodatne informacije o prednostima te usluge potražite u dokumentu *Illumina Proactive Technical Note (Tehnička napomena o usluzi Illumina Proactive, broj dokumenta 1000000052503)*.

Ta usluga:

 - ▶ ne šalje podatke o sekvenciranju
 - ▶ zahtijeva vezu instrumenta s mrežom koja ima pristup internetu
 - ▶ po zadanom je isključen. Da biste uključili tu uslugu, omogućite postavku **Send Instrument Performance Data to Illumina** (Slanje podataka o radu instrumenta tvrtki Illumina).
- 6 Odaberite **Save** (Spremi).

Konfiguracija skeniranja pločice BeadChip

- 1 Na zaslonu Manage Instrument (Upravljanje instrumentom) odaberite **System Configuration** (Konfiguracija sustava).
- 2 Odaberite **BeadChip Scan Configuration** (Konfiguracija skeniranja pločice BeadChip).
- 3 Da biste naveli zadanu lokaciju mape DMAP, odaberite **Browse** (Pregledaj) i idite na željenu lokaciju mape na mreži svoje ustanove.

NAPOMENA Prije svakog skeniranja na tu lokaciju preuzmite i kopirajte sadržaj DMAP. DMAP sadržaj je obavezan za svaku pločicu BeadChip i jedinstven je za svaki crtični kôd pločice BeadChip.

- 4 Da biste naveli zadanu lokaciju izlazne mape, odaberite **Browse** (Pregledaj) i idite na preferiranu lokaciju mape na mreži svoje ustanove.
- 5 Odaberite oblik slikovne datoteke za spremljene slike. Zadana slikovna vrsta je **JPG**.
- 6 Odaberite format izlaznih datoteka za podatke dobivene skeniranjem. Zadana vrsta izlazne datoteke je **isključivo GTC**.
- 7 Odaberite **Save** (Spremi).

- 8 Na zaslonu Scan Map (Karta skeniranja) navedite cijelu stazu do datoteke manifesta i datoteke klastera za svaku vrstu pločice BeadChip. Odaberite **Browse** (Pregledaj) za svaku vrstu datoteka i idite na lokaciju mape koja sadrži te datoteke.
- 9 **[neobavezno]** Odaberite **Hide Obsolete BeadChips** (Sakrij zastarjele pločice BeadChip) da biste iz pregleda sakrili pločice BeadChip koje su zastarjele.
- 10 Odaberite **Save** (Spremi).

Dodatak B Real-Time Analysis

| | |
|--|----|
| Pregled softvera Real-Time Analysis | 55 |
| Tijek rada softvera Real-Time Analysis | 56 |

Pregled softvera Real-Time Analysis

Instrument NextSeq 550Dx upotrebljava implementaciju softvera Real-Time Analysis (RTA) pod nazivom RTA2. RTA2 se izvodi na računalu instrumenta i izdvaja intenzitete sa slika, izvodi prepoznavanje baza i prepoznavanju baza dodjeljuje ocjenu kvalitete. RTA2 i operacijski softver komuniciraju preko web HTTP sučelja i dijeljenih datoteka u memoriji. Ako se RTA2 prekine, obrada se neće nastaviti, a podaci obrade neće se spremiti.

Ulazni podaci za RTA2

RTA2 za obradu zahtijeva sljedeće ulazne podatke:

- ▶ Slike kvadratića sadržane u lokalnoj memoriji sustava.
- ▶ **RunInfo.xml** koja se generira automatski na početku obrade i sadrži naziv obrade, broj ciklusa, je li očitavanje indeksirano te broj kvadratića na protočnom članku.
- ▶ **RTA.exe.config**, konfiguracijska datoteka za softver u XML formatu.

RTA2 prima naredbe od operacijskog softvera o lokaciji datoteke **RunInfo.xml** i tome je li navedena neobavezna izlazna mapa.

Izlazne datoteke softvera RTA2

Slike iz svakog kanala **prosljeđuju se** u memoriju kao kvadratići. Kvadratići su mala područja snimanja na protočnom članku koje kamera definira kao vidno polje. Na temelju tih slika softver proizvodi izlazne datoteke kao skup datoteka za otkrivanje baza i datoteka o filtriranju ocijenjenih prema kvaliteti. Sve druge datoteke podrška su izlaznim datotekama.

| Vrsta datoteke | Opis |
|---|---|
| Datoteke za otkrivanje baza | Svaki analizirani kvadratić uvrštava se u agregiranu datoteku za otkrivanje baza (*.bcl.bgzf) za svaku stazu i svaki ciklus. Agregirana datoteka za otkrivanje baza sadrži otkrivanje baza i povezanu ocjenu kvalitete svakog klastera u toj stazi. |
| Datoteke o filtriranju | Svaki kvadratić proizvodi informacije o filtriranju koje se agregiraju u 1 datoteku o filtriranju (*.filter) za svaku stazu. Datoteke o filtriranju navodi je li klaster prošao filtriranja. |
| Datoteke s lokacijom klastera | Datoteke s lokacijom klastera (*.locs) sadrže koordinate X,Y svakog klastera u kvadratiću. Datoteka s lokacijom klastera generira se za svaku stazu tijekom generiranja predloška. |
| Datoteke s indeksima za otkrivanja baza | Datoteka s indeksima za otkrivanje baza (*.bci) proizvodi se za svaku stazu kako bi se sačuvala izvorne informacije o kvadratiću. Datoteka s indeksima sadrži par vrijednosti za svaki kvadratić, a to su broj kvadratića i broj klastera za taj kvadratić. |

RTA 2 pruža mjerne podatke u stvarnom vremenu o kvaliteti obrade pohranjene u datotekama o internim operacijama (InterOp). Datoteke InterOp binarne su izlazne datoteke koje sadrže mjerne podatke o kvadratićima, ciklusima i razini očitavanja.

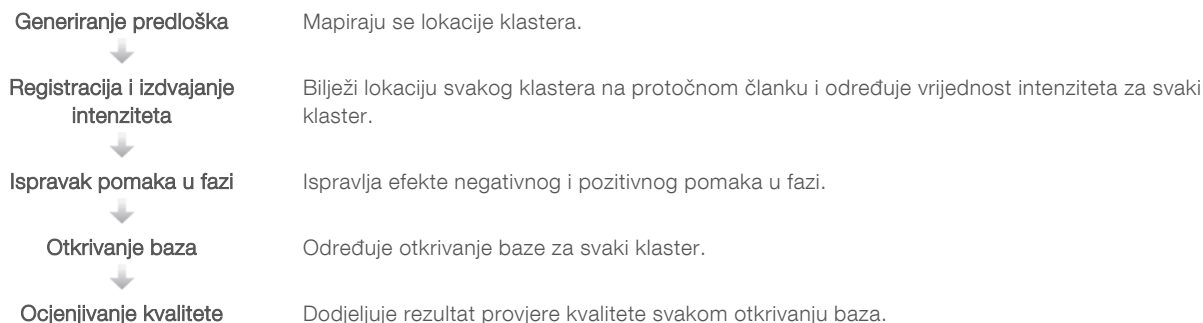
Rukovanje pogreškama

RTA2 stvara datoteke zapisnika i zapisuje ih u mapu RTALogs. Pogreške se bilježe u datoteku s pogreškama u formatu datoteke *.tsv.

Sljedeće datoteke zapisnika i datoteke s pogreškama prenose se po dovršetku obrade na završno izlazno odredište:

- ▶ *GlobalLog*.tsv sadrži sažetak važnih događaja prilikom obrade.
- ▶ *LaneNLog*.tsv navodi događaje obrade za svaku stazu.
- ▶ *Error*.tsv navodi pogreške koje su se javile tijekom obrade.
- ▶ *WarningLog*.tsv navodi upozorenja koja su se javila tijekom obrade.

Tijek rada softvera Real-Time Analysis



Generiranje predloška

Prvi korak u tijeku rada softvera RTA jest generiranje predloška koji definira položaj svakog klastera na kvadratiću koordinatama X i Y.

Za generiranje predloška nužni su slikovni podaci iz prvih 5 ciklusa obrade. Nakon slikanja zadnjeg ciklusa za generiranje predloška za kvadratić generira se predložak.

NAPOMENA Za prepoznavanje klastera tijekom generiranja predloška mora u prvih 5 ciklusa biti barem 1 baza koja nije G. Za sve sekvence indeksa RTA 2 zahtijeva barem 1 bazu koja nije G u prva 2 ciklusa.

Predložak se primjenjuje kao referenca za sve daljnje korake registracije i izdvajanja intenziteta. Položaji klastera za cijeli protočni članak zapisuju se u datoteke s lokacijom klastera (*.locs) – po 1 datoteka za svaku stazu.

Registracija i izdvajanje intenziteta

Registracija i izdvajanje intenziteta počinju nakon generiranja predloška.

- ▶ Registracijom se slike izrađene u svakom narednom ciklusu slikanja uspoređuju s predloškom.
- ▶ Izdvajanje intenziteta određuje vrijednost intenziteta za svaki klaster u predlošku za određenu sliku.

Ako registracija ne uspije ni za jednu sliku u ciklusu, neće se generirati određivanja baza za taj kvadratić u tom ciklusu.

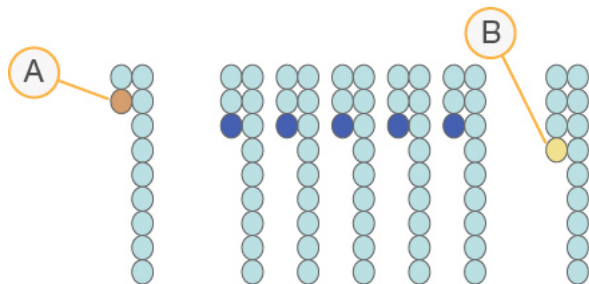
Ispravak pomaka u fazi

Tijekom reakcije sekvenciranja svaki lanac DNA u klasteru povećava se za 1 bazu po ciklusu. Negativan i pozitivan pomak u fazi događa se kad se lanac prestane podudarati u fazi s trenutačnim ciklusom umetanja.

- ▶ Do negativnog pomaka u fazi dolazi kad neka baza zaostaje.

- ▶ Do pozitivnog pomaka u fazi dolazi kad neka baza ide unaprijed.

Slika 29 Negativan i pozitivan pomak u fazi



- A Očitavanje s bazom s negativnim pomakom
- B Očitavanje s bazom s pozitivnim pomakom.

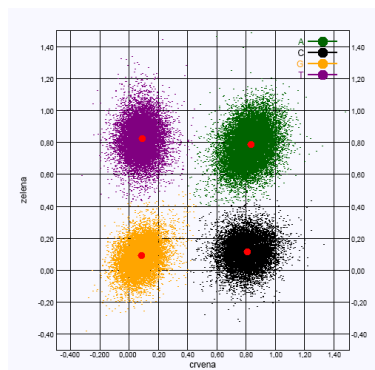
RTA2 ispravlja efekte negativnog i pozitivnog pomaka u fazi, čime se maksimizira kvaliteta podataka u svakom ciklusu tijekom obrade.

Otkrivanje baza

Otkrivanjem baza određuju se baze (A, C, G ili T) za svaki klaster određenog kvadratića u određenom ciklusu. Instrument NextSeq 550Dx upotrebljava 2-kanalno sekvenciranje koje zahtijeva samo 2 slike za šifriranje podataka za 4 baze DNA – 1 iz crvenog kanala i 1 iz zelenog kanala.

Intenziteti izdvojeni sa slike uspoređene s drugom slikom daju 4 različite populacije, pri čemu svaka odgovara nekom nukleotidu. Postupkom otkrivanja baza određuje se kojoj populaciji pripada svaki klaster.

Slika 30 Vizualizacija intenziteta klastera



Tablica 1 Otkrivanje baza kod 2-kanalnog sekvenciranja

| Baza | Crveni kanal | Zeleni kanal | Rezultat |
|------|----------------|----------------|---|
| A | 1 (uključeno) | 1 (uključeno) | Klasteri koji pokazuju intenzitet u crvenom i zelenom kanalu. |
| C | 1 (uključeno) | 0 (isključeno) | Klasteri koji pokazuju intenzitet samo u crvenom kanalu. |
| G | 0 (isključeno) | 0 (isključeno) | Klasteri koji ne pokazuju intenzitet na poznatim lokacijama klastera. |
| T | 0 (isključeno) | 1 (uključeno) | Klasteri koji pokazuju intenzitet samo u zelenom kanalu. |

Klasteri koji prolaze filtriranje

Tijekom obrade RTA2 filtrira neobrađene podatke radi uklanjanja očitavanja koja ne zadovoljavaju prag kvalitete podataka. Uklanjaju se klasteri koji se preklapaju i oni niske kvalitete.

Pri 2-kanalnoj analizi RTA2 upotrebljava sustav utemeljen na populaciji za određivanje čistoće određivanja baza. Klasteri prolaze filtriranje (PF) kad najviše 1 određivanje baze u prvih 25 ciklusa ima čistoću od < 0,63. Klasteri koji ne prolaze filtriranje ne sudjeluju u određivanju baza.

Napomene o indeksiranju

Postupak čitanja indeksa tijekom prepoznavanja baza razlikuje se od prepoznavanja baza tijekom drugih čitanja.

Očitavanja indeksa moraju počinjati s barem 1 bazom koja nije G u bilo kojem od prva 2 ciklusa. Ako očitavanje indeksa počne dvama otkrivanjima baza G, ne generira se intenzitet signala. Signal mora biti prisutan u bilo kojem od prva 2 ciklusa kako bi se osigurala radna svojstva demultipleksiranja.

Da bi se povećala robusnost demultipleksiranja, odaberite sekvence indeksa koje daju signal u barem jednom kanalu, no najbolje oba, za svaki ciklus. Praćenjem ove smjernice izbjeći ćete kombinacije indeksa koje rezultiraju samo bazama G u svim ciklusima.

- ▶ Crveni kanal – A ili C
- ▶ Zeleni kanal – A ili T

Takav postupak prepoznavanja baza osigurava točnost prilikom analize niskopleksnih uzoraka.

Ocjenjivanje kvalitete

Ocjena kvalitete ili „Q-ocjena“ (Q-score) predviđanje je vjerojatnosti netočnog otkrivanja baze.

Veća Q-ocjena upućuje na to da je veća kvaliteta otkrivanja baza i veća vjerojatnost da je ono točno.

Q-ocjena praktičan je način izražavanja vjerojatnosti pojave malih pogrešaka. Ocjene kvalitete navode se kao Q(X), pri čemu je X ocjena. U sljedećoj tablici prikazan je odnos između ocjene kvalitete i vjerojatnosti pogreške.

| Q-ocjena Q(X) | Vjerojatnost pogreške |
|---------------|-----------------------|
| Q40 | 0,0001 (1 na 10 000) |
| Q30 | 0,001 (1 na 1000) |
| Q20 | 0,01 (1 na 100) |
| Q10 | 0,1 (1 na 10) |

NAPOMENA Ocjenjivanje kvalitete temelji se na izmijenjenoj verziji Phredovog algoritma.

Pri ocjenjivanju kvalitete računa se skup predviđanja za svako otkrivanje baze, a zatim se te vrijednosti upotrebljavaju za traženje Q-ocjene u tablici kvalitete. Tablice kvalitete namijenjene su optimalno preciznom predviđanju kvalitete obrada generiranih određenim konfiguracijama platforme za sekvenciranje i verzijama kemijskih postupaka.

Nakon određivanja Q-ocjene rezultati se bilježe u datoteke otkrivanja baza (*.bcl.bgzf).

Dodatak C Izlazne datoteke i mape

| | |
|---|----|
| Izlazne datoteke pri sekvenciranju | 59 |
| Struktura izlazne mape | 61 |
| Izlazne datoteke pri skeniranju | 62 |
| Struktura izlazne mape pri skeniranju | 63 |

Izlazne datoteke pri sekvenciranju

| Vrsta datoteke | Opis, lokacija i naziv datoteke |
|---|---|
| Datoteke za otkrivanje baza | Svaki analizirani kvadratić uvršten je u datoteku za otkrivanje baza i agregiran u 1 datoteku za svaku stazu i svaki ciklus. Agregirana datoteka sadrži otkrivanje baza i šifrirani rezultat provjere kvalitete za svaki klaster u toj stazi. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] – datoteke za svaku stazu pohranjene su u 1 mapi. [Ciklus].bcl.bgzf, pri čemu [Ciklus] predstavlja 4-znamenasti broj ciklusa. Datoteke za otkrivanje baza komprimirane su pomoću kompresije block gzip. |
| Datoteka s indeksima za otkrivanja baza | Za svaku stazu binarna datoteka s indeksima navodi informacije o izvornom kvadratiću kao par vrijednosti za svaki kvadratić: broj kvadratića i broj klastera za taj kvadratić. Datoteke s indeksima za otkrivanja baza stvaraju se prvi put prilikom stvaranja datoteke za otkrivanje baza za tu stazu. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] – datoteke za svaku stazu pohranjene su u 1 mapi. s_[Staza].bci |
| Datoteke s lokacijom klastera | Za svaki se kvadratić koordinate XY svakog klastera agregiraju u 1 datoteku s lokacijom klastera za svaku stazu. Datoteke s lokacijom klastera rezultat su generiranja predloška. Data\Intensities\L00[X] – datoteke za svaku stazu pohranjene su u 1 mapi. s_[staza].locs |
| Datoteke o filtriranju | Datoteka o filtriranju navodi je li klaster prošao filtriranje. Informacije o filtriranju agregiraju se u 1 datoteku o filtriranju za svaku stazu i očitavanje. Datoteke o filtriranju generiraju se u 26. ciklusu na temelju podataka iz 25 ciklusa. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] – datoteke za svaku stazu pohranjene su u 1 mapi. s_[staza].filter |
| Datoteke o internim operacijama (InterOp) | Binarne datoteke za izvješćivanje. Datoteke o internim operacijama ažuriraju se tijekom obrade. Mapa InterOp |
| Datoteka RTA konfiguracije | Datoteka RTA konfiguracije stvara se na početku obrade i navodi postavke obrade. [Korijenska mapa], RTAConfiguration.xml |
| Datoteka s informacijama o obradi | Navode naziv obrade, broj ciklusa u svakom očitavanju, je li očitavanje indeksirano te broj gredica i kvadratića na protočnom članku. Datoteka s informacijama o obradi stvara se na početku obrade. [Korijenska mapa], RunInfo.xml |

Kvadratići protočnog članka

Kvadratići su mala područja snimanja na protočnom članku koje kamera definira kao vidno polje. Ukupan broj kvadratića ovisi o broju staza, gredica i površina koje se snimaju na protočnom članku i kako kamere zajedno rade na prikupljanju slika. Protočni članci velikog kapaciteta imaju ukupno 864 kvadratića.

Tablica 2 Kvadratići protočnog članka

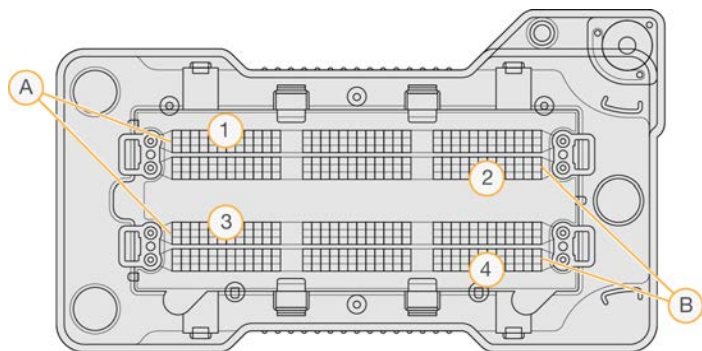
| Komponenta protočnog članka | Velik kapacitet | Opis |
|-----------------------------|-----------------|--|
| Staze | 4 | Staza je fizički kanal s namjenskim ulaznim i izlaznim priključcima. |
| Površine | 2 | Snimaju se dvije površine protočnog članka – gornja i donja. Snima se gornja površina 1 kvadratića, a zatim se snima donja površina istog kvadratića prije prelaska na sljedeći kvadratić. |

| Komponenta protočnog članka | Velik kapacitet | Opis |
|--|-----------------|---|
| Gredice po stazi | 3 | Gredica je stupac kvadratića u nekoj stazi. |
| Segmenti kamere | 3 | Instrument upotrebljava 6 kamera za snimanje protočnog članka u 3 segmenta za svaku stazu. |
| Kvadratići po gredici po segmentu kamere | 12 | Kvadratić je područje na protočnom članku koje kamera vidi kao 1 sliku. |
| Ukupan broj snimljenih kvadratića | 864 | Ukupan broj kvadratića jednak je broju staza × broj površina × broj gredica × broj segmenta kamere × kvadratića po gredici po segmentu. |

Numeriranje staza

Staze 1 i 3, pod nazivom par staza A, snimaju se istovremeno. Staze 2 i 4, pod nazivom par staza B, snimaju se kad se dovrši snimanje para staza A.

Slika 31 Numeriranje staza

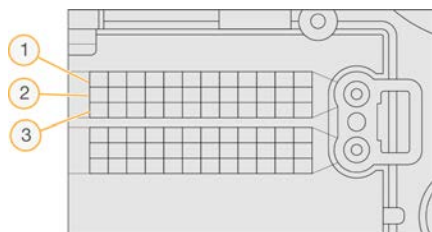


- A Par staza A – staze 1 i 3
- B Par staza B – staze 2 i 4

Numeriranje gredica

Svaka staza sastoji se od 3 gredice. Kod protočnih članaka velikog kapaciteta gredice su označene brojevima od 1 do 3.

Slika 32 Numeriranje gredica

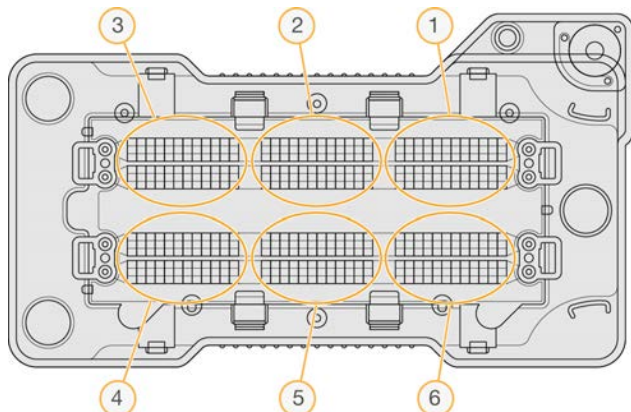


Numeriranje kamera

Instrument NextSeq 550Dx upotrebljava 6 kamera za snimanje protočnog članka.

Kamere su označene brojevima od 1 do 6. Kamere od 1 do 3 – staza za snimanje 1. Kamere od 4 do 6 – staza za snimanje 3. Nakon snimanja staza 1 i 3 modul za snimanje prelazi krećući se po osi na snimanje staza 2 i 4.

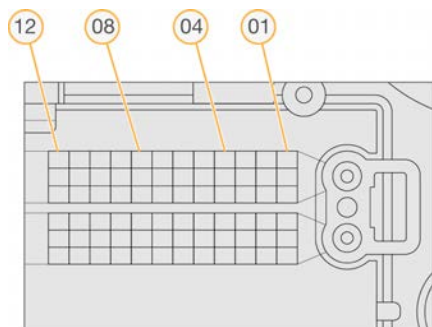
Slika 33 Numeriranje kamera i segmenata (prikazan je protočni članak velikog kapaciteta)



Numeriranje kvadratića

U svakoj gredici svakog segmenta kamere nalazi se 12 kvadratića. Kvadratići su numerirani brojevima od 01 do 12 bez obzira na broj gredice ili segmenta kamere te predstavljani dvama znamenkama.

Slika 34 Numeriranje kvadratića



Cijeli broj kvadratića sastoji se od 5 znamenki koje predstavljaju lokaciju na sljedeći način:

- ▶ **Površina** – 1 predstavlja gornju površinu; 2 predstavlja donju površinu
- ▶ **Gredica** – 1, 2 ili 3
- ▶ **Kamera** – 1, 2, 3, 4, 5 ili 6
- ▶ **Kvadratić** – 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 ili 12

Primjer: kvadratić s brojem 12508 ukazuje na gornju površinu, 2. gredicu, 5. kameru i 8. kvadratić.

Cjelovit 5-znamenkasti broj kvadratića upotrebljava se u nazivu datoteke minijatura slika i datoteka empirijskog pomaka u fazi. Da biste saznali više, pročitajte *Izlazne datoteke pri sekvenciranju* na stranici 59.

Struktura izlazne mape

Operacijski softver automatski generira naziv izlazne mape.

- ▶ **Data**
 - ▶ **Intensities**
 - ▶ **BaseCalls**

📁 L001 – datoteke otkrivanja baza za 1. stazu, agregirane u 1 datoteku po ciklusu.

📁 L002 – datoteke otkrivanja baza za 2. stazu, agregirane u 1 datoteku po ciklusu.

📁 L003 – datoteke otkrivanja baza za 3. stazu, agregirane u 1 datoteku po ciklusu.

📁 L004 – datoteke otkrivanja baza za 4. stazu, agregirane u 1 datoteku po ciklusu.

📁 L001 – agregirana *.locs datoteka za 1. stazu.

📁 L002 – agregirana *.locs datoteka za 2. stazu.

📁 L003 – agregirana *.locs datoteka za 3. stazu.

📁 L004 – agregirana *.locs datoteka za 4. stazu.

📁 Images

📁 Focus

📁 L001 – fokusirane slike za 1. stazu.

📁 L002 – fokusirane slike za 2. stazu.

📁 L003 – fokusirane slike za 3. stazu.

📁 L004 – fokusirane slike za 4. stazu.

📁 InterOp – binarne datoteke.

📁 Logs – datoteke zapisnika u kojima se opisuju radni koraci.

📁 Recipe – datoteka s receptima specifičnim za obradu s nazivima koji sadrže ID spremnika reagensa.

📁 RTALogs – datoteke zapisnika u kojima se opisuju koraci analize.

📄 RTAComplete.txt

📄 RTAConfiguration.xml

📄 RunInfo.xml

📄 RunParameters.xml

Izlazne datoteke pri skeniranju

| Vrsta datoteke | Opis, lokacija i naziv datoteke |
|-------------------|---|
| GTC datoteke | Datoteka otkrivanja genotipa. GTC datoteka generira se za svaki uzorak skeniran na pločici BeadChip. Naziv datoteke sadrži crtični kôd i skenirani uzorak. [crtični kôd]_[uzorak].gtc |
| Slikovne datoteke | Slikovne datoteke imenuju se u skladu sa skeniranim područjem na pločici BeadChip. Naziv obuhvaća crtični kôd, uzorak i odjeljak na pločici BeadChip, gredicu i kanal snimanja (crveni ili zeleni). [crtični kôd]_[uzorak]_[odjeljak]_[gredica]_[kamera]_[kvadratić]_[kanal].jpg <ul style="list-style-type: none"> • Crtični kôd – naziv datoteke počinje crtičnim kodom pločice BeadChip. • Uzorak – područje na pločici BeadChip numerirano kao redak (R0X) odozgo prema dolje te kao stupac (C0X) slijeva nadesno. • Odjeljak – numerirani redak u uzorku. • Gredica – BeadChips snimaju se kao zbirka preklapajućih kvadratića. Stoga se samo 1 gredica upotrebljava za snimanje odjeljka. • Kamera – kamera korištena za prikupljanje slike. • Kvadratić – područje slike definirano kao vidno polje kamere. • Kanal – kanal može biti crven ili zelen. |

Struktura izlazne mape pri skeniranju

- 📁 [Datum]_[Naziv instrumenta]_[Br. skeniranja]_[Crtični kôd]
 - 📁 [Crtični kôd]
 - 📁 Config
 - 📄 Effective.cfg – zapisuje postavke konfiguracije korištene tijekom skeniranja.
 - 📁 Focus – sadrži slikovne datoteke korištene za fokusiranje skeniranja.
 - 📁 Logs – sadrži datoteke zapisnika u kojima se navodi svaki korak izveden tijekom skeniranja.
 - 📁 PreScanDiagnosticFiles
 - 📁 [Datum_Vrijeme] Barcode Scan
 - 📄 ProcessedBarcode.jpg – slika crtičnog koda pločice BeadChip.
 - 📄 Scanning Diagnostics (datoteke zapisnika)
 - 📄 PreScanChecks.csv – bilježi rezultate automatske provjere.
 - 📄 GTC files – datoteke otkrivanja genotipa (1 datoteka po uzorku).
 - 📄 IDAT files – [neobavezno] datoteke s podacima o intenzitetu (2 datoteke po uzorku; 1 za svaki kanal).
 - 📄 Image files – skenirane slike za svaki uzorak, odjeljak, gredicu, kameru, kvadratić i kanal.
 - 📄 [Crtični kôd]_sample_metrics.csv
 - 📄 [Crtični kôd]_section_metrics.csv
 - 📄 ScanParameters.xml

Kazalo

A

- algoritam Phred 58
- analiza
 - izlazne datoteke 59
- analiza, primarna
 - čistoća signala 58
- ažuriranje softvera 39

B

- BaseSpace 51
 - login 18
- BeadChip
 - analiza 1
 - neuspjela registracija 48
 - nije moguće očitati bcrtični kod 48
 - prilagodnik 5, 29
 - umetanje 31
 - usmjerenje crtičnog koda 29
 - vrste 1

C

- ciklusi u očitavanju 15

D

- datoteke filtra 59
- datoteke o internim operacijama (InterOp) 43, 59
- datoteke s lokacijama 59
- datoteke za otkrivanje baza 59
- Decode File Client 27
 - access by account (Pristup putem računara) 28
 - pristup od strane pločice BeadChip 29
- dijelovi
 - odjeljak za pufer 3
 - odjeljak za snimanje 3
 - odjeljka za reagense 3
 - traka statusa 3
- dokumentacija 2, 69
- duljina očitavanja 15
- duljina očitavanja 16
- dužina očitavanja 15

E

- empirijski pomoci u fazi 56

F

- filtrar čistoće 58
- filtrar za zrak 4, 38
- formamid, položaj 6 22

G

- generiranje klastera 15, 25
- generiranje predložka 56
- GTC datoteke 62
- gumb za uključivanje/isključivanje 5, 11

I

- ikone
 - pogreške i upozorenja 4
 - status 4
- instrument
 - avatar 12
 - gumb za uključivanje/isključivanje 5
 - indikator načina rada 12
 - isključivanje 41
 - nadimak 12
 - pokretanje 11
 - ponovno pokretanje 41
 - postavke konfiguracije 50
- intenziteti 57
- isključivanje instrumenta 41
- ispiranje
 - automatsko 26
 - komponente za ispiranje 35
 - potrošni materijal koji mora pribaviti korisnik 35
 - ručno ispiranje 35
- ispiranje instrumenta 35
- ispiranje nakon obrade 26
- izlazne datoteke 59
- izlazne datoteke skeniranja
 - GTC, IDAT 62
- izlazne datoteke, sekvenciranje 59
- izlazne datoteke, skeniranje
 - GTC, IDAT 62

K

- klasteri koji prolaze filtriranje 58
- kompatibilnost
 - protočni članak, spremnik reagensa 6
 - RFID praćenje 6, 8
- Konfiguracija 51
- konfiguracija za BaseSpace 23
- kontrolni softver 4
- korisničko ime i lozinka 11
- korisničko ime i lozinka sustava 11

L

- lokacija klastera
 - datoteke 59
 - generiranje predložka 56
- lokacija mape 23

M

- mapa DMAP
 - Decode File Client 27
 - preuzimanje 28
- mjerni podaci
 - ciklusi gustoće klastera 25
 - ciklusi intenziteta 25
 - otkrivanje baza 57
- mjerni podaci o obradi 25
- mrežna obuka 2

N

- Način rada RUO 12
- napomene o indeksiranju 58
- napredna mogućnost umetanja 13
- natrijev hipoklorit, ispiranje 36
- negativan pomak u fazi, pozitivan pomak u fazi 56
- numeriranje gredica 60
- numeriranje kamera 60
- numeriranje kvadratića 61
- numeriranje staza 60

O

- odjeljak za pufer 3
- odjeljak za reagense 3
- odjeljak za snimanje 3

- održavanje instrumenta
 - potrošni materijal 14
- održavanje, preventivno 35
- otklanjanje poteškoća
 - datoteke specifične za obradu 43
 - datoteke specifične za skeniranje 44
 - mjerni podaci slabe kvalitete 46
 - neuspjela registracija pri skeniranju 48
 - nije moguće očitati crtični kod pločice
 - BeadChip 48
 - provjera prije obrade 44
 - spremnik potrošenih reagensa 46
 - zamjena datoteka manifesta i datoteka klastera 49
- otkrivanje baza 57
- napomene o indeksiranju 58

P

- parametri obrade
 - način rada za BaseSpace 23
 - samostalan način rada 23
 - uređivanje parametara 23
- parovi staza 60
- podrška korisnicima 69
- pogreške i upozorenja 4, 55
- pogreške provjere prije obrade 44
- pomoć
 - dokumentacija 2
- pomoć, tehnička 69
- ponovna hibridizacija primera 46
- ponovna hibridizacija, Read 1 (Očitanje 1) 46
- ponovno pokrenuti
 - instrument 41
- ponovno pokretanje
 - instrument 41
- ponovno pokretanje sustava u istraživačkom načinu rada 12
- Poruka o pogrešci RAID-a 50
- postavke konfiguracije 50
- postavke sustava 12
- postavljanje obrade, napredna mogućnost 13
- potrošeni reagensi
 - bacanje u otpad 19, 37
 - spremnik pun 46
- potrošni materijal 6
 - analize sekvenciranja 13
 - održavanje instrumenta 14
 - potrošni materijal za ispiranje 35-36
 - protočni članak 7
 - spremnik pufera 9

- spremnik reagensa 8
 - voda laboratorijske kvalitete 14
- potrošni materijal koji mora pribaviti
 - korisnik 13-14
- pražnjenje potrošnog materijala 13
- prekidač za uključivanje/isključivanje 11
- preventivno održavanje 35
- prijenos podataka
 - podaci dobiveni skeniranjem 33
 - univerzalni servis za kopiranje 25
- prilagodnik
 - pregled 5
 - umetanje pločice BeadChip 31
 - usmjerenje pločice BeadChip 29
- prolazak filtriranja (PF) 58
- protočni članak
 - broj gredice 60
 - čišćenje 17
 - kvadratići 59
 - numeriranje kvadratića 61
 - numeriranje staza 60
 - pakiranje 17
 - parovi staza 7
 - ponovna hibridizacija 46
 - pregled 7
 - snimanje 60
 - zatici za poravnavanje 18
- provjera prije obrade 24, 31

Q

Q-ocjena 58

R

reagensi

- odgovarajuće bacanje u otpad 21
- u kompletu 6

RFID praćenje 6

RunInfo.xml 43, 59

S

samostalna konfiguracija 23

sekvenciranje

- potrošni materijal koji mora pribaviti
 - korisnik 13
- uvod 15

smjernice za vodu laboratorijske kvalitete 14

snimanje, 2-kanalno sekvenciranje 57

softver

- analiza slike, otkrivanje baza 4
- automatsko ažuriranje 40
- inicijalizacija 11
- na instrumentu 4
- postavke konfiguracije 50
- ručno ažuriranje 40
- trajanje obrade 15-16

softver BlueFuse Multi 1

softver Real-Time Analysis 4

- pomaci u fazi 56
- tijek rada 56

Softver Real-Time Analysis

- rezultati 59

spremnik pufera 9, 21

spremnik reagensa

- pregled 8
- rezervoar br. 6 22

spremnika reagensa

- rezervoar br. 28 36

T

tehnička pomoć 69

tijek rada

- BeadChip 31
- mjerni podaci o obradi 25
- način rada za BaseSpace 23
- napomene o indeksiranju 58
- napredna mogućnost umetanja 13
- natrijev hipoklorit 36
- potrošeni reagensi 19
- pregled 16, 28
- priprema protočnog članka 17
- protočni članak 18
- provjera prije obrade 24, 31
- samostalan način rada 23
- sekvenciranje 56
- spremnik pufera 21
- spremnik reagensa 21
- trajanje obrade 15-16

tijek rada sekvenciranja 16, 56

tipkovnica 12

trajanje obrade 15-16

traka statusa 3

U

ulazne datoteke, skeniranje

- datoteke klastera 27, 49
- datoteke manifesta 27, 49

- mapa DMAP 27
- mapa DMAP, preuzeti 28
- Univerzalni servis za kopiranje 25
- upozorenja o statusu 4
- upravljanje instrumentom
 - isključivanje 41-42
- usluga proaktivnog praćenja tvrtke Illumina 51

V

- vjerojatnost pogreške 58

W

- Windows
 - izlaz 42
- workflow
 - BaseSpace login 18

Z

- zvuk 12

Tehnička pomoć

Ako vam je potrebna tehnička pomoć, obratite se službi za tehničku podršku tvrtke Illumina.

Web-mjesto: www.illumina.com
Adresa e-pošte: techsupport@illumina.com

Telefonski brojevi službe za podršku korisnicima tvrtke Illumina

| Regija | Besplatni telefon | Regionalno |
|------------------|-------------------|----------------|
| Sjeverna Amerika | +1.800.809.4566 | |
| Australija | +1.800.775.688 | |
| Austrija | +43 800006249 | +43 19286540 |
| Belgija | +32 80077160 | +32 34002973 |
| Danska | +45 80820183 | +45 89871156 |
| Finska | +358 800918363 | +358 974790110 |
| Francuska | +33 805102193 | +33 170770446 |
| Hong Kong, Kina | 800960230 | |
| Irska | +353 1800936608 | +353 016950506 |
| Italija | +39 800985513 | +39 236003759 |
| Japan | 0800.111.5011 | |
| Južna Koreja | +82 80 234 5300 | |
| Kina | 400.066.5835 | |
| Nizozemska | +31 8000222493 | +31 207132960 |
| Njemačka | +49 8001014940 | +49 8938035677 |
| Norveška | +47 800 16836 | +47 21939693 |
| Novi Zeland | 0800.451.650 | |
| Singapur | +1.800.579.2745 | |
| Španjolska | +34 911899417 | +34 800300143 |
| Švedska | +46 850619671 | +46 200883979 |
| Švicarska | +41 565800000 | +41 800200442 |
| Tajvan, Kina | 00806651752 | |
| Velika Britanija | +44 8000126019 | +44 2073057197 |
| Ostale države | +44.1799.534000 | |

Sigurnosno-tehnički listovi (SDS-ovi) – dostupni su na web-mjestu tvrtke Illumina na adresi support.illumina.com/sds.html.

Dokumentacija o proizvodima – dostupna je za preuzimanje na web-mjestu support.illumina.com.



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 SAD

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (izvan Sjeverne Amerike)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Samo za istraživačke svrhe. Nije za upotrebu u dijagnostičkim postupcima.

© 2021. Illumina, Inc. Sva prava pridržana.

illumina®