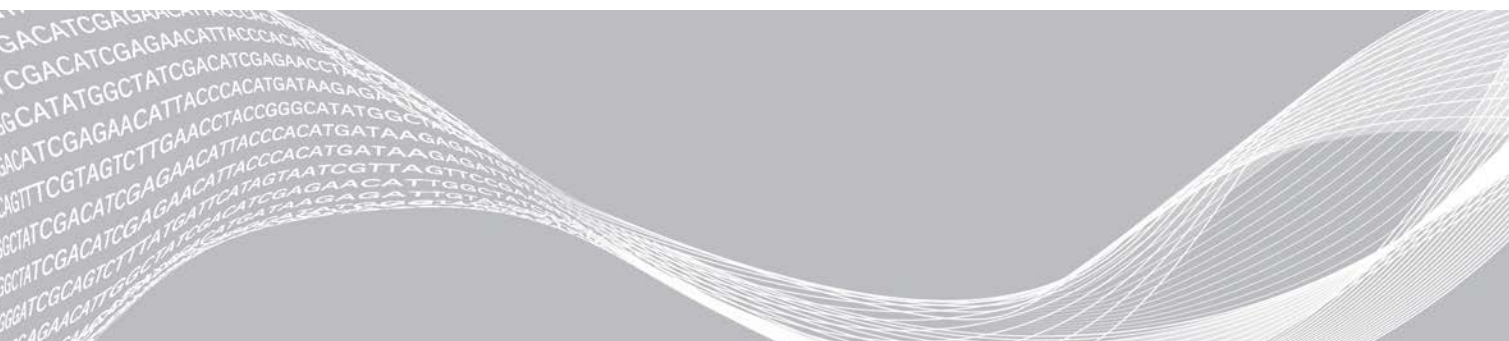


cBot 2

Руководство по системе



Настоящий документ и его содержание являются собственностью компании Illumina, Inc. и ее филиалов (далее — Illumina) и предназначены для использования исключительно в рамках договора с потребителем при эксплуатации изделия (-ий), описанного (-ых) в настоящем документе, и ни для какой иной цели. Настоящий документ и его содержание не подлежат использованию или распространению не по назначению и (или) передаче, раскрытию или воспроизведению каким-либо способом без предварительного письменного согласия компании Illumina. Посредством настоящего документа компания Illumina не передает какую-либо лицензию на патент, товарный знак, авторское право или права, регулируемые общим правом, или аналогичные права какой-либо третьей стороне.

Инструкции, изложенные в настоящем документе, должны строго и точно соблюдаться квалифицированным и прошедшим соответствующее обучение персоналом для обеспечения правильной и безопасной эксплуатации изделия (-ий), описанного (-ых) в настоящем документе. Перед началом эксплуатации изделий убедитесь, что вы полностью прочитали и поняли содержание настоящего документа.

НЕВЫПОЛНЕНИЕ ТРЕБОВАНИЙ ПО ПОЛНОМУ ПРОЧТЕНИЮ И ТОЧНОМУ ВЫПОЛНЕНИЮ ВСЕХ ИНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ, МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ИЗДЕЛИЯ (-ИЙ), ТРАВМАМ (ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ ИЛИ ИНЫХ ЛИЦ) И ПОВРЕЖДЕНИЮ ИМУЩЕСТВА И ПРИВЕДЕТ К ОТМЕНЕ ЛЮБЫХ ГАРАНТИЙНЫХ ОБЯЗАТЕЛЬСТВ, ПРИМЕНИМЫХ К ИЗДЕЛИЮ (-ЯМ).

КОМПАНИЯ ILLUMINA НЕ НЕСЕТ НИКАКОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТИ, ВОЗНИКАЮЩЕЙ ВСЛЕДСТВИЕ НЕНАДЛЕЖАЩЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЗДЕЛИЯ (-ИЙ), ОПИСАННОГО (-ОХ) В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ (ВКЛЮЧАЯ ИХ ЧАСТИ ИЛИ ЧАСТИ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ).

© Illumina, Inc., 2018. Все права защищены.

Все товарные знаки являются собственностью компании Illumina, Inc. или их соответствующих владельцев. Информацию о конкретных товарных знаках см. на веб-сайте по адресу www.illumina.com/company/legal.html.

История редакций

Документ	Дата	Описание изменений
Материал № 20015507, документ № 15065681, версия 04	Апрель 2019 г.	Обновлены описания и изображения планшета с реактивами.
Материал № 20015507, документ № 15065681, версия 03	Январь 2019 г.	Для стрипа с 8 пробирками HP5 обновлен цвет фольги (с красной на белую). Добавлена информация о денатурации и разбавлении библиотек Nextera DNA Flex. Убраны ссылки на комплекты TruSeq v2 GA, так как они больше не поддерживаются. Убран номер материала, так как этот документ больше не печатается.
Материал № 20015507, документ № 15065681, версия 02	Ноябрь 2016 г.	Для скоростной проточной кюветы HiSeq удалена информация об ориентации стрипов с 8 пробирками, содержащими праймеры. Быстрые праймеры загружены в HiSeq. Исправлен номер по каталогу Illumina для пробирок, входящих в стрип со штрихкодом cBot 2, на 20005160.
Материал № 20004364, документ № 15065681, версия 01	Январь 2016 г.	Обновлены описания программного обеспечения для программного обеспечения cBot версии 3.0, которое поддерживает кластерный комплект HiSeq 3000/4000 SR. Добавлена следующая информация. <ul style="list-style-type: none"> • Набор параметров и продолжительность кластеризации для проточной кюветы HiSeq 3000/4000 SR. • Объемы PhiX и библиотек для процедуры добавления PhiX для библиотек, кластеризация которых осуществляется на проточной кювете HiSeq 3000/4000. • Рекомендация по ежегодному профилактическому техническому обслуживанию. К инструкциям по выгрузке компонентов запуска добавлены варианты хранения проточных кювет. Информация по поиску и устранению неисправностей перенесена в Приложение А. Приведено упрощенное описание программного обеспечения в начале руководства. В раздел «Дополнительные ресурсы» добавлено « <i>Руководство по настройке системы cBot</i> » (документ № 100000005301).
Часть № 15065681, ред. А	Июль 2015 г.	Первый выпуск.

Содержание

Глава 1. Обзор	1
Введение	1
Дополнительные ресурсы	2
Комплекующие прибора cBot 2	2
Расходные материалы от компании Illumina	6
Планшеты с реактивами cBot	7
Глава 2. Начало работы	9
Запуск системы cBot 2	9
Совместимость версий компонентов запуска	9
Расходные материалы, приобретаемые пользователем	10
Глава 3. Подготовка реактивов	12
Введение	12
Проточная кювета HiSeq X	12
Проточная кювета HiSeq 3000/4000	17
Высокопроизводительная проточная кювета HiSeq High Output	21
Проточная кювета HiSeq Rapid	22
Глава 4. Кластеризация с отслеживанием образца	23
Введение	23
Рабочий процесс кластеризации с отслеживанием образца	24
Выполнение предварительной промывки	24
Загрузка расходных материалов	25
Загрузка коллектора	27
Выбор протокола	29
Сканирование расходных материалов	29
Выполнение проверки перед запуском	30
Мониторинг запуска	30
Выгрузка компонентов запуска	32
Выполнение промывки после запуска	33
Подтверждение подачи реактивов (дополнительно)	33
Глава 5. Кластеризация без отслеживания образца	35
Введение	35
Рабочий процесс кластеризации без отслеживания образца	35
Выполнение предварительной промывки	36
Выбор протокола	37
Загрузка расходных материалов	37
Выполнение проверки перед запуском	41
Мониторинг запуска	41
Выгрузка компонентов запуска	42
Выполнение промывки после запуска	44

Подтверждение подачи реактивов (дополнительно)	44
Глава 6. Техническое обслуживание	46
Выполнение периодического технического обслуживания	46
Выполнение ежемесячной профилактической промывки	47
Замена переходной пластины	48
Обновление программного обеспечения	49
Обновление набора параметров	50
Выключение прибора cBot 2	51
Приложение А. Поиск и устранение неисправностей	53
Приостановка или отмена запуска	53
Поиск и устранение неисправностей в случае сбоя при проверке потока	53
Поиск и устранение проблем в ходе запуска	56
Перезагрузка сканера штрихкодов.	56
Редактирование протоколов	57
Алфавитный указатель	59
Техническая помощь	63

Глава 1. Обзор

Введение	1
Дополнительные ресурсы	2
Комплектующие прибора cBot 2	2
Расходные материалы от компании Illumina	6
Планшеты с реактивами cBot	7

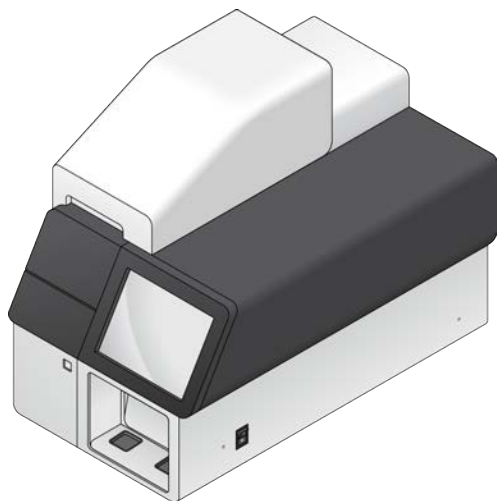
Введение

Прибор cBot 2 использует амплификацию для одновременного создания сотен миллионов одномолекулярных матриц ДНК.

Программное обеспечение cBot распределяет реактивы, регулирует время реакции, расход и температуру. Настройка и управление осуществляются непосредственно на приборе с помощью интерфейса программного обеспечения, выведенного на сенсорный экран монитора. Встроенный считыватель штрихкодов позволяет записывать реактивы, проточные кюветы и матрицы для каждого эксперимента.

Функция отслеживания положительного образца позволяет сканировать внутренний штрихкод для лучшего контроля библиотек, секвенирование которых выполняется в системе HiSeq. После загрузки расходных материалов крышка прибора закрывается. Затем внутренние сканеры записывают идентификационные номера планшета, проточной кюветы и стрипа с 8 пробирками.

Рисунок 1. cBot 2



Прибор cBot допускает использование нескольких кластерных комплектов. Используйте комплект, совместимый с прибором для секвенирования и с типом запуска секвенирования, который предполагается осуществить. Список доступных комплектов см. в разделе *«Расходные материалы от компании Illumina»* на стр. 6.

Отличия рабочего процесса для Illumina SeqLab

Если вы работаете с программой cBot 2 как частью комплекса Illumina SeqLab, то блок-схема вашего процесса отличается от таковой, описанной в данном руководстве. Различия, вызванные Clarity LIMS версии X Edition, влияют на все этапы от подготовки библиотеки до секвенирования. Посетите страницу поддержки Illumina SeqLab на сайте компании Illumina, чтобы создать руководство по пользовательскому рабочему процессу для конкретного эксперимента.

Дополнительные ресурсы

Следующую информацию можно загрузить с веб-сайта компании Illumina.

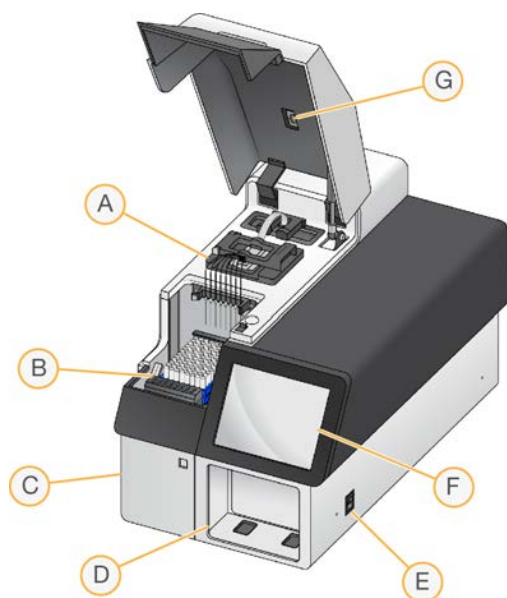
Ресурс	Описание
<i>Руководство по подготовке рабочего места для системы cBot (документ № 15053710)</i>	Содержит технические характеристики, касающиеся лабораторного пространства, требований к электроснабжению и рекомендаций по условиям окружающей среды, а также инструкции по настройке прибора.
<i>Руководство по технике безопасности и нормативно-правовому соответствию для системы cBot 2 (документ № 15065643)</i>	Содержит сведения о маркировке прибора, сертификатах соответствия и рекомендации по безопасности.
<i>Руководство по денатурированию и разбавлению библиотек для системы HiSeq (документ № 15050107)</i>	Содержит инструкции по денатурированию и разбавлению подготовленных библиотек перед началом секвенирования, а также инструкции по подготовке контроля PhiX. Этот этап применяется для большинства типов библиотек и проточных кювет.

Посетите страницу поддержки прибора cBot 2 на веб-сайте компании Illumina, чтобы получить доступ к документации, загрузкам программного обеспечения, обучению онлайн и часто задаваемым вопросам.

Комплектующие прибора cBot 2

Прибор cBot 2 оснащен датчиками для определения наличия компонентов запуска и предупреждает пользователя в случае, если какие-либо компоненты отсутствуют или установлены неправильно. Нагревательный столик и столик для реактивов расположены под крышкой прибора. Магнитный переключатель удерживает крышку закрытой, а датчик указывает, когда она открыта. Ради соблюдения безопасности программное обеспечение предложит вам закрыть крышку и только затем приступить к выполнению запуска.

Рисунок 2. Комплектующие прибора cBot 2



- A **Нагревательный столик** удерживает проточную кювету и регулирует ее температуру на протяжении запуска.
- B **Столик для реактивов** удерживает планшет с реактивами cBot, матрицы библиотеки и специализированные праймеры. Для запусков с отслеживанием образца сканер штрихкодов расходных материалов, расположенный позади столика для реактивов, считывает идентификационный номер планшета с реактивами и стрип на восемь пробирок, в которых содержатся матрицы.
- C **Отсек с бутылкой для отходов:** в этом отсеке помещается контролируемая датчиком бутылка для отходов, в которую собираются использованные реактивы.
- D **Внешний сканер штрихкодов** записывает уникальные идентификационные номера планшета с реактивами и проточной кюветы, используемых в каждом запуске без отслеживания образца.
- E **Переключатель питания** включает прибор. Кнопка запуска, расположенная слева от отсека для размещения бутылки для отходов, запускает программное обеспечение прибора.
- F **Сенсорный монитор** позволяет производить настройку запуска на приборе и визуально отслеживать состояние процесса генерации кластеров.
- G **Сканер штрихкодов проточной кюветы** записывает уникальный идентификационный номер проточной кюветы, используемой в каждом запуске с отслеживанием образца.

Нагревательный столик

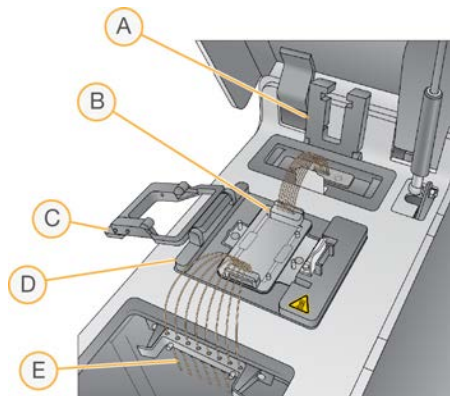
Нагревательный столик предназначен для крепления проточной кюветы и коллектора, который располагается над проточной кюветой. Зажим проточной кюветы соединяет проточную кювету и коллектор.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Запрещается прикасаться к алюминиевому термоблоку на нагревательном столике. Работающий нагреватель может причинить серьезные ожоги. Для получения более подробной информации по технике безопасности см. «Руководство по безопасности и нормативно-правовому соответствию системы cBot 2» (документ № 15065643).

Рисунок 3. Нагревательный столик



- A Зажим выходного отверстия
- B Переходная пластина и коллектор проточной кюветы
- C Зажим проточной кюветы
- D Нагревательный столик
- E Гребенка сипперов

Коллектор представляет собой одноразовый компонент, с помощью которого реактивы подаются из планшета на проточную кювету. Сипперы на гребенке прокалывают расположенные на планшете с реактивами пробирки, запаянные фольгой. Выходной конец коллектора направляет отходы в контейнер для отходов. Зажим выходного отверстия удерживает выходной конец коллектора на месте.

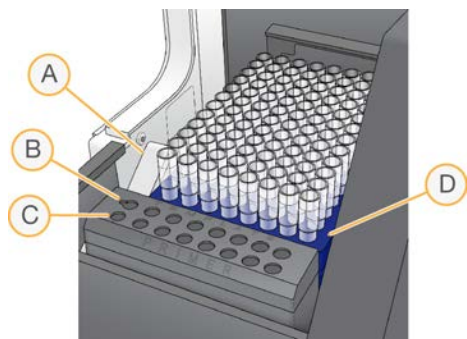
Переходные пластины для проточных кювет

Прибор cBot генерирует кластеры в проточных кюветах HiSeq. При использовании другого типа проточной кюветы смените переходную пластину на площадке проточной кюветы. Подробно см. в разделе *«Замена переходной пластины»* на стр. 48.

Столик для реактивов

На столике для реактивов закрепляется планшет с реактивами cBot. Планшет с реактивами фиксируется в нужном положении специальным рычагом. Два держателя стрипов на восемь пробирок в передней части планшета с реактивами предназначены для матриц подготовленных библиотек и дополнительных праймеров. Левая сторона ряда для матрицы снабжена меткой для правильной ориентации стрипа на восемь пробирок, который используется в рабочем процессе отслеживания образца.

Рисунок 4. Столик для реактивов cBot 2



- A Рычаг планшета с реактивами
- B Ряд для матриц
- C Ряд для праймеров
- D Планшет с реактивами cBot






Программное обеспечение cBot

Интерфейс программного обеспечения cBot подсказывает пользователю, как настраивать прибор и отслеживать ход кластеризации. Во время генерирования кластеров используются следующие страницы экрана: Start (Главная), Run (Запуск), Setup (Настройки) и Run Status (Статус запуска).

С помощью интерфейса программного обеспечения можно настроить отслеживание положительного образца, требования для входных данных, предпочтения для процесса промывки, рассылку извещений по электронной почте и удаленный мониторинг.

Значки статуса датчика

Значки статуса датчика отображаются в нижней части экрана и показывают, правильно ли установлен тот или иной компонент и готов ли он к выполнению запуска.

Пиктограмма	Значение
	Установлена переходная пластина проточной кюветы GAllx*.
	Установлена переходная пластина проточной кюветы HiSeq.
	Переходная пластина проточной кюветы неизвестного типа.
	Крышка прибора открыта.
	Крышка прибора закрыта.
	Бутыль для отходов на месте и готова к использованию.
	Бутыль для отходов заполнена.
	Бутыль для отходов отсутствует.
	Охлаждающий агент циркулирует в системе, уровень охлаждающего агента достаточный.
	Предупреждение: охлаждающий агент циркулирует в системе, уровень охлаждающего агента низкий.
	Ошибка: охлаждающий агент не циркулирует в системе, уровень охлаждающего агента нормальный.
	Ошибка: охлаждающий агент не циркулирует в системе, уровень охлаждающего агента низкий.
	Коллектор установлен, гребенка сипперов закреплена.
	Коллектор не установлен, или гребенка сипперов не закреплена.

* Эта опция видна, но больше не поддерживается.

Настройка

С помощью интерфейса программного обеспечения можно настроить отслеживание положительного образца, параметры системы, требования для входных данных и предпочтения для процесса промывки. С помощью подключения к сети можно активировать удаленный мониторинг, рассылку предупреждений по электронной почте и поддержку LIMS. Настройки можно изменять по мере надобности перед началом каждого запуска.

Инструкции по настройке см. в «Руководстве по настройке системы cBot» (документ № 1000000005301).

Расходные материалы от компании Illumina

Реактивы cBot поставляются в планшете для реактивов, который загружается непосредственно в прибор после размораживания. Планшеты с реактивами cBot входят в состав следующих комплектов Illumina.

Описания содержимого комплектов и другая документация по комплектам доступны на странице поддержки прибора **cBot 2** на веб-сайте Illumina. Инструкции по подготовке реактивов см. в разделе *«Подготовка реактивов»* на стр. 12.

Кластерные комплекты для кювет HiSeq

В каждый комплект входит проточная кювета HiSeq, коллектор, соответствующий типу кюветы, а также реактивы, необходимые для кластеризации на проточной кювете в приборе cBot.

Наименование комплекта	Номер комплекта по каталогу
Кластерный комплект HiSeq 3000/4000 SR	№ по каталогу GD-410-1001
Кластерный комплект HiSeq 3000/4000 PE	№ по каталогу PE-410-1001
Кластерный комплект HiSeq SR v4	№ по каталогу GD-401-4001
Кластерный комплект HiSeq PE v4	№ по каталогу PE-401-4001
Кластерный комплект TruSeq SR v3 — HS	№ по каталогу GD-401-3001
Кластерный комплект TruSeq PE v3 — HS	№ по каталогу PE-401-3001
Комплект для загрузки образцов HiSeq Rapid Duo cBot	№ по каталогу CT-403-2001

Кластерные комплекты для кювет HiSeq X

В каждый комплект входит несколько проточных кювет HiSeq X, коллекторы, соответствующие типу кюветы, а также реактивы, необходимые для кластеризации на каждой проточной кювете в приборе cBot. Комплект с одной упаковкой содержит расходные материалы для кластеризации на двух проточных кюветах, а комплект с десятью упаковками содержит расходные материалы для кластеризации на двадцати проточных кюветах.

Наименование комплекта	Номер комплекта по каталогу
Комплект реактивов HiSeq X Ten v2.5	№ по каталогу FC-501-2501
Комплект реактивов HiSeq X Ten v2.5 (10 упаковок)	№ по каталогу FC-501-2521
Комплект реактивов HiSeq X Five v2.5	№ по каталогу FC-502-2501
Комплект реактивов HiSeq X Five v2.5 (10 упаковок)	№ по каталогу FC-502-2102

Комплекты для регибридизации

При необходимости восстановления запуска или после длительного хранения проточной кюветы воспользуйтесь комплектом для регибридизации cBot и проведите регибридизацию праймера Read 1 (Считывание 1).

Наименование комплекта	Номер по каталогу
Комплект для регибридизации нескольких праймеров HiSeq X cBot Multi-Primer v2	№ по каталогу GD-305-2001
Комплект для регибридизации нескольких праймеров HiSeq 3000/4000 cBot Multi-Primer	№ по каталогу GD-310-1001
Комплект для регибридизации нескольких праймеров TruSeq v2 cBot Multi-Primer	№ по каталогу GD-304-2001
Комплект для регибридизации нескольких праймеров HiSeq® Multi-Primer v4	№ по каталогу GD-403-4001

Для получения более подробной информации см. руководство по регибридизации для используемой проточной кюветы.

- ▶ *HiSeq X* — регибридизация праймера Read 1 (Считывание 1) на проточной кювете HiSeq X (документ № 15053711).
- ▶ *HiSeq 3000/4000* — регибридизация праймера Read 1 (Считывание 1) на проточной кювете HiSeq 3000/4000 (документ № 15058794).
- ▶ *TruSeq v3* — регибридизация праймера Read 1 (Считывание 1) на проточной кювете TruSeq v3 (документ № 15018149).

Праймер секвенирования Read 1 (Считывание 1) для библиотек Nextera

Праймер секвенирования Read 1 (Считывание 1) (HP6) из указанных ниже комплектов несовместим с библиотеками Nextera.

- ▶ Кластерный комплект TruSeq v3 — HS.

При секвенировании библиотек Nextera вне зависимости от типа выполняемого запуска следует использовать праймер секвенирования Read 1 (Считывание 1) (HP10). HP10 входит в комплект праймеров секвенирования с двойным индексированием TruSeq.

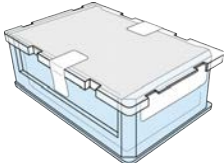
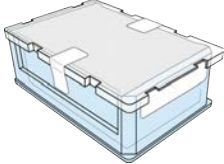

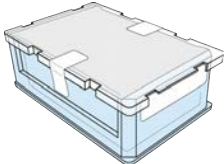
Наименование комплекта	Номер по каталогу
Комплект праймеров секвенирования с двойным индексированием с одним считыванием TruSeq	№ по каталогу FC-121-1003
Комплект праймеров секвенирования парных концевых фрагментов с двойным индексированием TruSeq	№ по каталогу PE-121-1003

Во все остальные комплекты cBot входят праймеры HP10, которые совместимы с библиотеками TruSeq и Nextera.

Планшеты с реактивами cBot

Конфигурация планшета с реактивами зависит от типов комплекта, включая число рядов, содержащих реактивы.

Каждый стрип на 8 пробирок имеет этикетку с названием реактива, после которого указан номер. Номер обозначает ряд, который занимает реактив на планшете. Если стрип на 8 пробирок сместится, используйте номер ряда на этикетке, чтобы вернуть стрип с пробирками в правильное положение.

Тип проточной кюветы	Описание планшета с реактивами
HiSeq X и HiSeq 3000/4000	Содержит 12 рядов с 8 глубокими лунками. Каждый реактив занимает целый ряд из 8 лунок. Не все ряды содержат реактивы.
	
HiSeq High Output (HiSeq v4)	Содержит 12 рядов с 8 глубокими лунками. Каждый реактив занимает целый ряд из 8 лунок. Не все ряды содержат реактивы. Ряды с 9 по 12 пустые.
	
HiSeq High Output (TruSeq v3)	Содержит 11 рядов запаянных фольгой стрипов на 8 пробирок, заполненных реактивами для генерации кластеров. Ряд 12 пустой.
	
HiSeq Rapid	Содержит 12 рядов с 8 глубокими лунками. Первые 3 ряда заполнены реактивами для гибридизации матрицы и реактивами для первого расширения. Ряды с 4 по 12 пустые.
	



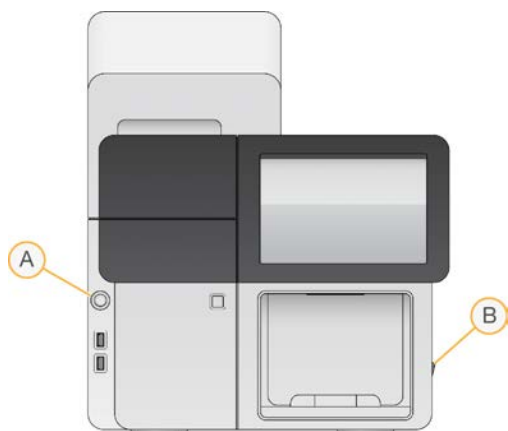
ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Кроме планшетов с реактивами для проточной кюветы быстрого запуска HiSeq rapid, данные наборы реактивов содержат формамид — алифатический амид, являющийся токсином, который может оказывать воздействие на репродуктивную систему. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Утилизируйте контейнеры и любое неиспользованное содержимое в соответствии с региональными правительственными стандартами безопасности. Для получения подробной информации см. паспорт безопасности вещества для данного комплекта на веб-сайте support.illumina.com/sds.html.

Глава 2. Начало работы

Запуск системы cBot 2	9
Совместимость версий компонентов запуска	9
Расходные материалы, приобретаемые пользователем	10

Запуск системы cBot 2



- A Кнопка пуска
- B Переключатель питания

- 1 Переведите переключатель питания на правой стороне прибора в положение «ВКЛ.».
- 2 Нажмите кнопку запуска, расположенную слева от отсека для размещения бутылки для отходов, чтобы запустить программное обеспечение.
По окончании процедуры появится главный экран прибора.

Совместимость версий компонентов запуска

Для лучшего качества и результата работы всегда пользуйтесь совместимыми версиями программного обеспечения и комплектов cBot.

Версия комплекта	Версия набора параметров	Версия программного обеспечения
Кластерный комплект HiSeq 3000/4000	Наборы параметров версии 1.0	cBot версии 3.0.46 или более поздней (комплект SR) cBot версии 2.0.34 или более поздней (комплект PE)
Комплект реактивов HiSeq X Ten v2.5	Наборы параметров версии 2.0	cBot версии 2.0.29 или более поздней
Комплект реактивов HiSeq X Five v2.5	Наборы параметров версии 2.0	cBot версии 2.0.29 или более поздней
Кластерный комплект HiSeq v4	Наборы параметров версии 9.0	cBot версии 2.0.16 или более поздней
Комплект для загрузки образцов HiSeq Rapid Duo cBot	Наборы параметров версии R	cBot версии 1.5 или более поздней
Комплект праймеров для секвенирования с двойным индексированием TruSeq	Рецептуры версии 8.0 (HiSeq) Рецептуры версии 7.0 (GA)	cBot версии 1.4.36 или более поздней
Кластерный комплект TruSeq v3 — HS	Наборы параметров версии 8.0	cBot версии 1.4 или более поздней
Кластерный комплект TruSeq v2 — GA *	Наборы параметров версии 7.0	cBot версии 1.3 или более поздней

* Эта опция видна, но больше не поддерживается.

cBot: наборы параметров и типы проточных кювет

Проточная кювета	Название основного набора параметров
Структурированная проточная кювета HiSeq 3000/4000	HiSeq_3000_4000_SR_HD_Exclusion_Amp_v1.0 HiSeq_3000_4000_HD_Exclusion_Amp_v1.0
Структурированная проточная кювета HiSeq X Ten v2.5	HiSeq_X_HD_Exclusion_Amp_v2.0
Структурированная проточная кювета HiSeq X Five v2.5	HiSeq_X_HD_Exclusion_Amp_v2.0
Проточная кювета HiSeq v4	SR_HiSeq_Cluster_Kit_v4_cBot_recipe_v9.0 PE_HiSeq_Cluster_Kit_v4_cBot_recipe_v9.0
Проточная кювета TruSeq v3	SR_Amp_Lin_Block_TubeStripHyb_v8.0 PE_Amp_Lin_Block_TubeStripHyb_v8.0 SR_Amp_Lin_Block_Hyb_v8.0 PE_Amp_Lin_Block_Hyb_v8.0
Проточная кювета HiSeq Rapid v2	RR_TemplateHyb_FirstExt_vR ¹

¹ Используется только с комплектами Rapid Duo.

Расходные материалы, приобретаемые пользователем

Для подготовки реактивов для кластеризации, поставляемых в комплектах HiSeq X[®] и HiSeq 3000/4000[®], применяются следующие расходные материалы, приобретаемые пользователем. Убедитесь, что для рабочего процесса используется правильный стрип на восемь пробирок.

В комплектах HiSeq X и HiSeq 3000/4000 вводится новый этап обработки — денатурация перед кластеризацией на cBot 2. При использовании этих комплектов библиотеки денатурируются в стрипе на 8 пробирок перед добавлением реакционной смеси ExAmp.

Компонент	Поставщик	Цель
1 н. NaOH	Основной поставщик лаборатории	Денатурирование библиотеки
Стрипы на восемь колпачков, плоские	Fisher Scientific, № по каталогу: АВ-0784	Закрытие колпачками стрипов на восемь пробирок без метки, когда они не загружены в прибор cBot
Стрипы на восемь пробирок, 0,2 мл	Fisher Scientific, № по каталогу: АВ-0264	Смесь для реакции ExAmp и смесь библиотек на приборе cBot (рабочий процесс кластеризации без отслеживания образца)
200 мМ трис-HCl, pH 8.0	Основной поставщик лаборатории	Денатурирование библиотеки после разведения раствора NaOH до 0,1 н.
Стрипы с пробирками cBot 2 со штрихкодом (восемь лунок)	Illumina, № по каталогу: 20005160	Реакция ExAmp и смесь библиотек на приборе cBot (рабочий процесс кластеризации с отслеживанием образца)
Вода лабораторного класса	Millipore или основной поставщик лаборатории	Денатурирование библиотеки
Микропробирки для центрифугирования, 1,5 мл	VWR, № по каталогу: 20170-038 *	Приготовление основной смеси для реакции ExAmp

* Или эквивалент.

Глава 3. Подготовка реактивов

Введение	12
Проточная кювета HiSeq X	12
Проточная кювета HiSeq 3000/4000	17
Высокопроизводительная проточная кювета HiSeq High Output	21
Проточная кювета HiSeq Rapid	22

Введение

Инструкции по подготовке реактивов зависят от того, каким комплектом вы пользуетесь. Инструкции изложены в соответствии с типом проточной кюветы, к которым относятся HiSeq X, HiSeq 3000/4000, HiSeq High Output и HiSeq Rapid.

После приготовления реактивы для кластеризации могут быть загружены в прибор cBot, как только программное обеспечение напомнит об этом.

Методические рекомендации

- ▶ Во время подготовки реактивов для кластеризации надевайте новую пару перчаток.
- ▶ Не снимайте защитную прозрачную пластиковую крышку с планшета с реактивами до тех пор, пока не будете готовы к загрузке реактивов в прибор cBot. Запрещается прокалывать колпачки из фольги.
- ▶ Держите планшеты с реактивами, в которых установлены стрипы на 8 пробирок, за основание планшета, чтобы не допустить смещения пробирок с реактивами. Проверяйте прочность фиксации пробирок в планшете с реактивами до и после обработки на вихревой мешалке или переворачивания. Непрочная фиксация пробирок может привести к повреждению коллектора прибора cBot.
- ▶ Для генерации кластеров в проточной кювете HiSeq X или HiSeq 3000/4000 **всегда** готовьте свежеразбавленный раствор NaOH для денатурирования библиотек. Этот этап является обязательным для процесса денатурирования. Для предотвращения небольших погрешностей дозирования пипеткой приготовьте не менее 1 мл свежеразбавленного 0,1 н. раствора NaOH.

Проточная кювета HiSeq X

Подготовьте структурированную проточную кювету HiSeq X, затем подготовьте реактивы для кластеризации. Для подготовки реактивов для кластеризации разморозьте планшет реактивов cBot и подготовьте мастер-микс ExAmp.

Если используется комплект из 10 упаковок, подготовьте 4 проточные кюветы и разморозьте 4 планшета с реактивами cBot. Необходимо 4 прибора cBot. После подготовки реактивы хранить нельзя.



ПРИМЕЧАНИЕ

Инструкции по подготовке реактивов, описанные в настоящем руководстве, не применяются к автоматизированному рабочему процессу, который используется для Illumina SeqLab. Инструкции по рабочему процессу Illumina SeqLab см. по адресу support.illumina.com/custom-protocol-selector.html.

Сведения о реактивах

- ▶ Реактивы ExAmp являются вязкими, особенно реактивы EPX2 и EPX3. Аспирируйте и распределяйте реактивы медленно, чтобы обеспечить точность дозирования пипеткой.
- ▶ Реактив EPX3 остается неподвижным при переворачивании из-за вязкости.
- ▶ Реактивы ExAmp **запрещается обрабатывать на вихревой мешалке** и повторно замораживать после разморозки.
- ▶ Мастер-микс ExAmp может быть мутным — это нормально. Если произойдет расслоение раствора на мутную и прозрачную части, медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое.

Подготовка проточной кюветы

- 1 Извлеките упаковку с новой проточной кюветой из места хранения с температурой от 2 до 8 °С.
- 2 Выдержите упаковку с проточной кюветой при комнатной температуре в течение не менее 30 минут.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если упаковка из фольги не повреждена, проточная кювета может оставаться при комнатной температуре до 12 часов. Упаковку с проточной кюветой можно вернуть в хранилище с температурой от 2 до 8 °С для последующего использования только один раз. Избегайте повторного охлаждения и нагревания проточной кюветы.

- 3 Наденьте новую пару неопудренных перчаток.
- 4 Откройте упаковку из фольги, отделив пленку на изогнутом крае. Используйте проточную кювету в течение 4 часов после вскрытия упаковки из фольги.

Рисунок 5. Открытие упаковки проточной кюветы



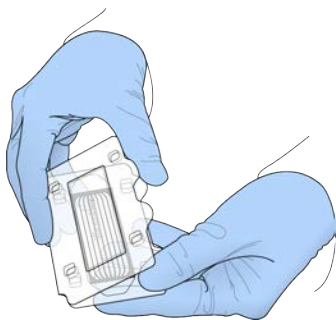
- 5 Извлеките двустороннюю блистерную упаковку из упаковки из фольги.

Рисунок 6. Извлечение из упаковки из фольги



- 6 Откройте двустороннюю блистерную упаковку и достаньте проточную кювету.

Рисунок 7. Извлечение проточной кюветы из двусторонней блистерной упаковки



- 7 Очистите проточную кювету безворсовой спиртовой салфеткой.
- 8 Вытрите насухо безворсовой салфеткой.
- 9 Отложите в сторону при комнатной температуре.

Разморозка планшета с реактивами cBot

- 1 Извлеките планшет с реактивами cBot из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.
- 2 Размораживайте реактивы на водяной бане комнатной температуры в течение приблизительно 60 минут.

Разморозка реактивов EPX1, EPX2, EPX3 и RSB

- 1 Извлеките по одной пробирке каждого из следующих реактивов из хранилища с температурой от -25 до -15 °C.
 - ▶ **Комплект из одной упаковки** — EPX1, EPX2, EPX3 и RSB. Каждая пробирка содержит достаточное количество реактивов для одной проточной кюветы.
 - ▶ **Комплект из десяти упаковок** — EPX1M, EPX2M, EPX3M и RSB. Каждая пробирка содержит достаточное количество реактивов для четырех проточных кювет.

- 2 Размораживайте при комнатной температуре в течение 10 минут.
- 3 Поместите на лед.

Подготовка свежего раствора гидроксида натрия (NaOH)

- 1 Слейте в пробирку для микроцентрифуги следующие объемы веществ:
 - ▶ вода лабораторного класса (900 мкл);
 - ▶ основной раствор 1 н. NaOH (100 мкл).Получится 1 мл 0,1 н. раствора NaOH.
- 2 Переверните для перемешивания содержимого.

Денатурирование библиотек и добавление контрольного образца PhiX (дополнительно)

Загружаемая концентрация библиотеки зависит от библиотек, секвенирование которых будет проводиться. Следующие инструкции применяются к библиотекам TruSeq Nano DNA (350 п. о.) или TruSeq DNA PCR-Free (350 п. о.). Разведите библиотеку до концентрации, соответствующей типу библиотеки.

- ▶ Если загружаемая концентрация ДНК слишком высокая, это ведет к снижению числа кластеров, прошедших через фильтр (%PF).
- ▶ Если загружаемая концентрация ДНК слишком низкая, это ведет к снижению числа кластеров, прошедших через фильтр (%PF), и высокому проценту копий, что негативно влияет на глубину покрытия.

Повторите следующие инструкции для каждой проточной кюветы, предназначенной для секвенирования.

- 1 Разведите библиотеку или объединенные библиотеки до соответствующей концентрации.
 - ▶ **Библиотеки TruSeq Nano DNA:** развести до 2–3 нмоль/л в реактиве RSB.
 - ▶ **Библиотеки TruSeq Nano DNA PCR-Free:** развести до 1–2 нмоль/л в реактиве RSB.
- 2 **[Дополнительно]** Подмешайте 1 % *неденатурированного* контрольного материала Illumina PhiX к *не прошедшим денатурацию* библиотекам.
 - ▶ **Библиотеки TruSeq Nano DNA:** добавить 0,5 мкл контроля PhiX в концентрации 2–3 нмоль/л к 50 мкл библиотеки с концентрацией 2–3 нмоль/л.
 - ▶ **Библиотеки TruSeq Nano DNA PCR-Free:** добавить 0,5 мкл контрольного образца PhiX в концентрации 1–2 нмоль/л к 50 мкл библиотеки с концентрацией 1–2 нмоль/л.
- 3 Пронумеруйте пробирки в стрипе на восемь пробирок.
 - ▶ Для кластеризации с отслеживанием образца: начиная с меченого конца, пронумеруйте пробирки с № 8 по № 1.



- ▶ Для кластеризации без отслеживания образца: пронумеруйте пробирки с № 1 по № 8. При подготовке 4 проточных кювет предусмотрите добавление еще одного кодового обозначения на стрип с 8 пробирками для надлежащего отслеживания.
- 4 Разведите библиотеки в стрипе на 8 пробирок следующим образом.

- a Добавьте 5 мкл *неденатурированной* библиотеки на дно каждой лунки.
 - b Добавьте 5 мкл свежеразбавленного раствора 0,1 н. NaOH. Медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое.
 - c Инкубируйте при комнатной температуре в течение 8 минут.
 - d Добавьте 5 мкл трис-солянокислого буфера (200 ммоль, pH 8,0) и медленно пипетируйте до перемешивания.
- 5 Поместите на лед до момента добавления мастер-микса ExAmp.



ОСТОРОЖНО!

Подготовьте и добавьте мастер-микс ExAmp в течение **30 минут**.

Подготовка планшета с реактивами cBot

- 1 Переверните для перемешивания содержимого.
- 2 Обработайте на вихревой мешалке, чтобы удалить оставшиеся пузырьки воздуха.
- 3 Постучите по твердой поверхности, чтобы собрать капли реактива. Вместо этого можно использовать импульсную центрифугу.
- 4 Поместите на лед.

Подготовка реакции ExAmp

Подготовьте мастер-микс для реакции ExAmp непосредственно перед использованием. Следуйте инструкциям, соответствующим количеству подготавливаемых проточных кювет.

Реакция ExAmp для одной проточной кюветы (комплект реактивов из одной упаковки)

- 1 Переверните реактивы EPX1 и EPX2 для перемешивания содержимого.
- 2 Кратковременно центрифугируйте реактивы EPX1, EPX2 и EPX3.
- 3 Приготовьте мастер-микс ExAmp в пробирке объемом 1,5 мл следующим образом.
 - a Добавьте 210 мкл реактива EPX1.
 - b Добавьте 30 мкл реактива EPX2. Медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое.
 - c Добавьте 110 мкл реактива EPX3. Медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое. На дне пробирки не должно быть пузырьков.
- 4 Добавьте 35 мкл мастер-микса на дно каждой лунки стрипа на восемь пробирок.
 - ▶ Медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое.
 - ▶ Меняйте наконечники для каждого образца.
- 5 Кратковременно центрифугируйте, затем поместите на лед не более чем на 15 минут, то есть до момента готовности к загрузке в прибор cBot.

Реакция ExAmp для 4 проточных кювет (комплект реактивов из 10 упаковок)

- 1 Переверните реактивы EPX1M и EPX2M для перемешивания содержимого.
- 2 Кратковременно центрифугируйте реактивы EPX1M, EPX2M и EPX3M.

- 3 Приготовьте мастер-микс ExAmp в пробирке объемом 1,5 мл следующим образом.
 - a Добавьте 756 мкл реактива EPX1M.
 - b Добавьте 108 мкл реактива EPX2M. Медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое.
 - c Добавьте 396 мкл реактива EPX3M. Медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое. На дне пробирки не должно быть пузырьков.
- 4 Добавьте 35 мкл мастер-микса на дно каждой лунки стрипа на восемь пробирок.
 - ▶ Медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое.
 - ▶ Меняйте наконечники для каждого образца.
- 5 Кратковременно центрифугируйте стрип с 8 пробирками, затем поместите на лед не более чем на 15 минут, то есть до момента готовности к загрузке в прибор cBot.

Проточная кювета HiSeq 3000/4000

Подготовьте структурированную проточную кювету HiSeq 3000/4000, затем подготовьте реактивы для кластеризации. Для подготовки реактивов для кластеризации разморозьте планшет реактивов cBot и подготовьте мастер-микс для реакции ExAmp.

Сведения о реактивах

- ▶ Реактивы ExAmp являются вязкими, особенно реактивы EPX2 и EPX3. Аспирируйте и распределяйте реактивы медленно, чтобы обеспечить точность дозирования пипеткой.
- ▶ Реактив EPX3 остается неподвижным при переворачивании из-за вязкости.
- ▶ Реактивы ExAmp **запрещается обрабатывать на вихревой мешалке** и повторно замораживать после разморозки.
- ▶ Мастер-микс ExAmp может быть мутным — это нормально. Если произойдет расслоение раствора на мутную и прозрачную части, медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое.

Подготовка проточной кюветы

- 1 Извлеките упаковку с новой проточной кюветой из места хранения с температурой от 2 до 8 °С.
- 2 Выдержите упаковку с проточной кюветой при комнатной температуре в течение не менее 30 минут.



ПРИМЕЧАНИЕ

Если упаковка из фольги не повреждена, проточная кювета может оставаться при комнатной температуре до 12 часов. Упаковку с проточной кюветой можно вернуть в хранилище с температурой от 2 до 8 °С для последующего использования только один раз. Избегайте повторного охлаждения и нагревания проточной кюветы.

- 3 Наденьте новую пару неопудренных перчаток.

- 4 Откройте упаковку из фольги, отделив пленку на изогнутом крае.
Используйте проточную кювету в течение 4 часов после вскрытия упаковки из фольги.

Рисунок 8. Открытие упаковки проточной кюветы



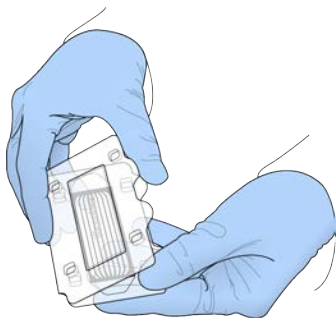
- 5 Извлеките двустороннюю блистерную упаковку из упаковки из фольги.

Рисунок 9. Извлечение из упаковки из фольги



- 6 Откройте двустороннюю блистерную упаковку и достаньте проточную кювету.

Рисунок 10. Извлечение проточной кюветы из двусторонней блистерной упаковки



- 7 Очистите проточную кювету безворсовой спиртовой салфеткой.
- 8 Вытрите насухо безворсовой салфеткой.
- 9 Отложите в сторону при комнатной температуре.

Разморозка планшета с реактивами cBot

- 1 Извлеките планшет с реактивами cBot из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.
- 2 Размораживайте на водяной бане комнатной температуры в течение 60 минут.

Разморозка реактивов EPX1, EPX2, EPX3 и RSB

- 1 Извлеките реактивы EPX1, EPX2, EPX3 и RSB из хранилища с температурой от -25 до -15 °C.
- 2 Размораживайте при комнатной температуре в течение 10 минут.
- 3 Поместите на лед.

Подготовка свежего раствора гидроксида натрия (NaOH)

- 1 Слейте в пробирку для микроцентрифуги следующие объемы веществ:
 - ▶ вода лабораторного класса (900 мкл);
 - ▶ основной раствор 1 н. NaOH (100 мкл).
 Получится 1 мл 0,1 н. раствора NaOH.
- 2 Переверните для перемешивания содержимого.

Денатурирование библиотек и добавление контрольного образца PhiX (дополнительно)

Загружаемая концентрация библиотеки зависит от библиотек, секвенирование которых будет проводиться. К поддерживаемым библиотекам Illumina применяются следующие инструкции, которые предполагают, что размер вставки является типичным для связанного типа библиотеки. Библиотеку необходимо разводить до концентрации, соответствующей типу библиотеки.

- ▶ Если загружаемая концентрация ДНК слишком высокая, это ведет к снижению числа кластеров, прошедших через фильтр (%PF).
 - ▶ Если загружаемая концентрация ДНК слишком низкая, это ведет к снижению числа кластеров, прошедших через фильтр (%PF), и высокому проценту копий, что негативно влияет на глубину покрытия.
- 1 Разводите библиотеку или объединенные библиотеки до соответствующей концентрации.

Тип библиотеки	Разбавление
TruSeq DNA PCR-Free	Разбавьте до 1–2 нмоль/л реактивом RSB.
Nextera DNA Flex	Разбавьте до 2-3 нмоль/л реактивом RSB.
TruSeq Nano DNA	Разбавьте до 2-3 нмоль/л реактивом RSB.
Nextera Rapid Capture Exome	
TruSeq Stranded Total RNA	
TruSeq Stranded mRNA	

- 2 **[Дополнительно]** Подмешайте 1 % *неденатурированного* контрольного материала Illumina PhiX к *не прошедшим денатурацию* библиотекам.

Тип библиотеки	Добавка
TruSeq DNA PCR-Free	Добавьте 5 мкл PhiX в концентрации 100–200 пмоль/л к 45 мкл библиотеки в концентрации 1–2 нмоль/л.
Nextera DNA Flex	Разбавьте до 2-3 нмоль/л реактивом RSB.
TruSeq Nano DNA	Добавьте 5 мкл PhiX в концентрации 200–300 пмоль/л к 45 мкл библиотеки в концентрации 2–3 нмоль/л.
Nextera Rapid Capture Exome	
TruSeq Stranded Total RNA	
TruSeq Stranded mRNA	

- 3 Пронумеруйте пробирки в стрипе на восемь пробирок.
- ▶ Для кластеризации с отслеживанием образца: начиная с меченого конца, пронумеруйте пробирки с № 8 по № 1.



- ▶ Для кластеризации без отслеживания образца: пронумеруйте пробирки с № 1 по № 8.
- 4 Разведите библиотеки в стрипе на 8 пробирок следующим образом.
- a Добавьте 5 мкл *неденатурированной* библиотеки на дно каждой лунки.
 - b Добавьте 5 мкл свежеприготовленного раствора 0,1 н. NaOH. Медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое.
 - c Инкубируйте при комнатной температуре в течение 8 минут.
 - d Добавьте 5 мкл трис-солянокислого буфера (200 ммоль, pH 8,0) и медленно пипетируйте до перемешивания.
- 5 Поместите на лед примерно на 30 минут, пока не будете готовы добавлять мастер-микс ExAmp.

Подготовка планшета с реактивами cBot

- 1 Переверните для перемешивания содержимого.
- 2 Обработайте на вихревой мешалке, чтобы удалить оставшиеся пузырьки воздуха.
- 3 Постучите по твердой поверхности, чтобы собрать капли реактива. Вместо этого можно использовать импульсную центрифугу.
- 4 Поместите на лед.

Подготовка реакции ExAmp

Подготовьте мастер-микс для реакции ExAmp непосредственно перед использованием.

- 1 Переверните реактивы EPX1 и EPX2 для перемешивания содержимого.
- 2 Кратковременно центрифугируйте реактивы EPX1, EPX2 и EPX3.
- 3 Приготовьте мастер-микс ExAmp в пробирке объемом 1,5 мл следующим образом.
 - a Добавьте 210 мкл реактива EPX1.
 - b Добавьте 30 мкл реактива EPX2. Медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое.
 - c Добавьте 110 мкл реактива EPX3. Медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое.

На дне пробирки не должно быть пузырьков.

- 4 Добавьте 35 мкл мастер-микса на дно каждой лунки стрипа на восемь пробирок.
 - ▶ Медленно пипетируйте, чтобы перемешать содержимое.
 - ▶ Меняйте наконечники для каждого образца.
- 5 Закройте пробирки колпачками и кратковременно центрифугируйте их.
- 6 Поместите на лед не более чем на 15 минут, то есть до момента готовности к загрузке в прибор cBot.

Высокопроизводительная проточная кювета HiSeq High Output

Чтобы подготовить реактивы, разморозьте и осмотрите планшет с реактивами. При использовании водяной бани комнатной температуры планшет с реактивами размораживается приблизительно за 60 минут. Вместо этого реактивы можно разморозить, оставив их на ночь при температуре от 2 до 8 °C, при этом продолжительность размораживания не должна превышать 16 часов.



ПРИМЕЧАНИЕ

При обработке на вихревой мешалке или переворачивании планшета с реактивами cBot прикрывайте верхнюю часть планшета рукой.

Разморозка планшета с реактивами cBot

- 1 Извлеките планшет с реактивами cBot из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.
- 2 Размораживайте на водяной бане комнатной температуры в течение 60 минут.

Подготовка планшета с реактивами cBot

- 1 Переверните для перемешивания содержимого.
- 2 Обработайте на вихревой мешалке, чтобы удалить оставшиеся пузырьки воздуха.
- 3 Постучите по твердой поверхности, чтобы собрать капли реактива. Вместо этого можно использовать импульсную центрифугу.
- 4 **[Для реактивов TruSeq v3]** Убедитесь в том, что в пробирках нет пузырьков воздуха, они прочно зафиксированы и расположены в порядке согласно нумерации.
- 5 Немедленно перейдите к настройке прибора cBot.
- 6 При секвенировании библиотек Nextera в проточной кювете TruSeq v перейдите к разделу «Подготовьте HP10 (TruSeq v3)» перед настройкой прибора cBot.

Подготовьте HP10 (TruSeq v3)

Подготовьте HP10 к использованию на cBot только при использовании библиотек Nextera в сочетании с проточной кюветой TruSeq v3. Реактив HP10 также совместим с другими типами библиотек Illumina.

- 1 Извлеките реактив HP10 из хранилища с температурой от -25 до -15 °C.
- 2 Размораживайте в лабораторном стакане, заполненном деионизированной водой комнатной температуры, в течение 20 минут.

- 3 Добавьте 150 мкл реактива HP10 в каждую пробирку стрипа на восемь пробирок.
- 4 Поместите на лед.
- 5 Немедленно перейдите к настройке прибора cBot.

Проточная кювета HiSeq Rapid

Чтобы подготовить реактивы, разморозьте и осмотрите планшет с реактивами. При использовании водяной бани комнатной температуры планшет с реактивами размораживается приблизительно за 30 минут. Вместо этого реактивы можно разморозить, оставив их на ночь при температуре от 2 до 8 °C, при этом продолжительность размораживания не должна превышать 16 часов.



ПРИМЕЧАНИЕ

При обработке на вихревой мешалке или переворачивании планшета с реактивами cBot прикрывайте верхнюю часть планшета рукой.

Разморозка планшета с реактивами cBot

- 1 Извлеките планшет с реактивами cBot из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.
- 2 Размораживайте на водяной бане комнатной температуры в течение 60 минут.

Подготовка планшета с реактивами cBot

- 1 Переверните для перемешивания содержимого.
- 2 Обработайте на вихревой мешалке, чтобы удалить оставшиеся пузырьки воздуха.
- 3 Постучите по твердой поверхности, чтобы собрать капли реактива. Вместо этого можно использовать импульсную центрифугу.
- 4 Немедленно перейдите к настройке прибора cBot.

Глава 4. Кластеризация с отслеживанием образца

Введение	23
Рабочий процесс кластеризации с отслеживанием образца	24
Выполнение предварительной промывки	24
Загрузка расходных материалов	25
Загрузка коллектора	27
Выбор протокола	29
Сканирование расходных материалов	29
Выполнение проверки перед запуском	30
Мониторинг запуска	30
Выгрузка компонентов запуска	32
Выполнение промывки после запуска	33
Подтверждение подачи реактивов (дополнительно)	33

Введение

Кластеризация с отслеживанием образца возможна для всех проточных кювет HiSeq. Все этапы кластеризации выполняются на приборе cBot, за исключением подготовки библиотек к секвенированию и подготовки реактивов. Этапы кластеризации для проточной кюветы быстрого запуска HiSeq Rapid v2 состоят только из этапов гибридизации матрицы и первого удлинения. Остальные этапы выполняются на приборе HiSeq.

Настройка устройства cBot в режиме генерирования кластеров с отслеживанием образцов включает такие этапы, как загрузка компонентов запуска, выбор протокола и сканирование расходных материалов. Внутренние сканеры записывают необходимые данные ввода, такие как идентификационные номера реактивов и проточных кювет, после выполнения загрузки расходных материалов и закрытия крышки прибора. Данные ручного ввода и данные, вводимые системой, при необходимости отображаются на экране.

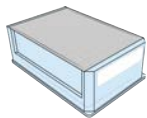
О настройке прибора cBot для отслеживания образцов говорится в «*Руководстве по настройке систем cBot*» (документ № 1000000005301).

Подготовка библиотеки

Перед тем как приступить к настройке прибора cBot для проведения генерации кластеров, подготовьте библиотеки для секвенирования. Этот процесс зависит от типа библиотеки и проточной кюветы.

- ▶ Большинство библиотек для проточных кювет TruSeq и HiSeq требуют денатурирования и разбавления. Для получения более подробной информации см. «*Руководство по денатурированию и разбавлению библиотек для систем HiSeq*» (документ № 15050107).
- ▶ Протокол денатурирования отличается для структурированных проточных кювет HiSeq X и HiSeq 3000/4000. Денатурируйте библиотеки, предназначенные для использования с этими типами проточных кювет **только** согласно описанию в инструкции по подготовке реактивов для конкретного типа проточной кюветы. Дополнительную информацию см. в разделе «*Подготовка реактивов*» на стр. 12.

Рабочий процесс кластеризации с отслеживанием образца



Подготовьте планшет с реактивами и проточную кювету. См. раздел «Подготовка реактивов» на стр. 12.



Подготовьте библиотеки для секвенирования и загрузите их в стрип на восемь пробирок со штрихкодом на этикетке.



Выполните предварительную промывку.



Загрузите расходные материалы и коллектор cBot и закройте крышку прибора.



Выберите протокол и отсканируйте расходные материалы.



Выберите **Pre-Run Check** (Проверка перед запуском) и запустите автоматическую предварительную проверку.



Нажмите **Start** (Пуск). Следите за выполнением запуска на экране Run Status (Состояние запуска).



[Дополнительно] Выгрузите компоненты запуска и подтвердите подачу реактивов.



Выполните промывку после запуска.

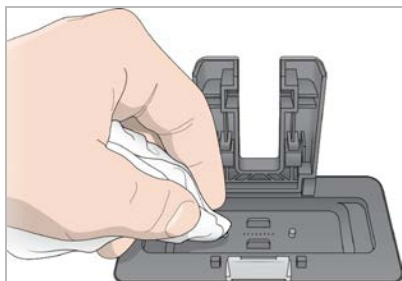
Выполнение предварительной промывки

Перед проведением кластеризации на приборе cBot рекомендуется выполнить промывку.

- 1 Выберите опцию **User Name** (Имя пользователя).
- 2 С помощью экранной клавиатуры введите свое имя и нажмите **Enter** (Ввод).
- 3 Нажмите **Start** (Пуск).
- 4 Если на экране Wash (Промывка) в поле **Manifold removed** (Коллектор снят) не стоит отметка, снимите коллектор.

- 5 Откройте крышку прибора, подняв ее за прорезь в передней части.
- 6 Залейте в промывочную емкость около 12 мл деионизированной воды.
- 7 Закройте крышку прибора.
- 8 Установите отметку в поле **Reservoir filled with water** (Емкость заполнена водой).
- 9 Выберите опцию **Wash** (Промывка).
- 10 По окончании промывки промокните излишек воды из промывочной емкости низковорсной тканью.

Рисунок 11. Осушите промывочную емкость



- 11 Установите отметку в поле **Wash reservoir dry** (Емкость отмыта досуха).
- 12 Нажмите **Next** (Далее).

Загрузка расходных материалов

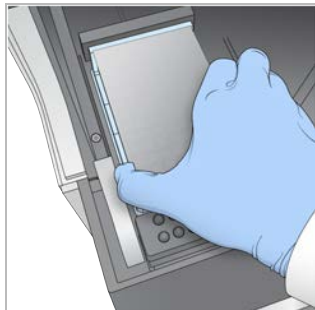
Чтобы загрузить планшет с реактивами cBot, проточную кювету и снабженный этикеткой со штрихкодом стрип на 8 пробирок с подготовленными библиотеками, воспользуйтесь следующими инструкциями на экране Load Consumables (Загрузка расходных материалов). В зависимости от выбранного протокола программное обеспечение выдает сообщение о том, что нужно загрузить стрип на 8 пробирок с дополнительными праймерами.

Загрузка планшета с реактивами

- 1 Снимите прозрачную пластиковую крышку с планшета с реактивами cBot.
- 2 Если в состав планшета входит стрип с 8 пробирками, осторожно нажмите на них сверху вниз, чтобы убедиться, что они надежно закреплены.
- 3 Поднимите крышку прибора.
- 4 **[Для реактивов TruSeq v3]** Снимите герметичную упаковку из белой фольги, как описано ниже.
 - a Придерживая за оба конца стрип с пробирками в ряду № 10, снимите белую фольгу со стрипа на 8 пробирок. Утилизируйте фольгу надлежащим образом.
 - b Отметьте соответствующее поле на экране, указав, что герметичная упаковка снята.
- 5 Потяните рычаг планшета с реактивами на себя и поместите планшет с реактивами на столик для реактивов.
 - ▶ **HiSeq High Output (TruSeq v3)** — расположите так, чтобы ряд 1 находился непосредственно позади держателей стрипов с пробирками. Удостоверьтесь в том, что скошенный угол планшета расположен в переднем правом углу.

- ▶ **Все планшеты с реактивами, кроме HiSeq High Output (TruSeq v3)** — расположите так, чтобы этикетка со штрихкодом была обращена к задней части прибора. Скошенные углы планшета располагаются сразу за держателями стрипов с пробирками.

Рисунок 12. Расположение планшета с реактивами



- 6 Отпустите рычаг, чтобы зафиксировать планшет с реактивами.

Загрузка проточной кюветы

- 1 Поднимите зажим проточной кюветы.
- 2 Промойте переходную пластину, установленную на нагревательном столике, небольшим количеством деионизированной воды.
- 3 Вытрите насухо безворсовой салфеткой.
Следите, чтобы жидкости не попали внутрь прибора.
- 4 Извлеките проточную кювету из места хранения.
 - ▶ **Все кюветы, кроме HiSeq X и HiSeq 3000/4000:** с помощью пластиковых щипцов извлеките проточную кювету из емкости, в которой она хранится. Промойте деионизированной водой, затем плавными движениями вытрите насухо ткань для протирки оптики. Емкость для хранения кюветы и буферный раствор сохраните на будущее.
 - ▶ **Проточные кюветы HiSeq X и HiSeq 3000/4000:** структурированную проточную кювету можно использовать после подготовки проточной кюветы.
- 5 Расположите проточную кювету на нагревательном столике таким образом, чтобы отверстия на ней были направлены **кверху**.
Дорожка № 1 находится справа, со стороны угла с меткой.

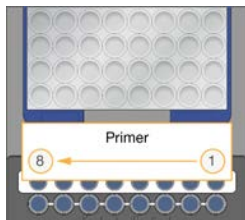
Загрузка матриц

- 1 Загрузите стрип на 8 пробирок с подготовленными библиотеками в ряд с матрицами на держателе стрипов с пробирками.
Убедитесь, что он прочно зафиксирован.
- 2 Выполните следующее.
 - ▶ Если вы используете дополнительные праймеры, переходите к разделу **«Загрузка праймеров»**.
 - ▶ Если дополнительные праймеры не используются, установите отметку в поле **Consumables Loaded** (Расходные материалы загружены) и перейдите к разделу **«Загрузка коллектора»** на стр. 27.

Загрузка праймеров

Экран Load Primers (Загрузка праймеров) отображается для рабочих процессов, позволяющих применять пользовательские праймеры или требующих дополнительных праймеров. Для секвенирования библиотек Nextera в проточной кювете TruSeq v3 требуется загрузка стрипа на восемь пробирок, содержащих реактив HP10.

- 1 Загрузите стрип на восемь пробирок в ряд праймеров на держателе стрипов с пробирками. Пробирки пронумерованы справа налево, что соответствует ориентации дорожки проточной кюветы.



HiSeq X, HiSeq 3000/4000, HiSeq v4
и TruSeq v3 (HiSeq)

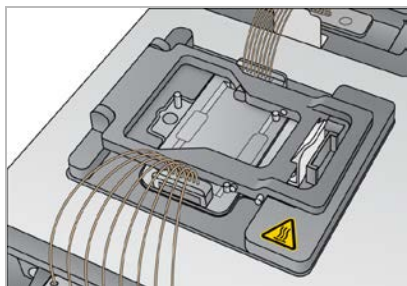
- 2 Отметьте окошко **Consumables Loaded** (Расходные материалы загружены).
- 3 Нажмите **Next** (Далее).

Загрузка коллектора

На экране Manifold (Коллектор) загрузите коллектор из того же кластерного комплекта, что и проточная кювета.

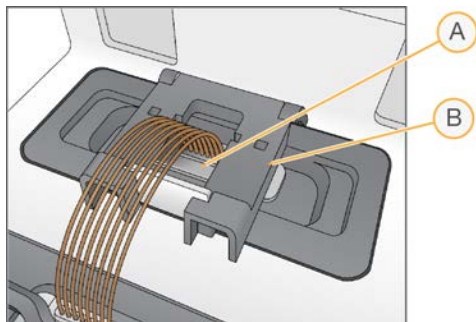
- 1 Осмотрите сипперы на гребенке на предмет повреждения. Убедитесь в том, что черные резиновые прокладки уложены ровно.
- 2 Расположите коллектор поверх проточной кюветы таким образом, чтобы гребенка с сипперами была направлена в сторону передней части прибора cBot.
- 3 Выровняйте коллектор по направляющим штырькам на нагревательном столике и опустите коллектор поверх проточной кюветы. Установите коллектор ровно, чтобы получилось герметичное уплотнение.
- 4 Установите отметку в поле **Manifold seated over flow cell** (Коллектор расположен над проточной кюветой).
- 5 Закройте зажим проточной кюветы, чтобы зафиксировать коллектор.

Рисунок 13. Закрытие зажима проточной кюветы



- Установите отметку в поле **Flow cell clamp closed** (Зажим проточной кюветы закрыт).
- Соедините выходной конец коллектора с выходным портом промывочной емкости. Убедитесь, что выходное соединение установлено ровно.

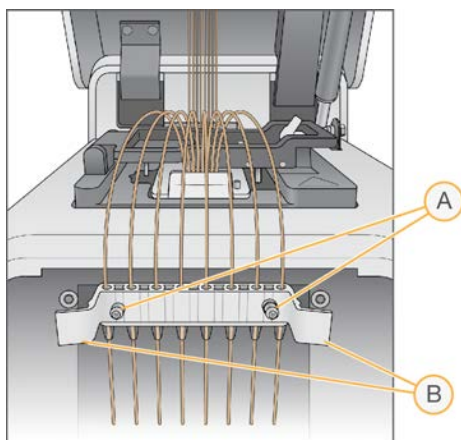
Рисунок 14. Закрепление выходного конца



- A Выходной порт
- B Зажим выходного отверстия

- Прижмите и плотно закройте зажим выходного отверстия, которым удерживается на месте выходной конец коллектора.
- Установите отметку в поле **Outlet clamp closed** (Зажим выходного отверстия закрыт).
- Выровняйте гребенку с сипперами с помощью двух металлических направляющих штырьков, расположенных в передней части нагревательного столика.

Рисунок 15. Закрепление гребенки с сипперами



- A Металлические направляющие штырьки
- B Пластиковые выступы

- Вставьте гребенку с сипперами на место с помощью пластиковых выступов-защелок, расположенных по обеим сторонам гребенки.
- Убедитесь, что сипперы расположены прямо и перпендикулярны планшету с реактивами, а также что в поле **Sipper comb in place** (Гребенка с сипперами установлена на месте) установлена отметка.
- Закройте крышку прибора и выберите **Next** (Далее).



ОСТОРОЖНО!

Открывайте крышку повторно только при появлении соответствующего сообщения программного обеспечения. Если открыть крышку, потребуется повторно провести сканирование и валидацию каждого расходного материала во время проверки перед запуском. Если во время проверки перед запуском валидация не будет пройдена, запуск будет отменен.

Выбор протокола

- 1 Выберите опцию **Experiment Name** (Название эксперимента).
- 2 С помощью экранной клавиатуры введите название эксперимента и нажмите **Enter** (Ввод).
- 3 Выберите из списка протоколов подходящий для данного эксперимента набор параметров. Используйте панель прокрутки, чтобы просмотреть все доступные протоколы.
- 4 Нажмите **Next** (Далее).

Сканирование расходных материалов

Внутренние сканеры штрихкодов считывают и записывают идентификационные номера расходных материалов. Программное обеспечение поэтапно проводит пользователя по каждому сканированию через серию экранов, начиная с экрана Reagents (Реактивы). В случае успешного сканирования на экране появится идентификационный номер расходного материала.

- 1 Выберите опцию **Scan** (Сканировать), затем **Next** (Далее) на каждой из следующих страниц экрана.
 - ▶ **Reagents** (Реактивы): записывает идентификационный номер набора реактивов.
 - ▶ **Flow Cell** (Проточная кювета): записывает идентификационный номер проточной кюветы.
 - ▶ **Tube Strips** (Стрипы с пробирками): записывает идентификатор шаблона библиотеки.
- 2 Если применяются пользовательские или дополнительные праймеры, запишите название праймера следующим образом.
 - a Выберите **Enter Primer Name** (Введите название праймера) на экране Primers (Праймеры).
 - b С помощью экранной клавиатуры введите название праймера и нажмите **Enter** (Ввод).
- 3 Выберите опцию **Pre Check** (Предварительная проверка).

Ошибки сканирования

В случае сбоя сканирования выполните следующие действия.

- 1 Откройте крышку инструмента и извлеките расходный материал, для которого показана ошибка.
- 2 Осторожно протрите штрихкод безворсовой тканью для очистки.
- 3 Загрузите расходный материал повторно и закройте крышку.
- 4 Выберите опцию **Scan** (Сканировать) для повторения сканирования.
- 5 Если сканирование не удастся еще дважды, приступайте к шагам 6–8. В противном случае перейдите к настройке запуска.
- 6 Откройте крышку прибора и извлеките расходный материал.

- 7 Выберите **Scan** (Сканировать), чтобы включить внешний сканер штрихкодов, затем отсканируйте штрихкод расходного материала. Либо можно выбрать значок на экране, ввести идентификационный номер и выбрать опцию **Enter** (Ввод).
Звуковой сигнал означает успешное сканирование, при этом на экране появится идентификационный номер.



ПРИМЕЧАНИЕ

Функция отслеживания положительного образца активируется только для расходных материалов, прошедших внутреннее сканирование. При использовании внешнего сканера штрихкодов или экранной клавиатуры для записи идентификационного номера расходного материала функция отслеживания образца отключается для этого расходного материала.

- 8 Загрузите расходный материал повторно и закройте крышку, чтобы перейти к настройке запуска.

Выполнение проверки перед запуском

Проверка перед запуском представляет собой считывание данных с датчиков прибора для проверки правильности установки всех компонентов, после чего проводится проверка потока с помощью пузырьковых датчиков на предмет наличия воздуха в пробирках. Если крышка была открыта после появления экрана Manifold (Коллектор), в ходе проверки перед запуском также повторно сканируются расходные материалы и подтверждается их соответствие идентификационным номерам расходных материалов при первом сканировании.

Проверка перед запуском занимает около трех минут.

- 1 После успешного завершения проверки перед запуском выберите опцию **Start** (Пуск).
Откроется экран Run Status (Состояние запуска), и начнется выполнение запуска.

Ошибки, связанные с компонентами запуска

Если в ходе проверки перед запуском происходит сбой из-за ошибок, связанных с компонентами запуска или с тем, что была открыта крышка прибора, выполните следующие действия.

- 1 Проверьте компоненты, по которым проверка показала ошибки, и убедитесь в том, что компоненты на месте и загружены правильно.
- 2 Выберите опцию **Rerun Check** (Повторить проверку) и повторите проверку.
- 3 Если по-прежнему не удастся пройти проверку, выберите **Cancel Run** (Отмена запуска), чтобы завершить запуск и настроить новый.

Ошибка проверки потока

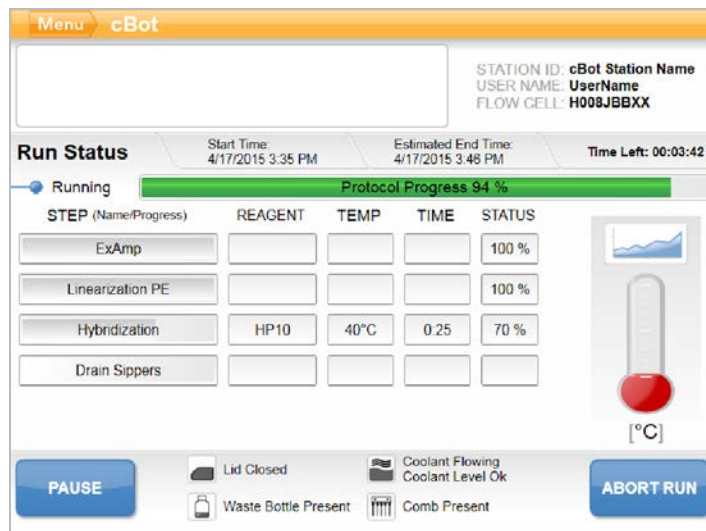
Ошибка проверки потока может быть результатом неправильной установки проточной кюветы, неисправности коллектора или следствием засорения линии. Прежде чем продолжать работу в обход этапа проверки потоков, прочтите раздел *«Поиск и устранение неисправностей в случае сбоя при проверке потока»* на стр. 53.

Мониторинг запуска

- 1 Для мониторинга текущего запуска используйте экран Run Status (Состояние запуска).
Экран Run Status (Состояние запуска) отображает информацию о состоянии запуска, а также следующие сведения:

- ▶ дату и время начала запуска, дату и время окончания запуска и оставшееся до конца запуска время;
- ▶ этапы протокола генерации кластеров с индикатором хода выполнения для каждого этапа;
- ▶ используемые в данный момент реактивы;
- ▶ текущую температуру (в °C);
- ▶ состояние команды на текущем этапе.

Рисунок 16. Экран состояния запуска



- 2 Дождитесь окончания запуска.
 - ▶ Кювета HiSeq v4, HiSeq 3000/4000 PE или HiSeq X: требуется приблизительно 3 часа.
 - ▶ Кювета HiSeq 3000/4000 SR: требуется приблизительно 4 часа.
 - ▶ Кювета HiSeq Rapid v2: требуется приблизительно 1 час.
 - ▶ Кювета TruSeq v3: требуется приблизительно 5 часов.
- 3 По завершении запуска проточную кювету можно оставить в приборе до начала следующего рабочего дня. Или перейдите к разделу *«Выгрузка компонентов запуска»*. В приборе cBot 2 температура проточной кюветы поддерживается при 20 °C.

Отчет о запуске

Отчет о запуске представляет собой краткие сведения о текущем запуске. В него включается следующая информация:

- ▶ название протокола;
- ▶ идентификационный номер проточной кюветы;
- ▶ идентификационный номер реактива;
- ▶ название матрицы;
- ▶ время начала и окончания запуска.

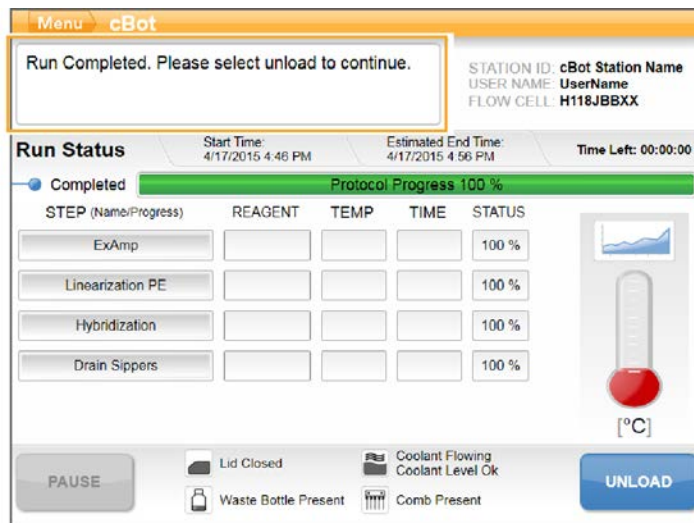
По окончании запуска автоматически открывается отчет о запуске, что означает окончание запуска.

- 1 Чтобы просмотреть отчет в ходе запуска, нажмите **Menu | Run Data** (Меню | Данные запуска).

Выгрузка компонентов запуска

- 1 По окончании запуска нажмите на кнопку **Unload (Выгрузить)** для продолжения работы.

Рисунок 17. Окончание запуска, выгрузка компонентов



- 2 Поднимите крышку прибора.
- 3 Отпустите зажим выходного отверстия, который удерживает на месте выходной конец коллектора.
- 4 Отсоедините выходной конец коллектора от выходного порта промывочной емкости.
- 5 Снимите гребенку сипперов с металлических штырьков-направляющих, воспользовавшись пластиковыми выступами на обеих сторонах гребенки.
- 6 Отпустите зажим проточной кюветы.
- 7 Снимите коллектор.
Убедитесь, что проточная кювета остается на нагревательном столике.
- 8 Снимите проточную кювету с нагревательного столика.
- 9 Храните проточные кюветы надлежащим образом.
 - ▶ **Проточные кюветы TruSeq v3 и HiSeq v4** — храните в буферном растворе в емкости для проточных кювет при температуре от 2 до 8 °С. После гибридизации праймеров кювета стабильна в течение 10 дней при условии правильного хранения в емкости для проточных кювет.
 - ▶ **Проточные кюветы HiSeq Rapid v2** — выполните секвенирование в день загрузки библиотеки.
 - ▶ **Проточные кюветы HiSeq X и HiSeq 3000/4000** — храните в буферном растворе в течение 48 часов при температуре от 2 до 8 °С.
- 10 Потяните рычаг планшета с реактивами на себя и освободите планшет с реактивами.
- 11 Снимите планшет с реактивами со столика для реактивов.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Этот комплект реактивов содержит потенциально опасные химические вещества. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Используйте соответствующие опасности средства индивидуальной защиты, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат. К использованным реактивам нужно относиться как к химическим отходам и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, национальными и местными законодательными и нормативными актами. Подробную информацию об окружающей среде, охране здоровья и технике безопасности см. в паспорте безопасности на веб-сайте support.illumina.com/sds.html.

- 12 Снимите стрип на восемь пробирок, в котором находятся библиотеки.
- 13 Если используются дополнительные праймеры, стрип на восемь пробирок для этих праймеров тоже следует снять.
- 14 Отметьте на экране, что вы выгрузили реактивы, матрицы и праймеры.
- 15 Выберите вариант промывки.
 - ▶ Нажмите **Wash** (Промывка) и запустите промывку после запуска.
 - ▶ Нажмите **Exit** (Выход) для отмены промывки после запуска, если эта опция предусмотрена.

Выполнение промывки после запуска

- 1 Промойте пластину нагревательного столика деионизированной водой, чтобы удалить все соли.
- 2 Вытрите насухо безворсовой тканью для очистки.
- 3 Залейте в промывочную емкость примерно 12 мл деионизированной воды и закройте крышку прибора.
- 4 Установите отметку в соответствующем поле, чтобы указать наличие воды, затем выберите **Wash** (Промывка).
- 5 По окончании промывки промокните остаток воды, чтобы удалить ее из промывочной емкости. Не касайтесь выходных отверстий, чтобы в них не попали волокна.
- 6 Установите отметку в поле, указав, что проточная кювета сухая, затем выберите **Exit** (Выход). Откроется главный экран, и прибор cBot 2 будет готов к другому запуску.

Подтверждение подачи реактивов (дополнительно)

Вы можете подтвердить подачу реактивов из планшета с реактивами HiSeq High Output (TruSeq v3).

- 1 Осмотрите запаянные фольгой верхушки каждого из стрипов с пробирками, чтобы убедиться в том, что каждая крышка проколота.
- 2 Извлеките каждый стрип с пробирками из основания планшета, как показано ниже.
 - a Крепко захватите планшет с реактивами, расположив кончики пальцев под основанием.
 - b Осторожно надавите снизу вверх на центральные пробирки стрипа с пробирками.

- Изучите каждую пробирку и убедитесь, что в каждой осталось одинаковое количество реактивов.
Наличие небольших различий является нормальным.

Рисунок 18. Пример успешной подачи реактивов (проточная кювета на восемь дорожек)

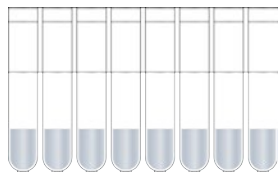
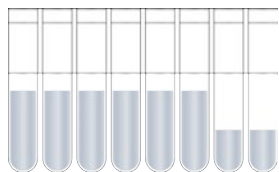


Рисунок 19. Пример успешной подачи реактивов (проточная кювета на две дорожки)



- Если реактивы не подаются и крышки из фольги на пробирках с реактивами не проколоты, обратитесь в службу технической поддержки компании Illumina.
- Осмотрите стрип на восемь пробирок, в котором находится матрица библиотеки.
- Если в ходе запуска используются дополнительные праймеры, осмотрите стрип на 8 пробирок, в котором находятся праймеры.

Глава 5. Кластеризация без отслеживания образца

Введение	35
Рабочий процесс кластеризации без отслеживания образца	35
Выполнение предварительной промывки	36
Выбор протокола	37
Загрузка расходных материалов	37
Выполнение проверки перед запуском	41
Мониторинг запуска	41
Выгрузка компонентов запуска	42
Выполнение промывки после запуска	44
Подтверждение подачи реактивов (дополнительно)	44

Введение

Все этапы генерации кластеров выполняются на приборе cBot, за исключением подготовки библиотек к секвенированию и подготовки планшета с реактивами cBot. Генерация кластеров для проточной кюветы быстрого запуска состоит только из этапов гибридизации матрицы и первого удлинения. Остальные этапы выполняются на секвенаторе.

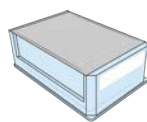
Настройка прибора cBot для генерации кластеров без отслеживания образца включает выбор протокола и последующую загрузку расходных материалов. Все расходные материалы сканируются внешним сканером штрихкодов, или сведения о них вводятся вручную.

Подготовка библиотеки

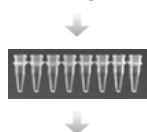
Перед тем как приступить к настройке прибора cBot для проведения генерации кластеров, подготовьте библиотеки для секвенирования. Этот процесс зависит от типа библиотеки и проточной кюветы.

- ▶ Большинство библиотек для проточных кювет TruSeq и HiSeq требуют денатурирования и разбавления. Для получения более подробной информации см. «Руководство по денатурированию и разбавлению библиотек для систем HiSeq» (документ № 15050107).
- ▶ Протокол денатурирования отличается для структурированных проточных кювет HiSeq X и HiSeq 3000/4000. Денатурируйте библиотеки, предназначенные для использования с этими типами проточных кювет **только** согласно описанию в инструкции по подготовке реактивов для конкретного типа проточной кюветы. Дополнительную информацию см. в разделе «Подготовка реактивов» на стр. 12.

Рабочий процесс кластеризации без отслеживания образца



Подготовьте планшет с реактивами и проточную кювету. См. раздел «Подготовка реактивов» на стр. 12.



Подготовьте библиотеки для секвенирования и загрузите их в стрип на восемь пробирок.



Выполните предварительную промывку.



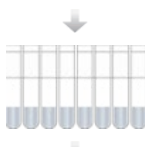
Выберите протокол, отсканируйте и загрузите расходные материалы, загрузите стрипы с пробирками, содержащие подготовленные библиотеки.



Выберите **Pre-Run Check** (Проверка перед запуском) и запустите автоматическую предварительную проверку.



Нажмите **Start** (Пуск). Следите за выполнением запуска на экране Run Status (Состояние запуска).



Выгрузите компоненты запуска и подтвердите подачу реактивов.



Выполните промывку после запуска.

Выполнение предварительной промывки

Перед проведением кластеризации на приборе cBot рекомендуется выполнить промывку.

- 1 Выберите опцию **User Name** (Имя пользователя).
- 2 С помощью экранной клавиатуры введите свое имя и нажмите **Enter** (Ввод).
- 3 Нажмите **Start** (Пуск).
- 4 Если на экране Wash (Промывка) в поле **Manifold removed** (Коллектор снят) не стоит отметка, снимите коллектор.
- 5 Откройте крышку прибора, подняв ее за прорезь в передней части.
- 6 Залейте в промывочную емкость около 12 мл деионизированной воды.
- 7 Закройте крышку прибора.
- 8 Установите отметку в поле **Reservoir filled with water** (Емкость заполнена водой).
- 9 Выберите опцию **Wash** (Промывка).
- 10 По окончании промывки промокните излишек воды из промывочной емкости низковорсной тканью.

Рисунок 20. Осушите промывочную емкость



- 11 Установите отметку в поле **Wash reservoir dry** (Емкость отмыта досуха).
- 12 Нажмите **Next** (Далее).

Выбор протокола

- 1 Выберите опцию **Experiment Name** (Название эксперимента).
- 2 С помощью экранной клавиатуры введите название эксперимента и нажмите **Enter** (Ввод).
- 3 Выберите из списка протоколов подходящий для данного эксперимента набор параметров. Используйте панель прокрутки, чтобы просмотреть все доступные протоколы.
- 4 Нажмите **Next** (Далее).

Загрузка расходных материалов

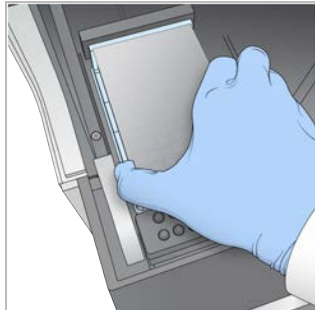
Программное обеспечение поможет вам в загрузке планшета с реактивами cBot, проточной кюветы, коллектора cBot и стрипа на восемь пробирок, в которых находятся подготовленные библиотеки. В зависимости от выбранного протокола кластеризации программное обеспечение выдает сообщение о том, что нужно загрузить стрип на 8 пробирок с дополнительными праймерами.

Загрузка планшета с реактивами

- 1 Снимите прозрачную пластиковую крышку с планшета с реактивами cBot.
- 2 Выберите опцию **Scan Reagent ID** (Сканировать идентификационный номер реактива), чтобы включить в работу внешний сканер штрихкодов.
- 3 Откройте крышку прибора, подняв ее за прорезь в передней части.
- 4 **[Для реактивов TruSeq v3]** Снимите герметичную упаковку из белой фольги, как описано ниже.
 - а Придерживая за оба конца стрип с пробирками в ряду № 10, снимите белую фольгу со стрипа на 8 пробирок. Утилизируйте фольгу надлежащим образом.
 - б Отметьте соответствующее поле на экране, указав, что герметичная упаковка снята.
- 5 Потяните рычаг планшета с реактивами на себя и поместите планшет с реактивами на столик для реактивов.
 - ▶ **HiSeq High Output (TruSeq v3)** — расположите так, чтобы ряд 1 находился непосредственно позади держателей стрипов с пробирками. Удостоверьтесь в том, что скошенный угол планшета расположен в переднем правом углу.

- ▶ **Все планшеты с реактивами, кроме HiSeq High Output (TruSeq v3)**— расположите так, чтобы этикетка со штрихкодом была обращена к задней части прибора. Скошенные углы планшета располагаются сразу за держателями стрипов с пробирками.

Рисунок 21. Установка планшета с реактивами



- 6 Отпустите рычаг, чтобы зафиксировать планшет с реактивами.
- 7 Установите отметку в поле на экране, указав, что планшет с реактивами загружен, затем выберите **Next** (Далее).

Загрузка проточной кюветы

- 1 Поднимите зажим проточной кюветы.
- 2 Промойте переходную пластину, установленную на нагревательном столике, небольшим количеством деионизированной воды.
- 3 Вытрите насухо безворсовой тканью для очистки.
- 4 Извлеките проточную кювету из места хранения.
 - ▶ **Все кюветы, кроме HiSeq X и HiSeq 3000/4000:** с помощью пластиковых щипцов извлеките проточную кювету из емкости, в которой она хранится. Промойте проточную кювету деионизированной водой и осторожно вытрите тканью для протирки оптики. Емкость для хранения кюветы и буферный раствор сохраните на будущее.
 - ▶ **Проточные кюветы HiSeq X и HiSeq 3000/4000:** структурированную проточную кювету можно использовать после подготовки проточной кюветы.
- 5 Выберите опцию **Scan Flow Cell ID** (Сканировать идентификационный номер проточной кюветы), чтобы включить в работу внешний сканер штрихкодов.
- 6 Просканируйте идентификационный номер проточной кюветы, для чего поднесите снабженные этикеткой упаковку кюветы или емкость, в которой она хранилась, к лотку сканера таким образом, чтобы штрихкод был направлен в сторону прибора.
- 7 Расположите проточную кювету на нагревательном столике таким образом, чтобы отверстия на ней были направлены **кверху**.
Дорожка № 1 находится справа, со стороны угла с меткой.
- 8 Установите отметку в поле, указав, что проточная кювета загружена, затем выберите **Next** (Далее).

Загрузка коллектора

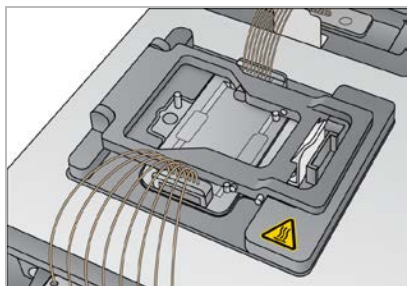
Коллектор и проточная кювета должны быть из одного и того же набора для генерации кластеров.

- 1 Осмотрите сипперы на гребенке на предмет повреждения.

Убедитесь в том, что черные каучуковые прокладки уложены ровно.

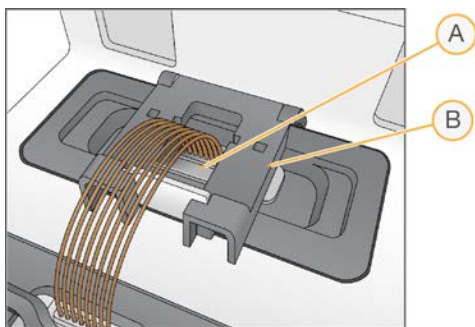
- 2 Расположите коллектор поверх проточной кюветы таким образом, чтобы гребенка с сипперами была направлена в сторону передней части прибора cBot.
- 3 Выровняйте коллектор по направляющим штырькам на нагревательном столике и опустите коллектор поверх проточной кюветы.
Установите коллектор ровно, чтобы получилось герметичное уплотнение.
- 4 Установите отметку в поле **Manifold seated over flow cell** (Коллектор расположен над проточной кюветой).
- 5 Закройте зажим проточной кюветы, чтобы зафиксировать коллектор.

Рисунок 22. Закрытие зажима проточной кюветы



- 6 Установите отметку в поле **Flow cell clamp closed** (Зажим проточной кюветы закрыт).
- 7 Соедините выходной конец коллектора с выходным портом промывочной емкости.
Убедитесь, что выходное соединение установлено ровно.

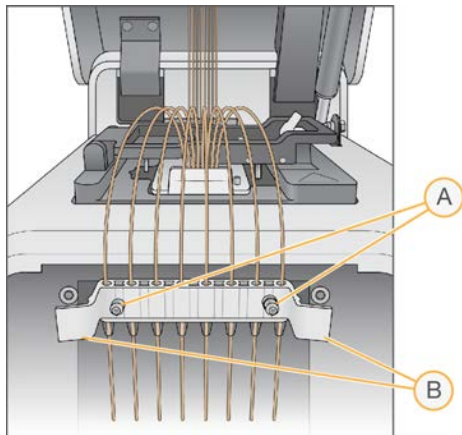
Рисунок 23. Закрепление выходного конца



- A Выходной порт
- B Зажим выходного отверстия

- 8 Прижмите и плотно закройте зажим выходного отверстия, которым удерживается на месте выходной конец коллектора.
- 9 Установите отметку в поле **Outlet clamp closed** (Зажим выходного отверстия закрыт).
- 10 Выровняйте гребенку с сипперами с помощью двух металлических направляющих штырьков, расположенных в передней части нагревательного столика.

Рисунок 24. Закрепление гребенки с сипперами



- A Металлические направляющие штырьки
- B Пластиковые выступы

- 11 Вставьте гребенку с сипперами на место с помощью пластиковых выступов-защелок, расположенных по обеим сторонам гребенки. Убедитесь в том, что сипперы расположены прямо и перпендикулярны планшету с реактивами.
- 12 Установите отметку в поле **Sipper comb in place** (Сипперная гребенка на месте) и нажмите **Next** (Далее).

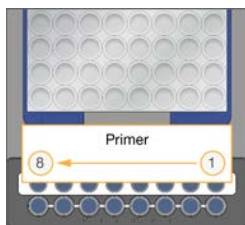
Загрузка матриц

- 1 Выберите опцию **Enter Template Name** (Введите название матрицы).
- 2 С помощью экранной клавиатуры введите идентификационный номер и нажмите **Enter** (Ввод).
- 3 Загрузите стрип на 8 пробирок с подготовленными библиотеками в ряд с матрицами.
- 4 Отметьте соответствующее поле, чтобы указать, что матрицы загружены.
- 5 Если вы используете дополнительные праймеры, переходите к разделу *«Загрузка праймеров»*. Если нет, закройте крышку прибора cBot и выберите **Next** (Далее), чтобы перейти к разделу *«Выполнение проверки перед запуском»* на стр. 41.

Загрузка праймеров

Экран Load Primers (Загрузка праймеров) отображается для рабочих процессов, позволяющих применять пользовательские праймеры или требующих дополнительных праймеров. Для секвенирования библиотек Nextera в проточной кювете TruSeq v3 требуется загрузка стрипа на восемь пробирок, содержащих реактив HP10.

- 1 Выберите опцию **Enter Template Name** (Введите названия матриц).
- 2 С помощью экранной клавиатуры введите название праймера и нажмите **Enter** (Ввод).
- 3 Загрузите стрип на восемь пробирок, содержащих праймеры, в ряд для праймеров. Убедитесь, что порядок пронумерованных пробирок соответствует ориентации дорожки на проточной кювете. Пробирки пронумерованы справа налево.



HiSeq X, HiSeq 3000/4000, HiSeq v4
и TruSeq v3 (HiSeq)

- 4 Отметьте соответствующее поле, указав, что праймеры загружены.
- 5 Закройте крышку прибора.
- 6 Нажмите **Next** (Далее).

Выполнение проверки перед запуском

Проверка перед запуском представляет собой считывание данных с датчиков прибора для проверки правильности установки всех компонентов, после чего проводится проверка потока с помощью пузырьковых датчиков на предмет наличия воздуха в пробирках. Проверка перед запуском занимает около трех минут.

- 1 После успешного завершения проверки перед запуском выберите опцию **Start** (Пуск). Откроется экран Run Status (Состояние запуска), и начнется выполнение запуска.

Ошибки, связанные с компонентами запуска

Если в ходе проверки перед запуском происходит сбой из-за ошибок, связанных с компонентами запуска, выполните следующие действия.

- 1 Проверьте компоненты, по которым проверка показала ошибки, и убедитесь в том, что компоненты на месте и загружены правильно.
- 2 Выберите опцию **Rerun Check** (Повторить проверку) и повторите проверку датчика.
- 3 Если по-прежнему не удастся пройти проверку, выберите **Cancel Run** (Отмена запуска), чтобы завершить запуск и настроить новый.

Ошибка проверки потока

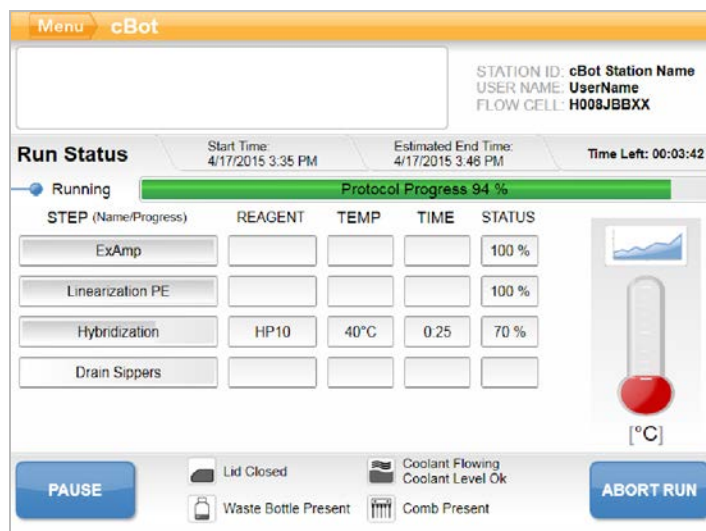
Ошибка проверки потока может быть результатом неправильной установки проточной кюветы, неисправности коллектора или следствием засорения линии. Прежде чем продолжать работу в обход этапа проверки потоков, прочтите раздел *«Поиск и устранение неисправностей в случае сбоя при проверке потока»* на стр. 53.

Мониторинг запуска

- 1 Для мониторинга текущего запуска используйте экран Run Status (Состояние запуска). Экран Run Status (Состояние запуска) отображает информацию о состоянии запуска, а также следующие сведения:
 - ▶ дату и время начала запуска, дату и время окончания запуска и оставшееся до конца запуска время;
 - ▶ этапы протокола генерации кластеров с индикатором хода выполнения для каждого этапа;
 - ▶ используемые в данный момент реактивы;

- ▶ текущую температуру (в °C);
- ▶ состояние команды на текущем этапе.

Рисунок 25. Экран состояния запуска



- 2 Дождитесь окончания запуска.
 - ▶ Кювета HiSeq v4, HiSeq 3000/4000 PE или HiSeq X: требуется приблизительно 3 часа.
 - ▶ Кювета HiSeq 3000/4000 SR: требуется приблизительно 4 часа.
 - ▶ Кювета HiSeq Rapid v2: требуется приблизительно 1 час.
 - ▶ Кювета TruSeq v3: требуется приблизительно 5 часов.
- 3 По завершении запуска проточную кювету можно оставить в приборе до начала следующего рабочего дня. Или перейдите к разделу *«Выгрузка компонентов запуска»*. В приборе температура проточной кюветы поддерживается на уровне 20 °C.

Отчет о запуске

Отчет о запуске представляет собой краткие сведения о текущем запуске. В него включается следующая информация:

- ▶ название протокола;
- ▶ идентификационный номер проточной кюветы;
- ▶ идентификационный номер реактива;
- ▶ название матрицы;
- ▶ время начала и окончания запуска.

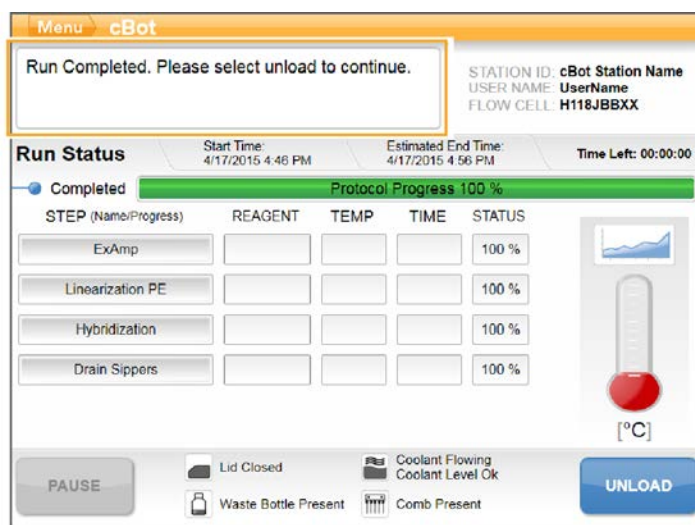
По окончании запуска автоматически открывается отчет о запуске, что означает окончание запуска.

- 1 Чтобы просмотреть отчет в ходе запуска, нажмите **Menu | Run Data** (Меню | Данные запуска).

Выгрузка компонентов запуска

- 1 По окончании запуска нажмите на кнопку **Unload (Выгрузить)** для продолжения работы.

Рисунок 26. Окончание запуска, выгрузка компонентов



- 2 Поднимите крышку прибора.
- 3 Отпустите зажим выходного отверстия, который удерживает на месте выходной конец коллектора.
- 4 Отсоедините выходной конец коллектора от выходного порта промывочной емкости.
- 5 Снимите гребенку сипперов с металлических штырьков-направляющих, воспользовавшись пластиковыми выступами на обеих сторонах гребенки.
- 6 Отпустите зажим проточной кюветы.
- 7 Снимите коллектор.
Убедитесь, что проточная кювета остается на нагревательном столике.
- 8 Снимите проточную кювету с нагревательного столика.
- 9 Храните проточные кюветы надлежащим образом.
 - ▶ **Проточные кюветы TruSeq v3 и HiSeq v4** — храните в буферном растворе в емкости для проточных кювет при температуре от 2 до 8 °С. После гибридизации праймеров кювета стабильна в течение 10 дней при условии правильного хранения в емкости для проточных кювет.
 - ▶ **Проточные кюветы HiSeq Rapid v2** — выполните секвенирование в день загрузки библиотеки.
 - ▶ **Проточные кюветы HiSeq X и HiSeq 3000/4000** — храните в буферном растворе в течение 48 часов при температуре от 2 до 8 °С.
- 10 Потяните рычаг планшета с реактивами на себя и освободите планшет с реактивами.
- 11 Снимите планшет с реактивами со столика для реактивов.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Этот комплект реактивов содержит потенциально опасные химические вещества. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Используйте соответствующие опасности средства индивидуальной защиты, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат. К использованным реактивам нужно относиться как к химическим отходам и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, национальными и местными законодательными и нормативными актами. Подробную информацию об окружающей среде, охране здоровья и технике безопасности см. в паспорте безопасности на веб-сайте support.illumina.com/sds.html.

- 12 Снимите стрип на восемь пробирок, в котором находятся библиотеки.
- 13 Если используются дополнительные праймеры, стрип на восемь пробирок для этих праймеров тоже следует снять.
- 14 Отметьте на экране, что вы выгрузили реактивы, матрицы и праймеры.
- 15 Выберите вариант промывки.
 - ▶ Нажмите **Wash** (Промывка) и запустите промывку после запуска.
 - ▶ Нажмите **Exit** (Выход) для отмены промывки после запуска, если эта опция предусмотрена.

Выполнение промывки после запуска

- 1 Промойте пластину нагревательного столика деионизированной водой, чтобы удалить все соли.
- 2 Вытрите насухо безворсовой тканью для очистки.
- 3 Залейте в промывочную емкость примерно 12 мл деионизированной воды и закройте крышку прибора.
- 4 Установите отметку в соответствующем поле, чтобы указать наличие воды, затем выберите **Wash** (Промывка).
- 5 По окончании промывки промокните остаток воды, чтобы удалить ее из промывочной емкости. Не касайтесь выходных отверстий, чтобы в них не попали волокна.
- 6 Установите отметку в поле, указав, что проточная кювета сухая, затем выберите **Exit** (Выход). Откроется главный экран, и прибор cBot 2 будет готов к другому запуску.

Подтверждение подачи реактивов (дополнительно)

Вы можете подтвердить подачу реактивов из планшета с реактивами HiSeq High Output (TruSeq v3).

- 1 Осмотрите запаянные фольгой верхушки каждого из стрипов с пробирками, чтобы убедиться в том, что каждая крышка проколота.
- 2 Извлеките каждый стрип с пробирками из основания планшета, как показано ниже.
 - a Крепко захватите планшет с реактивами, расположив кончики пальцев под основанием.
 - b Осторожно надавите снизу вверх на центральные пробирки стрипа с пробирками.

- Изучите каждую пробирку и убедитесь, что в каждой осталось одинаковое количество реактивов.
Наличие небольших различий является нормальным.

Рисунок 27. Пример успешной подачи реактивов (проточная кювета на восемь дорожек)

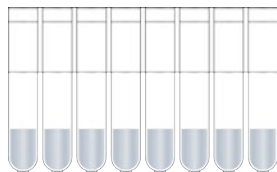
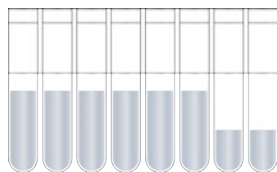


Рисунок 28. Пример успешной подачи реактивов (проточная кювета на две дорожки)



- Если реактивы не подаются и крышки из фольги на пробирках с реактивами не проколоты, обратитесь в службу технической поддержки компании Illumina.
- Осмотрите стрип на восемь пробирок, в котором находится матрица библиотеки.
- Если в ходе запуска используются дополнительные праймеры, осмотрите стрип на 8 пробирок, в котором находятся праймеры.

Глава 6. Техническое обслуживание

Выполнение периодического технического обслуживания	46
Выполнение ежемесячной профилактической промывки	47
Замена переходной пластины	48
Обновление программного обеспечения	49
Обновление набора параметров	50
Выключение прибора сBot 2	51

Выполнение периодического технического обслуживания

Выполните описанные в данном разделе базовые мероприятия по техническому обслуживанию, чтобы убедиться в оптимальном функционировании прибора.

Техническое обслуживание	Частота	Описание
Промывка прибора	В промежутках между запусками и когда прибор простаивал более суток.	Всегда выполняйте промывку прибора после каждого запуска для удаления солей и ферментов с оснастки прибора и для предотвращения засорения. Если прибор простаивал более 24 часов, перед началом запуска рекомендуется выполнить промывку. Дополнительную информацию см. в разделе « <i>Выполнение предварительной промывки</i> » на стр. 36.
Слив отходов из бутылки	Между запусками.	Чтобы обеспечить бесперебойное выполнение запуска, опорожняйте бутылку с отходами в перерыве между запусками.
Очистка поверхностей	Один раз в неделю.	Пользуйтесь деионизированной водой и безворсовой тканью для очистки поверхности нагревательного столика и столика для реактивов. Очищайте поверхность держателей матриц и стрипов с пробирками для праймеров.
Очистите окно считывателя штрихкодов (как внешнего, так и в проточной кювете)	Один раз в неделю.	Для очистки окон считывателей штрихкодов (внешнего и в проточной кювете) используйте деионизированную воду и безворсовую ткань.
Профилактическая промывка	Один раз в месяц.	Пользуйтесь 5%-ным раствором DECON (или раствором NaOH в концентрации 100 ммоль/л) для удаления следов реактивов из внутренних компонентов прибора сBot и предотвращения размножения микроорганизмов. Дополнительную информацию см. в разделе « <i>Выполнение ежемесячной профилактической промывки</i> » на стр. 47.
Проверка уровня охлаждающего агента	Один раз в три месяца.	Убедитесь, что охлаждающий агент зеленого цвета виден через окошко в задней панели прибора. При необходимости воспользуйтесь зеркалом для проверки окошка охлаждающего агента. Если уровень охлаждающего агента низкий, нужно с помощью широкой монеты или плоской отвертки снять крышку резервуара охлаждающего агента и долить охлаждающий агент до уровня крышки. Разрешается использовать только охлаждающий агент, поставляемый компанией Illumina (номер по каталогу 1003709). Если нужно получить дополнительный охлаждающий агент, свяжитесь со службой поддержки заказчиков или с инженером по обслуживанию компании Illumina.

Профилактическое техническое обслуживание

Компания Illumina рекомендует запланировать ежегодное проведение профилактического технического обслуживания. Если у вас нет контракта на обслуживание, свяжитесь с территориальным специалистом по работе с клиентами или со службой технической поддержки компании Illumina и организуйте платный сеанс профилактического технического обслуживания.

Выполнение ежемесячной профилактической промывки

Выполняйте ежемесячную профилактическую промывку с применением 5%-го раствора препарата DECON для удаления следов реактивов с внутренних компонентов прибора cBot и предотвращения размножения микроорганизмов. Если раствор DECON отсутствует, замените его раствором NaOH в концентрации 100 ммоль/л.

Профилактическая промывка занимает около 10 минут и состоит из 4 этапов: промывки водой, промывки препаратом DECON или раствором NaOH и 2 промывок водой.

Водная промывка

- 1 Убедитесь, что все компоненты запуска удалены из прибора.
- 2 На экране запуска откройте опцию **Menu** (Меню), затем **Manual Commands** (Ввод команд вручную) для перехода на страницу ввода команд вручную.
- 3 Выберите опцию **Commands** (Команды) и перейдите на вкладку Commands (Команды).
- 4 Залейте в промывочную емкость примерно 12 мл деионизированной воды.
- 5 Выберите опцию **Wash** (Промывка).
- 6 По завершении промывки промокните излишек воды из промывочной емкости низковорсной тканью.
Не касайтесь выходных отверстий, чтобы в них не попали волокна.

Промывка раствором DECON (или NaOH)

- 1 Залейте в промывочную емкость 10 мл 5%-ного раствора DECON или раствора NaOH с концентрацией 100 ммоль/л.
- 2 Выберите опцию **Wash** (Промывка).
- 3 После завершения промывки наденьте новую пару перчаток.
- 4 Промокните оставшийся в промывочной емкости 5%-й раствор DECON низковорсной тканью. Не касайтесь выходных отверстий.



ОСТОРОЖНО!

Раствор DECON является сильнощелочным.

- 5 **Немедленно** переходите к водной промывке во избежание высыхания раствора DECON и засорения отверстий промывочной емкости твердыми веществами.

Водная промывка (первая промывка)

- 1 Залейте в промывочную емкость примерно 12 мл деионизированной воды.
- 2 Выберите опцию **Wash** (Промывка).

- 3 По завершении промывки удалите остаток воды из промывочной емкости с помощью низковорсной ткани. Не касайтесь выходных отверстий.

Водная промывка (окончательная промывка)

- 1 Залейте в промывочную емкость примерно 12 мл деионизированной воды.
- 2 Выберите опцию **Wash** (Промывка).
- 3 По окончании промывки удалите остаток воды из промывочной емкости с помощью низковорсной ткани. Не касайтесь выходных отверстий.
- 4 Закройте крышку прибора.
- 5 Слейте отходы из бутылки.
Прибор cBot готов к следующему запуску генерации кластеров.

Замена переходной пластины

Вы можете использовать проточную кювету HiSeq на установке cBot. Для каждого типа проточной кюветы требуется установка специальной переходной пластины. Значки на главном экране указывают на то, какая переходная пластина установлена.

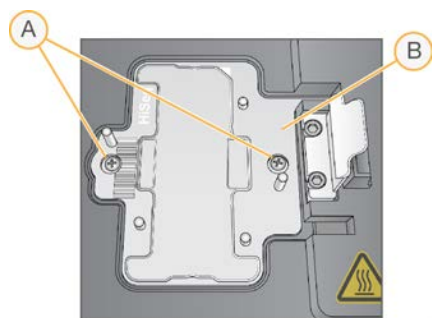


ПРИМЕЧАНИЕ

Прибор cBot поставляется с установленной в него переходной пластиной HiSeq.

- 1 Откройте крышку прибора, осторожно подняв ее за прорезь в передней части.
- 2 Поднимите зажим проточной кюветы.
- 3 Открутите два невыпадающих винта с крестообразными шлицами, крепящие переходную пластину.

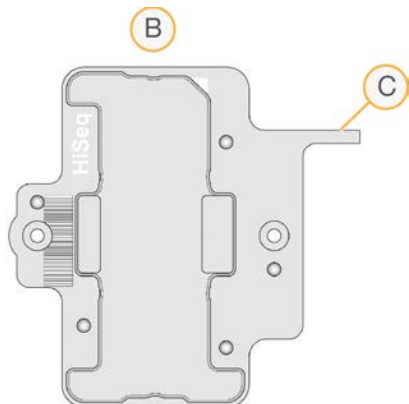
Рисунок 29. Переходная пластина проточной кюветы



- A Невыпадающие винты
- B Переходная пластина

- 4 Снимите имеющуюся переходную пластину с нагревательного столика и отложите ее в сторону.
- 5 Если на столике присутствует солевой налет, протрите его безворсовой тканью, слегка смоченной в воде.
- 6 Положите новую переходную пластину на нагревательный столик. Совместите кронштейн датчика с соответствующей прорезью справа на нагревательном столике.

Рисунок 30. Местоположение кронштейна датчика



- A Переходная пластина HiSeq
- B Кронштейн датчика переходной пластины

- 7 Затяните два винта, фиксирующих переходную пластину.
Для оптимальной теплопередачи нужно проследить за тем, чтобы переходная пластина была наложена ровно и чтобы винты были затянуты равномерно.
- 8 Протрите установленную переходную пластину безворсовой тканью, смоченной в воде. Вытрите насухо чистой тканью.

Обновление программного обеспечения

Пользуясь программным обеспечением cBot версии 1.3 или более поздней, можно обновлять программное обеспечение прибора с помощью USB-накопителя.

- 1 Вставьте USB-накопитель с файлом для установки нового программного обеспечения (например, cBotSetupX86_1.3.1.0.exe) в любой из USB-портов в передней части прибора. Файл установки должен находиться в корневом каталоге USB-накопителя, а не в папке.

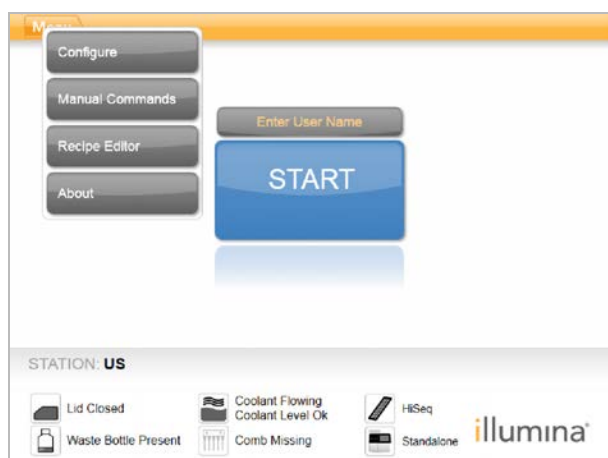


ОСТОРОЖНО!

Во время обновления USB-накопитель должен оставаться в USB-разъеме. Не следует выполнять какие бы то ни было действия на приборе во время обновления программного обеспечения.

- 2 Нажмите **Menu** (Меню) в верхнем левом углу главного экрана, затем нажмите **Configure** (Настроить).

Рисунок 31. Меню главного экрана



- 3 С помощью экранной клавиатуры введите пароль по умолчанию (**admin**), затем нажмите **Enter** (Ввод).
- 4 Выберите опцию **Menu** (Меню), затем — **Upgrade** (Обновить).
- 5 Откроется диалоговое окно с сообщением о версии программного обеспечения.

Сообщение	Действие
Версия файла установки выше текущей версии, установленной на приборе cBot.	Нажмите OK , чтобы приступить к установке новой версии.
Прибор cBot не может обнаружить действующий файл установки программного обеспечения.	Можно либо вставить накопитель с действующим обновлением cBot и нажать OK , чтобы попытаться обновить программу еще раз, либо нажать Cancel (Отмена) для отмены обновления.
Версия файла установки такая же, как и текущая версия, установленная на приборе cBot, или ниже.	Нажмите Cancel (Отмена) для отмены обновления или OK , чтобы установить предыдущую версию.

- 6 После завершения процесса обновления и перезагрузки прибора извлеките накопитель из USB порта.
- 7 В случае возникновения ошибки BOOTMGR подключите клавиатуру и мышь к прибору cBot и нажмите комбинацию клавиш **Ctrl+Alt+Del**, чтобы перезагрузить прибор.

Обновление набора параметров

Версии рецептов можно обновлять отдельно от программного обеспечения с помощью USB-накопителя, на котором находится файл установки рецептов.

- 1 Вставьте USB-накопитель с файлом для установки новых наборов параметров в любой из USB-портов в передней части прибора.
Файл установки должен находиться в корневом каталоге USB-накопителя, а не в папке.
- 2 Нажмите **Menu** (Меню) в верхнем левом углу главного экрана, затем нажмите **Configure** (Настроить).

Рисунок 32. Меню главного экрана



- 3 С помощью экранной клавиатуры введите пароль по умолчанию (**admin**), затем нажмите **Enter** (Ввод).
- 4 Выберите опцию **Menu** (Меню), затем — **Upgrade Recipes** (Обновить рецептуры). После завершения обновления прибор cBot перезагрузится автоматически. Процесс перезагрузки занимает около 10 минут.



ОСТОРОЖНО!

Во время обновления USB-накопитель должен оставаться в USB-разъеме. Не следует выполнять какие бы то ни было действия на приборе во время обновления программного обеспечения.

- 5 Когда процесс перезагрузки завершится и откроется экран входа в систему, накопитель из USB-порта можно извлечь.

Выключение прибора cBot 2

Система cBot2 сконструирована таким образом, что с главной страницы ее можно перевести в холостой режим работы, то есть вам не придется выключать ее между запусками.

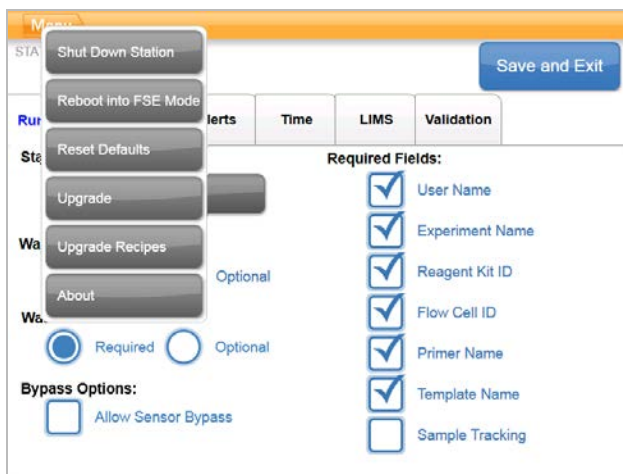
- 1 Нажмите **Menu** (Меню) в верхнем левом углу главного экрана, затем нажмите **Configure** (Настроить).

Рисунок 33. Меню главного экрана



- 2 С помощью экранной клавиатуры введите пароль по умолчанию (**admin**), затем нажмите **Enter** (Ввод).
- 3 На странице Configuration (Настройки) выберите опцию **Menu** (Меню), затем опцию **Shut Down Station** (Отключить станцию). Программное обеспечение cBot отключится.

Рисунок 34. Выключение станции



- 4 После завершения работы программного обеспечения переведите переключатель питания в положение «ВЫКЛ.».

Перезагрузка в режиме FSE

Опция перезагрузки в режиме FSE предназначена для применения обученными специалистами по прикладному применению приборов Illumina (FAS) или инженерами выездного обслуживания (FSE) для обновления программного обеспечения или обслуживания прибора.

Приложение А. Поиск и устранение неисправностей

Приостановка или отмена запуска	53
Поиск и устранение неисправностей в случае сбоя при проверке потока	53
Поиск и устранение проблем в ходе запуска	56
Перезагрузка сканера штрихкодов.	56
Редактирование протоколов	57

Приостановка или отмена запуска

Для приостановки или полной отмены выполнения запуска воспользуйтесь командами на экране Run Status (Статус запуска).

- ▶ **Pause** (Приостановить): завершает текущую команду протокола и приостанавливает выполнение запуска. До приостановки запуска проходит несколько минут. В случае приостановки запуска сипперы извлекаются из пробирок с реактивами, столик с реактивами возвращается в исходное положение, а на кнопке Pause (Приостановить) появляется надпись Resume (Возобновить).
 - ▶ Во время выполнения запуска для его приостановки следует воспользоваться кнопкой **Pause** (Приостановить).
 - ▶ Для возобновления приостановленного запуска следует воспользоваться кнопкой **Resume** (Возобновить).
- ▶ **Abort Run** (Отменить выполнение запуска): окончание запуска без возможности возобновления. Нажмите **Unload** (Выгрузить), чтобы выгрузить компоненты запуска из прибора.

Поиск и устранение неисправностей в случае сбоя при проверке потока

Если произошел сбой при проверке потока, выполните следующие действия для поиска и устранения неисправности. Не отключайте возможность проверки потока до тех пор, пока не выполните приведенную ниже инструкцию и не определите наличие следующих условий:

- ▶ проточная кювета должным образом размещена в приборе;
- ▶ коллектор и другое оборудование работают должным образом.



ОСТОРОЖНО!

Обход проверки потока может привести к неудачной кластеризации некоторых дорожек.

Так как для различных типов проточных кювет используются различные проверки потока, убедитесь в правильности комбинации используемых набора параметров, коллектора и проточной кюветы.

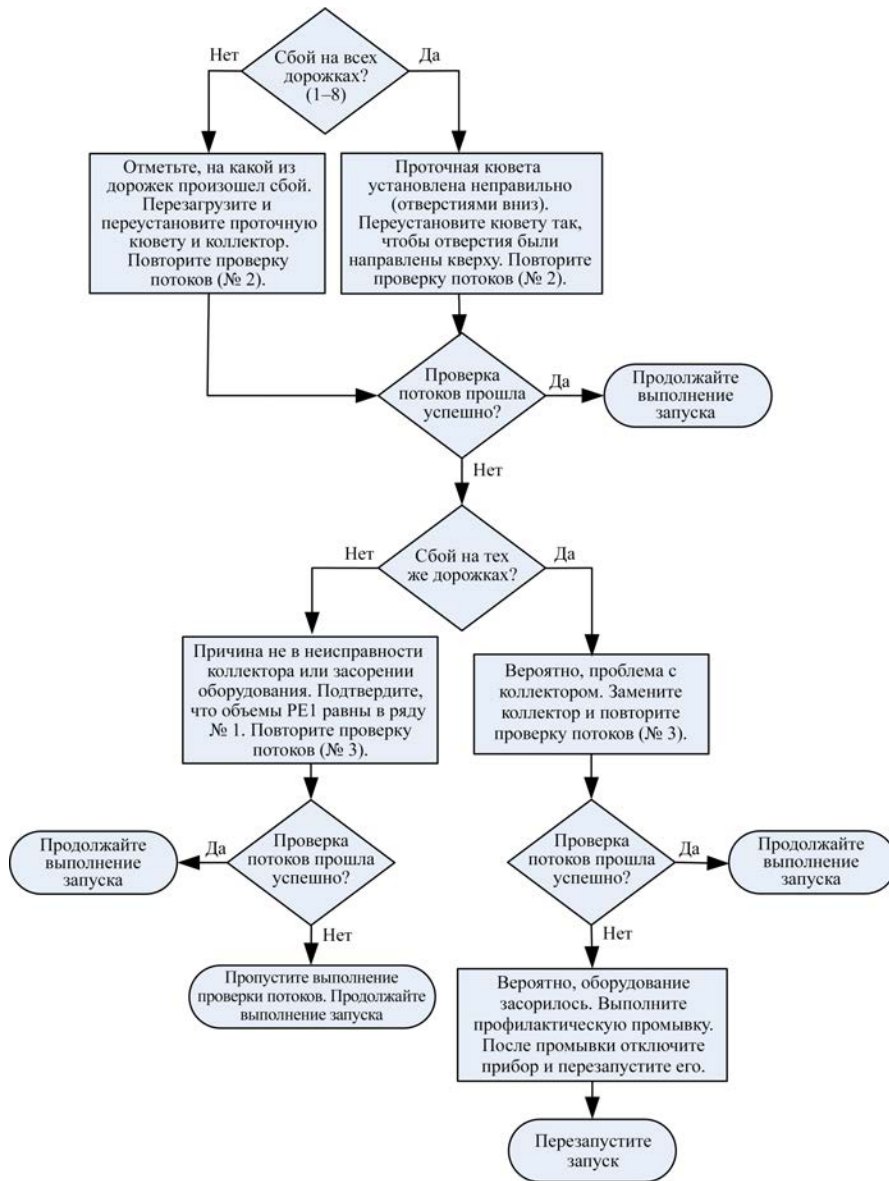
- 1 Убедитесь в том, что в ряду № 1 планшета с реактивами имеется достаточное количество НТ1, и долейте его при необходимости.
- 2 Отметьте, какие дорожки не прошли проверку потока. Сведения об этом отображаются в верхнем левом углу экрана интерфейса.
 - ▶ Если все восемь дорожек не прошли проверку, вероятно, проточная кювета установлена неправильно. Снимите коллектор и убедитесь в том, что отверстия в кювете направлены вверх и что кювета ориентирована правильно.

- ▶ Если потока нет только в некоторых дорожках, это может означать, что проточная кювета не закреплена. Снимите коллектор, заново закрепите проточную кювету и снова наденьте на нее коллектор.
- 3 Нажмите **Rerun Check** (Повторить проверку), чтобы повторить проверку потока.
 - 4 Если и во второй раз проверка потока будет неудачной, отметьте, какие дорожки не прошли проверку, и поступите одним из указанных ниже способов.
 - ▶ Если все восемь дорожек не прошли проверку, вероятно, коллектор неисправен. Замените его на новый коллектор.
 - ▶ Если сбой произошел в других дорожках, вероятно, коллектор исправен. Проверьте уровень реактива НТ1 в ряду № 1 планшета и удостоверьтесь в том, что пробирки содержат одинаковый объем реактива.
 - 5 Нажмите **Rerun Check** (Повторить проверку), чтобы в третий раз повторить проверку потока.
 - ▶ Если проверка проходит неудачно после замены коллектора, вернитесь к действию 6.
 - ▶ Если проверка проходит неудачно и вы не меняли коллектор, вернитесь к шагу 7.
 - 6 Если после замены коллектора проверка в третий раз прошла неудачно, это означает, что оборудование засорилось.
 - a Проверьте уровень реактива НТ1 в ряду № 1 планшета и удостоверьтесь в том, что пробирки содержат одинаковый объем реактива. Большой объем реактива в пробирках, соответствующих дорожкам, в которых проверка потока была неудачной, означает, что там имеется препятствие для потока.
 - b Выгрузите компоненты запуска и проведите профилактическую промывку.
 - c После промывки выключите прибор с помощью переключателя питания. Подождите несколько секунд, включите переключатель питания, затем нажмите кнопку пуска для перезапуска программного обеспечения. При выключении и включении питания сбрасывается счетчик, определяющий допустимое количество попыток выполнения проверки перед запуском.
 - d Следуйте программным подсказкам и заново загрузите компоненты запуска, а также повторите настройку запуска.
 - 7 Если проверка потока в третий раз пройдет со сбоями, вы можете воспользоваться опцией работы в обход проверки.
 - a Выберите **Bypass Flow Check** (Обход проверки потока) и продолжите выполнение запуска.
 - b Поле выполнения запуска проверьте подачу реактивов из всех пробирок.

Технологическая карта поиска и устранения неисправностей

На следующей технологической карте показана процедура поиска и устранения неисправностей. При повторной проверке потока отображается цифра, указывающая на то, сколько проверок потока было проведено на данном этапе процедуры.

Рисунок 35. Технологическая карта поиска и устранения неисправностей



Поиск и устранение проблем в ходе запуска

Воспользуйтесь приведенной ниже таблицей для поиска и устранения неисправностей, которые могут встретиться во время запуска генерирования кластеров.

Проблема	Возможная причина	Действие
Температура вне допустимого диапазона	Это часто означает, что прибор cBot не достиг заданной температуры в течение ожидаемого времени. Это также может означать сбой в работе платы управления.	Направьте электронное письмо в службу технической поддержки Illumina.
Охлаждающий агент циркулирует, уровень охлаждающего агента низкий.	Охлаждающий агент медленно испарился до низкого уровня.	Добавьте охлаждающий агент, поставляемый компанией Illumina (номер по каталогу 1003709), в резервуар охлаждающего агента.
Охлаждающий агент не циркулирует в системе, уровень охлаждающего агента низкий.	Уровень охлаждающего агента слишком низкий для того, чтобы создать поток.	Добавьте охлаждающий агент, поставляемый компанией Illumina (номер по каталогу 1003709), в резервуар охлаждающего агента.
Охлаждающий агент не циркулирует, уровень охлаждающего агента не низкий.	Возможно, неисправен насос охлаждающего агента.	Направьте электронное письмо в службу технической поддержки Illumina.
Прибор заблокирован	Вероятно, произошел сбой в программном обеспечении.	Направьте электронное письмо в службу технической поддержки Illumina.

Перезагрузка сканера штрихкодов.

Внешний сканер штрихкодов готов к использованию сразу по получении прибора cBot. Если конфигурация сканера настроена некорректно, приведенные ниже инструкции помогут восстановить конфигурацию по умолчанию.

- 1 Распечатайте штрихкод.

Рисунок 36. Штрихкод для восстановления настроек по умолчанию



- 2 На экране запуска выберите опцию **Menu** (Меню), затем **Manual Commands** (Команды, вводимые вручную).
- 3 Выберите вкладку **General** (Общие), чтобы войти в режим ручного управления считывателем штрихкодов.

Рисунок 37. Вкладка Manual Commands (Ручные команды), General (Общие)



- 4 Нажмите **Turn Off** (Выключить питание), затем **Turn On** (Включить питание) и активируйте сканер штрихкодов.
На планшете сканера под ЖК-экраном появится лазерная линия.
- 5 Поместите штрихкод под внешний сканер штрихкодов.
- 6 Нажмите **Turn Off** (Выключить питание), затем **Turn On** (Включить питание) и сканируйте штрихкод.
Звуковой сигнал означает успешное сканирование.

Редактирование протоколов

Воспользуйтесь редактором протоколов для создания нужного протокола. Можно повторять этапы протокола или изменять количество циклов амплификации в разделе химии.

Каждый протокол состоит из двух основных разделов.

- ▶ **Раздел химии:** содержит инструкции относительно закачки реактивов, изменения температуры и длительности выдержки. Этот раздел отображается в верхней части экрана Protocol Editor (Редактор протоколов).
- ▶ **Раздел протокола:** содержит последовательности этапов, состоящих из химических определений. Этот раздел отображается в нижней части экрана Protocol Editor (Редактор протоколов).

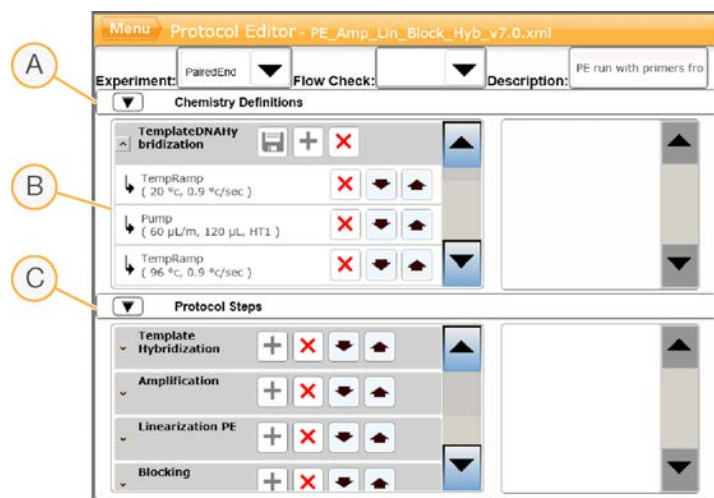
Редактируя существующий протокол, обязательно переименуйте его.

Редактор протоколов

- 1 На экране запуска выберите опцию **Menu** (Меню), затем **Protocol Editor** (Редактор протоколов).
- 2 В редакторе протоколов выберите **Menu** (Меню), затем выберите нужную команду.
 - ▶ **Open** (Открыть) — открывает существующий протокол.
 - ▶ Выберите **Load from Library** (Загрузить из библиотеки), чтобы загрузить существующее химическое определение или этап протокола из библиотеки cBot.
 - ▶ Выберите **New Chemistry Definition** (Новое химическое определение) или **New Protocol Step** (Новый этап протокола), чтобы создать определение или этап и сохранить их в библиотеке cBot.


- 3 Используйте направленную вниз стрелку слева от этапа, чтобы развернуть команды в составе этапа. Чтобы свернуть команды, используйте стрелку, направленную вверх.
- 4 Чтобы отредактировать этап в химическом определении, выделите этот этап. Выбранные элементы появляются на панели справа и позволяют изменить команды выбора насоса, скорости изменения температуры или времени ожидания.
- 5 Чтобы отредактировать этап протокола, выделите этот этап. Выбранные элементы появляются на панели справа и позволяют изменить количество циклов выбранного химического определения.
- 6 Используйте значки редактора протокола справа от названия этапа, чтобы перегруппировать, удалить, скопировать этапы и команды.

Рисунок 38. Редактор протоколов, развернутые этапы



- A Раздел химии
- B Раздел химии, развернутый
- C Раздел протокола

Значки редактора протоколов

Пиктограмма	Описание
	Перемещает выделенный этап ниже следующего этапа в протоколе.
	Перемещает выделенный этап выше предыдущего этапа в протоколе.
	Удаляет выделенный этап.
	Повторяет выделенный элемент.
	Сохраняет изменения в библиотеке протокола.

Алфавитный указатель

5

5% DECON 47

С

Clarity LIMS X Edition 1

D

DECON 47

Н

HiSeq 3000/4000 17
HP10, подготовка 21

I

Illumina SeqLab 1

N

NaOH 47

P

PhiX
%добавки 15, 19
добавление 15, 19

A

активирование внешнего сканера 30

Б

библиотеки
загрузка 26, 40
концентрация при загрузке 15, 19
разбавление 15, 19
Библиотеки
денатурирование 15, 19
Бутыль для отходов 46

В

Ввод команд вручную 47
Внешний сканер штрихкодов
сброс 56
внешний считыватель штрихкодов
очистка 46
возобновление запуска 53
выключение 51
выполнение запуска 30, 41

Г

герметичная упаковка из белой фольги 25,
37
герметичная упаковка, белая фольга 25, 37

Д

датчики 2
денатурирование 23, 35
денатурирование библиотек 15, 19
Длительность кластеризации 31, 42
длительность профилактической
промывки 47
документация 2, 63
документация на комплект 6

З

загрузка библиотек 26
заменитель DECON 47
запуск
начало 41
значки
статус датчика 4
значки статуса датчика 4

К

коллектор
сипперная гребенка 3, 28, 39
Коллектор
зажим выходного отверстия 28, 39
коллекторы 27, 38
компоненты 2
крышки не проколоты 34, 45

М

мастер-микс ExAmp 20
матрицы
 загрузка 40
методические рекомендации
 подготовка реактивов 12

Н

наборы параметров
 список 10
нагревательный столик
 промывка 33, 44
Нагревательный столик 3
настройка 4-5
Настройка отслеживания образца 23
настройка, справка 23
недопустимая температура 56
номер по каталогу для охлаждающего
 агента 56
номера по каталогу
 охлаждающий агент 56

О

о разделе 1
обзор
 блок-схема процесса отслеживания
 образца 24
Обзор
 рабочий процесс кластеризации 35
обслуживание 52
остановка запуска
 прекращение запуска 53
отказ от проведения проверки потока 53
отключение 51
отслеживание образца
 настройка 23
 совместимость проточных кювет 23
отслеживание образцов 1
отчет с данными запуска 31, 42
охлаждающий агент
 уровень 46
ошибки компонентов запуска 41
ошибки программного обеспечения
 сообщения об ошибках 56
ошибки сканирования 29
ошибки считывания штрихкода 29

П

переходные пластины 48
 промывка 26, 38
планшет для реактивов. 4
планшет с реактивами 25
 настройка 7
 подготовка 16, 20
 размораживание 14, 19, 21-22
Планшет с реактивами 37
планшет с реактивами cBot 7
планшет с реактивами, быстрый
 подготовка 22
планшет с реактивами, высокой
 производительности
 подготовка 21
повторная проверка датчиков 30
подаваемые объемы 34, 45
подача реактивов, неудачная 34, 45
подготовка реактивов
 методические рекомендации 12
поддержка клиентов 63
позиционирование проточных кювет 26, 38
поиск и устранение неисправностей
 сбой при проверке потока 53
помощь, техническая 63
поставляемые пользователем расходные
 материалы
 подготовка реактива 10
праймеры
 загрузка 40
 названия, ввод 40
 ориентация стрипа с пробирками 40
 пользовательские 40
проблемы с коллектором 56
проблемы с охлаждающим агентом 56
проверка перед запуском
 выполнение 41
 ошибки 41
проверка потока
 поиск и устранение неисправностей при
 сбое 53
проверка потоков 41
программное обеспечение
 обновление 49
 совместимость версий 9
промывка
 переходные пластины 26, 38
промывка перед запуском 46
промывка после запуска 46
промывка прибора 33, 44

- промывки 24, 36
- Промывки
 - частота 46
- промывной резервуар 24, 36
- протокол
 - выбор 29, 37
- протоколы применения химикатов 57
- протоколы, редактирование 57
- проточная кювета
 - очистка 13, 17
 - подготовка 13, 17
 - совместимость с отслеживанием образца 23
 - совместимые наборы параметров 10
 - упаковка 13, 17
- проточная кювета HiSeq X 12
- проточные кюветы
 - переходные пластины 48
 - подготовка к загрузке 26, 38
 - позиционирование 26, 38
 - хранение 31, 42
- профилактическое техническое обслуживание 47
- процедуры после запуска 32, 42

Р

- разбавление 23, 35
- размораживание планшета с реактивами 14, 19
- расположение 25, 37
- расходные материалы
 - выгрузка 32, 42
 - совместимость версий 9
- расходные материалы, поставляемые пользователем
 - подготовка реактива 10
- реактивы
 - подготовка 17
- Реактивы
 - подготовка 12
 - считывание штрихкодов 29
- реактивы ExAmp
 - информация 12, 17
 - подготовка 20
 - подготовка, 1 проточная кювета 16
 - подготовка, 4 проточные кюветы 16
- Реактивы ExAmp
 - размораживание 14, 19
- реактивы для кластеризации
 - подготовка 12

- реактивы, подготовка
 - быстрые 22
 - высокая производительность 21
- реакция ExAmp
 - подготовка, 1 проточная кювета 16
 - подготовка, 4 проточные кюветы 16
- редактор протоколов 57
- Редактор протоколов 57
 - значки 58
- Режим FSE 52
- рецептура
 - обновление 50
- ряд с матрицами 26

С

- сбой при проверке расхода 56
- Сбой при проверке расходов
 - поиск и устранение неисправностей 54
- сбой проверки перед запуском 30
- сводка запуска 31, 42
- сканер штрихкодов, внешний
 - сброс 56
- сканеры 2
- снятие стрипа на 8 пробирок 33, 44
- совместимость версий
 - программное обеспечение 9
 - расходные материалы 9
- Соли
 - удаление 33, 44
- состояние системы 4
- справка
 - документация 2
- столик для реактивов 4
- стрип на 8 пробирок, снятие 33, 44
- Считыватель штрихкодов, внешний
 - очистка 46

Т

- температурный диапазон 56
- техническая поддержка 63
- техническое обслуживание 33, 44
- Техническое обслуживание 47
 - периодический уход 46
- техническое обслуживание, профилактическое 47
- Требования к запуску
 - настройка 5

Ф

фольга не проколота 34, 45

Х

холостой режим 51

хранение проточных кювет 26, 31, 38, 42

хранилище проточных кювет

хранение проточных кювет 32, 43

Э

экран статуса запуска 30, 41

этапы кластеризации 30, 41

Техническая помощь

Для получения технической помощи свяжитесь со службой технической поддержки компании Illumina.

Веб-сайт www.illumina.com
 Электронная почта techsupport@illumina.com

Номера телефонов службы поддержки клиентов Illumina

Регион	Бесплатный звонок	Региональные отделения
Северная Америка	+1 800-809-45-66	
Австралия	+1 800-775-688	
Австрия	+43 800-00-62-49	+43 192-865-40
Бельгия	+32 800-771-60	+32 340-029-73
Великобритания	+44 800-012-60-19	+44 207-305-71-97
Германия	+49 800-101-49-40	+49 893-803-56-77
Гонконг	800-96-02-30	
Дания	+45 808-201-83	+45 898-711-56
Ирландия	+353 180-093-66-08	+353 016-95-05-06
Испания	+34 911-89-94-17	+34 800-30-01-43
Италия	+39 800-98-55-13	+39 236-00-37-59
Китай	400-066-58-35	
Нидерланды	+31 800-022-24-93	+31 207-13-29-60
Новая Зеландия	0800-45-16-50	
Норвегия	+47 800-168-36	+47 219-396-93
Сингапур	+1 800-579-27-45	
Тайвань	008-066-517-52	
Финляндия	+358 800-91-83-63	+358 974-79-01-10
Франция	+33 805-10-21-93	+33 170-77-04-46
Швейцария	+41 565-80-00-00	+41 800-20-04-42
Швеция	+46 850-61-96-71	+46 200-88-39-79
Япония	0800-111-50-11	
Другие страны	+44 179-953-40-00	

Паспорта безопасности веществ (SDS) можно найти на сайте компании Illumina по адресу support.illumina.com/sds.html.

Документацию о продукции можно скачать в формате PDF с веб-сайта компании Illumina. Перейдите на веб-сайт support.illumina.com, выберите нужный продукт, затем нажмите на опцию **Documentation & Literature** (Документация и литература).

