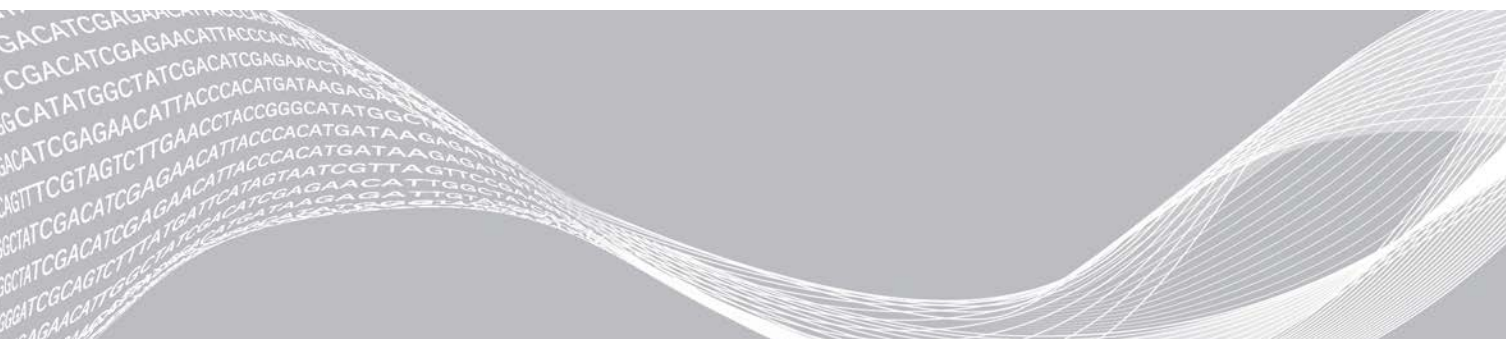


Analytický modul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx

Průvodce pracovními postupy pro systém NextSeq 550Dx

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO

Přehled	3
Zadání informací o bězích	3
Metody analýzy	5
Zobrazení běhu a výsledků	6
Výkaz výsledků	6
Výstupní soubory analýzy	7
Historie revizí	10
Technická pomoc	11



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

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

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

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

© 2022 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

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

Přehled

Modul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx nejprve demultiplexuje indexovaná čtení. V případě použití vygeneruje modul DNA GenerateFASTQ Dx přechodné výstupní soubory ve formátu FASTQ a poté ukončí pracovní postup. Neprovádí se žádné zarovnání ani další analýza. Soubory FASTQ jsou požadovaným vstupem pro analýzu pomocí analytických nástrojů třetích stran.

Modul Local Run Manager DNA GenerateFASTQ Dx lze spustit v aplikaci Local Run Manager v3.1.0 (nebo novější) a je kompatibilní s obslužným softwarem NextSeq 550Dx Operating Software (NOS) v1.4 (nebo novějším). Analytický modul podporuje sekvenování až po analýzu pro rozbor Illumina DNA Prep With Enrichment Dx.

Popis této příručky

Tato příručka poskytuje návod k nastavení parametrů běhu pro sekvenování a analýzu pro diagnostický analytický modul DNA GenerateFASTQ. Použití softwaru vyžaduje základní znalost aktuálního operačního systému Windows a uživatelského rozhraní založeného na webovém prohlížeči. Informace o ovládacím panelu a systémových nastaveních softwaru Local Run Manager naleznete v *referenční příručce přístroje NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.

Zadání informací o bězích

Nastavení parametrů

- 1 Přihlaste se do aplikace Local Run Manager.
- 2 Vyberte možnost **Create Run** (Vytvořit běh) a potom vyberte možnost **DNA GenerateFASTQ Dx**.
- 3 Zadejte jedinečný název běhu, který běh identifikuje od sekvenování až po analýzu (maximálně 40 znaků).
Název běhu může obsahovat alfanumerické znaky, mezery a speciální znaky `~!@#\$\$%-_{}`.
Nelze použít název z předchozího běhu.
- 4 **[Volitelné]** Pro lepší identifikaci běhu zadejte popis běhu (maximálně 150 znaků).
Popis běhu může obsahovat alfanumerické znaky, mezery a následující speciální znaky: `~!@#\$\$%-_{}`.
- 5 Nakonfigurujte následující nastavení běhu:
 - ▶ Index Plate (Indexační deska) – vyberte rozložení indexační desky použité při přípravě knihovny. K dispozici jsou možnosti Index Set A (Sada indexů A), Index Set B (Sada indexů B) a Index Set AB (Sada indexů AB). Další informace o rozložení indexační desky naleznete v *příbalovém letáku pro sadu Illumina DNA Prep With Enrichment Dx*.
Sady indexů A a B obsahují 96 vzorků a odpovídající unikátní duální primery (UDPs, unique dual primers). Sada indexů AB obsahuje 192 vzorků a odpovídající unikátní duální primery.
 - ▶ Read Type (Typ čtení) – Vyberte možnost Single read (Jedno čtení) nebo Paired-End (Párové-koncové). Ve výchozím nastavení je nastaven typ čtení Paired-End (Párové-koncové).
 - ▶ Read Lengths (Délky čtení) – Zadejte délku čtení. Výchozí délka čtení je 151.
- 6 V části Module-Specific Settings (Nastavení specifická pro daný modul) nastavte možnost Adapter Trimming (Oříznutí adaptéru).
Oříznutí adaptéru je ve výchozím nastavení povoleno.

- 7 Vyberte počet vzorků, které se mají sekvenovat. Zvolený počet vzorků se váže na automaticky vyplňovaná doporučení UDP. Pokud nechcete používat doporučení UDP, vyberte možnost **Custom** (Vlastní).
Pokud v rozevíracím seznamu není počet vzorků, které sekvenujete, vyberte nejbližší počet vzorků. Dbejte na to, aby vybrané číslo bylo menší než počet sekvenovaných vzorků, a podle potřeby přidávejte další UDP. Když například chcete testovat 18 vzorků, vyberte 16 vzorků.

Specifikace vzorků pro běh

Vzorky pro běh zadejte pomocí jedné z následujících možností.

- ▶ **Ruční zadání vzorků** – Použijte prázdnou tabulku na obrazovce Create Run (Vytvořit běh).
- ▶ **Importování vzorků** – Přejděte do externího souboru ve formátu *.csv (čárkou oddělené údaje). Na obrazovce Create Run (Vytvoření běhu) je k dispozici šablona ke stažení.

Ruční zadání vzorků

- 1 Na kartě Sample ID (ID vzorku) zadejte jedinečné ID vzorku. Použijte alfanumerické znaky a/nebo pomlčky (maximálně 40 znaků).
ID vzorku a odpovídající popis vzorku a pozice UDP jsou zobrazeny modře, čímž je označeno, že je vzorek zadán.
- 2 **[Volitelné]** Chcete-li vybrat pozitivní a negativní kontrolní vzorky, klikněte pravým tlačítkem myši na jamky se vzorky.
- 3 **[Volitelné]** Zadejte popis vzorku na kartě Sample Description (Popis vzorku). Popis vzorku může obsahovat alfanumerické znaky, tečky a speciální znaky `~!@#%\$_-_{}`. Mezery nejsou povoleny. Pokud je ID vzorku spojené s popisem vzorku znovu použito při pozdějším běhu, původní popis vzorku se přepíše.
- 4 Podle potřeby upravte doporučené pozice UDP. Navrhované pozice jamek pro vzorky jsou zvýrazněny žlutě, fialově, oranžově a růžově.
Pokud použijete navržené jamky pro vzorky, software automaticky vyplní indexové adaptéry UDP, které splňují požadavky na diverzitu indexů. Pokud zvolený počet vzorků neodpovídá přesnému počtu vzorků, které testujete, vyberte indexové adaptéry UDP pro další jamky.
- 5 **[Volitelné]** Chcete-li exportovat soubor s informacemi o vzorku, vyberte možnost **Export Samples** (Exportovat vzorky).
- 6 Vyberte možnost **Save Run** (Uložit běh).

Importování seznamu vzorků

Informace o vzorku můžete importovat ze souboru s informacemi o vzorku dříve exportovaného z modulu DNA GenerateFASTQ Dx pomocí funkce Export Samples (Exportovat vzorky) nebo ze souboru šablony, který lze vygenerovat výběrem možnosti **Template** (Šablona) na obrazovce Create Run (Vytvořit běh). Pokyny k vytváření a exportu informací o vzorcích naleznete v části *Ruční zadání vzorků na straně 4*.

Soubor šablony neobsahuje automaticky vyplněná doporučení UDP.

Úprava souboru šablony:

- 1 Pro nové rozvržení desky vyberte na obrazovce Create Run (Vytvořit běh) možnost **Template** (Šablona). Soubor se šablonou obsahuje správné nadpisy sloupců pro importování. Soubor upravte následujícím způsobem.
 - a Otevřete seznam vzorků v textovém editoru.
 - b Zadejte požadované informace o vzorku.
 - c Uložte soubor ve formátu *.csv (hodnoty oddělené čárkou). Ujistěte se, že jsou ID vzorků jedinečná.

Import informací o vzorku:

- 2 Vyberte možnost **Import Samples** (Importovat vzorky) a pak vyberte soubor CSV.
- 3 **[Volitelné]** Pomocí funkce **Export** (Exportovat) můžete informace o vzorku exportovat do externího souboru.
- 4 Vyberte možnost **Save Run** (Uložit běh).

Úprava běhu

Návod k úpravě informací o běhu před sekvenováním naleznete v *referenční příručce pro přístroj NextSeq 550Dx (dokument č. 1000000009513)*.

Metody analýzy

Analytický modul DNA GenerateFASTQ Dx provede následující kroky analýzy a poté zapíše výstupní soubory analýzy do složky Alignment (Zarovnání).

- ▶ Demultiplexace čtení indexů
- ▶ Generování souborů FASTQ

Demultiplexování

Demultiplexování porovnává každou sekvenci čtení indexu se sekvencemi indexu specifikovanými pro běh. V tomto kroku se nezohledňují žádné kvalitativní hodnoty.

Čtení indexu se identifikují pomocí následujících kroků:

- ▶ Vzorky jsou očíslované od 1 podle pořadí, ve kterém jsou uvedené v běhu.
- ▶ Číslo vzorku 0 je rezervováno pro klastry nepřirazené k žádnému vzorku.
- ▶ Klastry se ke vzorku přiřadí, když se sekvence indexu přesně shoduje nebo když se v indexu čtení vyskytuje maximálně jedna neshoda.

Generování souborů FASTQ

Po demultiplexování software generuje přechodné analytické soubory ve formátu FASTQ, což je textový formát používaný k reprezentaci sekvencí. Soubory FASTQ obsahují čtení pro každý vzorek a související skóre kvality. Všechny kontroly použité pro běh a klastry, které neprojdou filtry, se vyloučí.

Každý soubor FASTQ obsahuje čtení pouze pro jeden vzorek a název tohoto vzorku je v názvu souboru FASTQ. Soubory FASTQ jsou primárním vstupem pro zarovnání.

Zobrazení běhu a výsledků

- 1 Na ovládacím panelu modulu Local Run Manager vyberte název běhu.
- 2 Na kartě Run Overview (Přehled běhu) zkontrolujte metriky běhu sekvenování.
- 3 Chcete-li změnit umístění souboru dat analýzy, aby bylo v budoucnu možné znovu zařadit vybraný běh, vyberte ikonu **Edit** (Upravit) a upravte cestu výstupní složky běhu. Název výstupní složky běhu nelze upravit.
- 4 **[Volitelně]** Chcete-li zkopírovat cestu výstupní složky běhu, vyberte možnost **Copy to Clipboard** (Kopírovat do schránky).
- 5 Vyberte kartu Sequencing Information (Informace o sekvenování) a zkontrolujte parametry běhu a údaje o spotřebním materiálu.
- 6 Chcete-li zobrazit výkaz analýzy, vyberte kartu Samples & Results (Vzorky a výsledky).
 - ▶ Pokud byla analýza znovu zařazena, vyberte příslušnou analýzu z rozevíracího seznamu Select Analysis (Vybrat analýzu).
 - ▶ Na levém navigačním panelu vyberte ID vzorku a zobrazte výkaz pro další vzorek.
- 7 **[Volitelně]** Chcete-li zkopírovat cestu složky analýzy, vyberte možnost **Copy to Clipboard** (Kopírovat do schránky).

Výkaz výsledků

Výsledky jsou shrnuty na kartě Samples and Results (Vzorky a výsledky).

Vzorky

Tabulka 1 Tabulka pro vzorky

Záhlaví sloupce	Popis
Sample ID (ID vzorku)	ID vzorku zadané při vytvoření běhu.
Plate (Deska)	Deska přidaná k indexační desce při vytvoření běhu. Sloupec se zobrazí pouze v případě, že je vybrána indexační deska AB.
Index Well (Indexační jamka)	Indexační jamka s uvedením umístění jamky pro vzorek při vytváření běhu.
Description (Popis)	Popis vzorku zadaný při vytvoření běhu.
UDP	UDP použitý se vzorkem.
Control (Kontrola)	Pozitivní nebo negativní kontrola použitá pro vzorek.

Indexace

Tabulka 2 Tabulka pro indexaci

Záhlaví sloupce	Popis
Index Number (Číslo indexu)	Přidělené ID na základě pořadí, v jakém jsou vzorky uvedeny v tabulce vzorků.
Sample ID (ID vzorku)	ID vzorku zadané při vytvoření běhu.
UDP	UDP použitý se vzorkem.
% Reads Identified (PF) (% identifikovaných čtení (PF))	Procento čtení, které prošly filtry.

Výstupní soubory analýzy

Pro analytický modul DNA GenerateFASTQ Dx jsou generovány následující výstupní soubory analýzy.

Název souboru	Popis
Demultiplexování (*.demux)	Mezisoubory obsahující výsledky demultiplexování.
FASTQ (*.fastq.gz)	Mezisoubory obsahující přiřazení báze a s ním spojené skóre kvality. Soubory FASTQ jsou primárním vstupem pro zarovnání.

Formát demultiplexovacího souboru

Při demultiplexování se čte sekvence indexů přiřazená ke každému klastru, aby se určilo, ze kterého vzorku klastr pochází. Přiřazení mezi klastry a číslem vzorku se zapisuje do demultiplexovacího souboru (*.demux) pro každou dlaždicí průtokové kyvety.

Formát pojmenování demultiplexovacího souboru je **s_1_X.demux**, kde X je číslo dlaždice.

Demultiplexovací soubory začínají hlavičkou:

- ▶ Verze (4bajtové celé číslo), aktuálně 1
- ▶ Počet klastrů (4bajtové celé číslo)

Zbytek souboru tvoří čísla vzorků pro jednotlivé klastry z dlaždic.

Po dokončení demultiplexování vytvoří software demultiplexovací soubor s názvem **DemultiplexSummaryF1L1.txt**.

- ▶ **F1** představuje v názvu souboru číslo průtokové kyvety.
- ▶ **L1** představuje v názvu souboru číslo cesty.
- ▶ Výsledkem demultiplexování je tabulka s jedním řádkem pro každou dlaždicí a jedním sloupcem pro každý vzorek, včetně vzorku 0.
- ▶ Nejčastěji se vyskytující sekvence ve čteních indexu.

Formát souboru FASTQ

FASTQ je textový formát souboru, který obsahuje přiřazení báze a kvalitativní hodnoty pro každé čtení. Každý záznam má 4 řádky:

- ▶ Identifikátor
- ▶ Sekvence
- ▶ Znaménko plus (+)
- ▶ Skóre kvality Phred v kódovaném formátu ASCII + 33

Identifikátor je formátován jako:

@přístroj:ID běhu:ID průtokové kyvety:cesta:dlaždice:X:Y číslo čtení:příznak filtru:0:číslo vzorku

Příklad:

```
@SIM:1:FCX:1:15:6329:1045 1:N:0:2
TCGCACTCAACGCCCTGCATATGACAAGACAGAATC
+
<>;##=><9=AAAAAAAAA9#:<#<;<<<?????#=#
```

Doplňkové výstupní soubory

Následující výstupní soubory poskytují doplňující informace nebo shrnují výsledky běhu a chyby analýzy. Ačkoli nejsou tyto soubory pro vyhodnocení výsledků analýzy nutné, lze je použít při řešení problémů. Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny soubory umístěny ve složce Alignment (Zarovnání).

Název souboru	Popis
AdapterTrimming.txt	Vypisuje počet oříznutých bází a procento bází pro každou dlaždici. Tento soubor je k dispozici pouze v případě, že bylo pro běh zadáno oříznutí adaptéru.
AnalysisLog.txt	Protokol zpracování, který popisuje každý krok, k němuž došlo během analýzy aktuální složky běhu. Tento soubor neobsahuje chybová hlášení. Nachází se na kořenové úrovni složky běhu.
AnalysisError.txt	Protokol zpracování, ve kterém jsou uvedeny všechny chyby, které se vyskytly během analýzy. Tento soubor bude prázdný, pokud se nevyskytly žádné chyby. Nachází se na kořenové úrovni složky běhu.
CompletedJobInfo.xml	Vypisuje se po dokončení analýzy a obsahuje informace o průběhu, jako je datum, ID průtokové kvyety, verze softwaru a další parametry. Nachází se na kořenové úrovni složky běhu.
Checksum.csv	Obsahuje názvy souborů a jedinečné hodnoty kontrolních součtů pro určené a neurčené soubory FASTQ, soubory BCL a soubor SampleSheetUsed.csv .
DemultiplexSummaryF1L1.txt	Zobrazí výsledky demultiplexování v tabulce s jedním řádkem pro každou dlaždici a jedním sloupcem pro každý vzorek.
GenerateFASTQRunStatistics.xml	Obsahuje souhrnné statistiky specifické pro daný běh. Nachází se na kořenové úrovni složky běhu.

Složka analýzy

Ve složce analýzy jsou uloženy soubory vygenerované softwarem Local Run Manager.

Vztah mezi výstupní složkou a složkou analýzy je následující:

- ▶ Software Real-Time Analysis (RTA) během sekvenování naplní výstupní složku soubory vytvořenými během analýzy obrazu, přiřazení báze a vyhodnocování kvality (skóre kvality).
- ▶ Software RTA kopíruje soubory do složky analýzy v reálném čase. Po přiřazení skóre kvality každé bázi pro každý cyklus zapíše software do obou složek soubor RTAComplete.xml.
- ▶ Jakmile je vytvořen soubor RTAComplete.xml, zahájí se analýza.
- ▶ Během analýzy software Local Run Manager zapisuje výstupní soubory do složky analýzy a poté je kopíruje zpět do výstupní složky.

Složky zarovnání

Pokaždé, když je analýza znovu zařazena do fronty, vytvoří software Local Run Manager složku zarovnání s názvem **Alignment_N** (Zarovnání_N), kde N je pořadové číslo.

Struktura složky

- 📁 Data
- 📁 Alignment_### or Alignment_Imported_###
 - 📁 [Časové razítko běhu]
 - 📁 DataAccessFiles
 - 📁 Fastq

- FastqSummaryF1L1.txt
- Sample1_S1_L001_R1_001.fastq.gz
- Sample2_S2_L001_R2_001.fastq.gz
- Undetermined_S0_L001_R1_001.fastq.gz
- Undetermined_S0_L001_R2_001.fastq.gz
- Logging**
 - BuildFastq0.stdout.txt
 - BuildFastq1.stdout.txt
 - commands.txt
- Plots**
 - AdapterCounts.txt
 - AdapterTrimming.txt
 - AnalysisError.txt
 - AnalysisLog.txt
 - Checkpoint.txt
 - Checksum.csv
 - CompletedJobInfo.xml
 - DemultiplexSummaryF1L1.txt
 - GenerateFASTQRunStatistics.xml
 - SampleSheetUsed.csv

Přiřazení báze a diverzita indexů

Při sekvenování vzorků na přístroji NextSeq 550Dx se pomocí procesu přiřazení báze určuje báze (A, C, G nebo T) pro každý klastr dané dlaždice nebo zobrazovací oblasti na průtokové kyvetě v určitém cyklu. Přístroj NextSeq 550Dx používá dvoukanálové sekvenování, které vyžaduje k zakódování dat pro 4 báze DNA dva snímky, jeden z červeného a jeden ze zeleného kanálu.

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

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

Pokud indexy nesplňují požadavky na diverzitu, zobrazí se při výběru indexů během vytváření běhu varování o nízké diverzitě. Chcete-li předejít varování o nízké diverzitě, vyberte indexové sekvence, které poskytují signál v obou kanálech pro každý cyklus.

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

Tento proces přiřazení báze zajišťuje přesnost při analýze vzorků s nízkou četností. Další informace o sekvencích indexů naleznete v *příbalovém letáku pro sadu Illumina DNA Prep With Enrichment Dx*.

Během vytváření běhu zvolíte v softwaru Local Run Manager počet vzorků, které se mají testovat. Navrhované kombinace indexů, které splňují požadavky na diverzitu indexů, jsou automaticky vyplněny softwarem. Ačkoli není nutné používat navrhované kombinace indexů UDP, doporučuje se to.

Historie revizí

Dokument	Datum	Popis změny
Dokument č. 200015671 v01	Květen 2022	Přidána adresa australského sponzora. Vysvětleno omezení popisu vzorku.
Dokument č. 200015671 v00	Únor 2022	První vydání

Technická pomoc

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

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

Telefonní čísla na zákaznickou podporu společnosti Illumina

Oblast	Bezplatná linka	Regionální linka
Severní Amerika	+1 800 809 4566	
Austrálie	+1 800 775 688	
Belgie	+32 800 771 60	+32 340 029 73
Čína	400 066 5835	
Dánsko	+45 808 201 83	+45 898 711 56
Finsko	+358 800 918 363	+358 974 790 110
Francie	+33 805 102 193	+33 170 770 446
Hongkong, Čína	800960230	
Irsko	+353 180 093 6608	+353 016950506
Itálie	+39 800 985 513	+39 236 003 759
Japonsko	0800 111 5011	
Jižní Korea	+82 80 234 5300	
Německo	+49 800 101 4940	+49 893 803 5677
Nizozemsko	+31 800 022 2493	+31 207 132 960
Norsko	+47 800 168 36	+47 219 396 93
Nový Zéland	0800 451 650	
Rakousko	+43 800 006 249	+43 192 865 40
Singapur	+1 800 579 2745	
Spojené království	+44 800 012 6019	+44 207 305 7197
Španělsko	+34 911 899 417	+34 800 300 143
Švédsko	+46 850 619 671	+46 200 883 979
Švýcarsko	+41 565 800 000	+41 800 200 442
Taiwan, Čína	00806651752	
Ostatní země	+44 1799 534000	

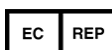
Bezpečnostní listy (SDS) – k dispozici na webu společnosti Illumina na adrese support.illumina.com/sds.html.

Dokumentace k produktu – je k dispozici ke stažení z webu support.illumina.com.



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, Kalifornie 92122 U.S.A.
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (mimo Severní Ameriku)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com

CE



Illumina Netherlands B.V.
Steenoven 19
5626 DK Eindhoven
Nizozemsko

Australský sponzor

Illumina Australia Pty Ltd
Nursing Association Building
Level 3, 535 Elizabeth Street
Melbourne, VIC 3000
Austrálie

URČENO K DIAGNOSTICE IN VITRO

© 2022 Illumina, Inc. Všechna práva vyhrazena.

illumina®