

HiSeq 4000

系统指南



本文档及其内容归 Illumina, Inc. 及其附属公司（“Illumina”）所有，并且仅供其客户用于与本文档内所描述的产品用途相关的合同用途，不得用于其他任何目的。在未获得 Illumina 的事先书面同意的情况下，不得出于任何目的使用或分发本文档及其内容，和/或以其他任何方式对其进行传播、披露或复制。Illumina 不通过本文档向第三方授权其任何专利、商标、所有权或习惯法权利或类似权利。

本文档中的说明必须由具备资格且受过相关培训的人员严格且明确执行，以确保本文档中描述的产品能够获得适当且安全的使用。在使用此类产品之前，相关人员必须通读并理解本文档中的所有内容。

未能完整阅读并明确遵守本文档中包含的所有说明可能会导致产品损坏、对用户或其他人员造成人身伤害以及对其他财产造成损害，并且将导致产品适用的保证失效。

对于由不当使用本文档中描述的产品（包括其部件或软件）引起的任何后果，ILLUMINA 概不承担任何责任。

© 2018 Illumina, Inc. 保留所有权利。

所有商标均为 Illumina, Inc. 或其各自所有者的财产。有关特定的商标信息，请参见 www.illumina.com/company/legal.html。

修订历史记录

文档	日期	更改描述
材料号 20015630 文档号 15066496 v05	2018 年 3 月	在“查看和发送仪器数据”部分添加了有关 Illumina 预防性监控服务的信息。 更新了试剂信息，将 HP12 替换为 HP14。
材料号 20015630 文档号 15066496 v04	2017 年 1 月	更新了维护清洗程序。 删除了针对 SeqClin 清洗液的 Sigma-Aldrich 商品目录号 SRE0076。 将软件名称更新为 HiSeq Control Software HD v3.4。
材料号 20013047 文档号 15066496 v03	2016 年 9 月	在“更多资源”一节中添加了自定义操作流程选择器。 针对 SeqClin 清洗液添加了 Sigma-Aldrich 商品目录号 SRE0076。 指出了更换新洗瓶和试管的大致频率。 更新了仪器启动说明： · 等待系统完成加载，然后再登录操作系统，而不是先登录操作系统。 · 将配置仪器各项设备以及 DoNotEject 进行初始化的持续时间从 1 分钟延长到 3 分钟。 · 指出了硬盘必须为空，系统才能正常运行。 更新了快速格式化的说明，在其中加入了暂存盘 (S:) 快速格式化说明。 更正了有关如何访问日志文件的说明。 更正了对 BaseSpace 服务器选项的描述。
材料号 20007157 文档号 15066496 v02	2016 年 5 月	更新了 HiSeq Control Software v3.3.76 的软件描述： · 针对 BaseSpace Enterprise 用户，添加了域配置说明。 · 更新了交错运行的相关说明，其中包括了“Pause（暂停）”按钮的使用。 将 BaseSpace 重命名为 BaseSpace Sequence Hub，并将 BaseSpace Onsite 重命名为 BaseSpace Onsite Sequence Hub。 添加了以下信息： · 簇生成试剂盒的商品目录号。 · 《cBot 2 系统指南》（文档号 15065681），以用作成簇参考资料。 · 测序输出文件的文件夹结构，以及运行文件夹名称和路径。 · 关于片段 1 中配准失败的故障诊断。 · 有关年度预防性维护服务的建议。 移除了以下项： · 用户自备耗材列表中的自立式圆锥形试管和移液器吸头。 · 登录操作系统所需的默认用户名和密码。Illumina 建议使用站点专用的凭证。 · 本指南的商品目录号。 更正了以下项： · 有关制备及装入标签和双末端测序试剂以进行单端测序运行的说明。单标签单端测序运行不需要 HRM。 · 将仪器使用的实时分析软件名称从 RTA v2 更正为 RTA2。

文档	日期	更改描述
材料号 20000063 文档号 15066496 v01	2015 年 8 月	更新了对 HiSeq Control Software v3.3.52 的软件描述，该软件添加了以下功能： <ul style="list-style-type: none"> · 对单端测序流动槽测序的选项。 · 连接到 BaseSpace Onsite 的选项。 · 显示 Run Copy Service 和 BaseSpace 的数据传输状态的传感器指示器。 将“Reagents（试剂）”屏幕上的“PE Reagent Kit ID（PE 试剂盒 ID）”字段重命名为“Cluster Kit ID（簇生成试剂盒 ID）”字段。 更新了在流动槽 A 和 B 上交错运行的说明。 添加了从“Reagents（试剂）”屏幕指定自定义 SBS 循环次数的选项，并更新了剩余循环次数的默认值。 添加了以下信息： <ul style="list-style-type: none"> · 有关制备 SBS、双末端测序和标签试剂的说明。 · 有关先用水再用酒精擦拭流动槽支架的说明。 · 有关根据当地政府标准处置维护清洗液的注意事项。 更正了维护清洗的持续时间和预期所需剂量。
部件号 15066496 修订版 A	2015 年 2 月	最初版本。

目录

修订历史记录	iii
第 1 章概述	1
简介	1
更多资源	1
仪器组件	1
测序耗材概述	5
第 2 章入门	7
启动 HiSeq 4000	7
自定义系统设置	7
查看和发送仪器数据	8
用户自备的耗材	9
第 3 章 制备试剂	10
第 3 章制备试剂	10
简介	10
制备 SBS 试剂	10
制备标签和双末端测序试剂	10
第 4 章测序	12
简介	12
测序工作流程	12
输入运行参数	13
装入和填装试剂	15
装入测序流动槽	19
监控运行	21
取出试剂	22
执行水洗	22
快速格式化输出盘和暂存盘	23
第 5 章维护	24
简介	24
执行维护清洗	24
闲置仪器	28
关闭仪器	28
附录 A 故障诊断	30
日志文件	30
可能的运行设置问题	30
执行射流检查	30

在 HiSeq 4000 上暂停或结束运行	31
在流动槽 A 和 B 上交错运行	32
可能需要进行片段 1 引物再次杂化的情形	32
附录 B 实时分析	33
实时分析概述	33
实时分析工作流程	34
附录 C 输出文件	37
测序输出文件	37
输出文件夹结构	37
小区编号	38
索引	39
技术协助	43

第 1 章概述

简介	1
更多资源	1
仪器组件	1
测序耗材概述	5

简介

HiSeq® 4000 系统将创新的工程与可靠的性能相结合，可实现通量最大化和成本最低化的生产规模基因组测序。

功能

- ▶ **双面成像** — HiSeq 4000 使用配备 2 个相机、4 个传感器并采用了尖端扫描技术的落射荧光系统，来实现双面成像。
- ▶ **图形化流动槽** — 图形化流动槽允许按有序排列的方式生成测序簇，如此可增加输出片段和数据。
- ▶ **双流动槽** — HiSeq 4000 是一个双流动槽系统，可让您同时使用不同的片段长度对单个流动槽或 2 个流动槽进行测序。
- ▶ **大容量试剂冷却器** — 试剂仓是一个大容量冷却器，其存放的试剂足够整个测序运行之用。
- ▶ **双末端测序运行的集成射流** — 集成的双末端射流可将试剂仓中的试剂提供给流动槽，以进行片段 2 再合成和标签测序。
- ▶ **界面控制选项** — 仪器软件界面提供了一些用于设置运行和操作仪器的选项。使用触摸屏显示器或集成的键盘即可输入。
- ▶ **实时碱基检出** — 仪器计算机上的仪器软件会从图像提取强度并执行评定质量分值的碱基检出。此方法可在运行期间监控质量指标，并节省后续数据分析所需的时间。
测序数据的下游分析可以使用 Illumina® 分析软件或第三方软件在自定义基础架构上进行。
- ▶ **BaseSpace® Sequence Hub 集成** — 测序工作流程与 BaseSpace Sequence Hub 相集成，后者是 Illumina 用于数据分析、存储和协作的基因组计算环境。当运行执行时，输出文件会实时传送到 BaseSpace Sequence Hub 或 BaseSpace Onsite Sequence Hub。

更多资源

以下文档可从 Illumina 网站下载。请务必查看支持页面获取最新版本。

资源	描述
自定义操作流程选择器	用来生成定制的端到端文档的向导，针对测序运行所用的文库制备方法、运行参数和分析方法而调整。
《HiSeq 4000 和 HiSeq 3000 系统场地准备指南》（文档号 15066492）	提供实验室空间、电气要求和环境注意事项的规范。
《HiSeq 4000 和 HiSeq 3000 系统安全和合规性指南》（文档号 15066491）	提供有关仪器标签、合规性证书和安全注意事项的信息。

请访问 Illumina 网站上的 HiSeq 4000 支持页面，查看相应文档、软件下载、在线培训和常见问题解答。

仪器组件

HiSeq 4000 系统包括仪器、显示器、仪器控制计算机以及键盘、鼠标和条形码扫描仪等配件。仪器包含 4 个主要仓室：光学模块、流动槽仓、射流仓和试剂仓。发光的状态栏指示仪器的运行状态。

图 1 外部组件

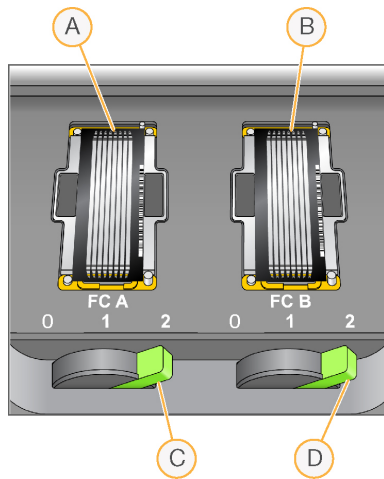


- A **光学模块**— 包含光学组件，可支持流动槽的双面成像，以及使用落射荧光同时进行 A、C、G 和 T 成像。激发激光束会穿过目标，同时通过这个目标收集荧光。
- B **流动槽仓** — 包含真空控制的流动槽台，用于在测序运行期间固定流动槽。
- C **射流仓**— 包含射流泵，用于将试剂传送给流动槽，然后再传送到废液容器。
- D **状态栏**— 使用三种颜色指示仪器状态。蓝色指示仪器正在运行，橙色指示仪器需要引起注意，绿色指示仪器已准备好可以开始下一个运行。
- E **试剂仓** — 包含试剂托架，它可以存放试剂（用于测序运行）和清洗液（用于仪器清洗）。

流动槽仓

流动槽仓中有流动槽台、热力站、真空系统以及连到每个流动槽的射流接线。

图 2 配置有两个流动槽的流动槽台



- A 流动槽 A
- B 流动槽 B
- C 流动槽拉杆 A
- D 流动槽拉杆 B

流动槽 A 位于左边，流动槽 B 位于右边。每个流动槽都放置在流动槽台上，而流动槽台会按控制软件的指示在光学模块中移入/移出。流动槽台必须位于最前方的位置，才能打开流动槽仓门装入或取下流动槽。

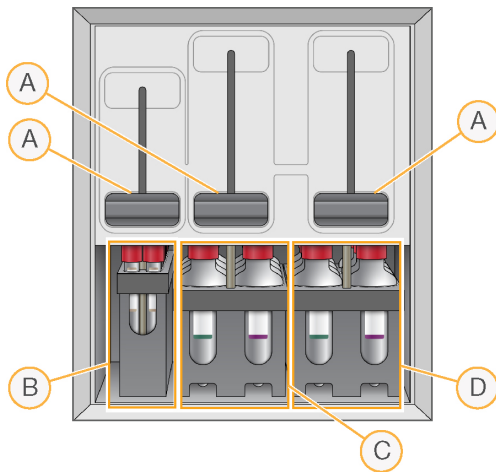
流动槽放置在流动槽支架上时，入口和出口均朝下。流动槽支架下方为真空，可以将流动槽固定在相应的位置。每个流动槽支架前面发光的流动槽拉杆用于控制真空开关。当真空密封紧密时，流动槽拉杆会变成绿色。

试剂仓

试剂仓是一个大容量的试剂冷却器，包含 3 个试剂托架：2 个用于 SBS 试剂，1 个用于标签和双末端测序试剂。吸管手柄可降低吸管以插入试剂瓶中。

- ▶ **SBS 试剂托架** — 可固定 250 毫升圆锥试剂瓶。流动槽 A 的试剂托架位于中央位置，流动槽 B 的托架位于最右边。每个试剂托架都具有与内部试剂选择器阀上的接头对应的编号位置。
- ▶ **标签和双末端测序试剂托架** — 位于左边位置。它含有 2 行编号位置，用于存放内装双末端测序试剂和标签试剂的 15 毫升圆锥形试管。左边一行用于流动槽 A，右边一行用于流动槽 B。
- ▶ **试剂冷却器** — 试剂冷却器中内含试剂托架，其内部温度保持在 2°C 到 8°C 之间。

图 3 试剂仓



- A 吸管手柄
- B 标签和双末端测序试剂的试剂托架
- C 流动槽 A 的 SBS 试剂的试剂托架
- D 流动槽 B 的 SBS 试剂的试剂托架






HiSeq 4000 软件

仪器计算机中安装了以下三个软件应用程序：

- ▶ **HiSeq 4000 控制软件** — HiSeq Control Software HD v3.4 界面会引导您完成测序运行设置步骤。运行期间，控制软件会操作仪器硬件、控制射流、设置温度，以及提供质量统计信息的直观汇总。
- ▶ **实时分析软件** — 实时分析与控制软件相集成，可执行碱基检出并为每次循环的每个碱基分配一个质量分值。有关详细信息，请参见[实时分析 \(第 33 页\)](#)。
- ▶ **Sequencing Analysis Viewer 软件** — Sequencing Analysis Viewer (SAV) 可提供详细的质量统计信息。

状态图标

状态图标位于每个屏幕的右上角，显示在运行设置期间和运行期间的状况变化、错误或警告。

状态图标	状态名称	描述
	状态正常	未发生更改。系统正常。
	信息	仅供参考。无需任何操作
	注意	可能需要注意的信息。
	警告	警告不会使运行停止，但是可能需要执行操作后运行才能继续。
	错误	错误通常会导致运行停止，并且通常需要您采取措施才能继续当前运行。

当状况发生变化时，相关图标会闪烁，以向您示警。

- ▶ 选择该图标可打开状态窗口并查看对该状况的说明。
- ▶ 选择 **Acknowledge (确认)** 接受消息，然后选择 **Close (关闭)** 关闭对话框。

活动和传感器指示器

“Welcome (欢迎)” 屏幕的右下角显示了一系列图标。它们会根据仪器传感器指示仪器活动以及特定组件的状态。

图 4 活动指示器



从左到右，活动指示器分别代表 X、Y 和 Z 电机、电子功能、相机、射流系统和处理功能。

图 5 传感器指示器



从左到右，传感器指示器分别代表流动槽 A 温度、试剂冷却器温度、数据传输状态、BaseSpace Hub 云状态和流动槽 B 温度。

数据传输状态

HiSeq 软件套装包括 Run Copy Service，该软件用于管理向输出文件夹的数据传输。选择 BaseSpace 选项会向 BaseSpace Sequence Hub 或 BaseSpace Onsite Sequence Hub 发送仪器运行状况和测序数据。

软件界面上的其中两个传感器指示器显示 Run Copy Service 和 BaseSpace Sequence Hub 的传输状态。

Run Copy Service

Run Copy Service 的传输状态将影响您能否开始新运行或安全地格式化输出盘。

状态图标	描述
	数据正在传输。传输完成前请勿格式化输出盘。
	数据正在传输，但网络连接速度很慢。您可以在传输完成后设置测序运行，以及格式化输出盘。
	Run Copy Service 已关闭。
	Run Copy Service 已开启，但未在传输数据。

BaseSpace Sequence Hub

BaseSpace 传感器指示器会显示 BaseSpace Sequence Hub 的状态。蓝色云朵表示有效连接。灰色云朵表示软件无法连接。下表显示了有关各种状态图标的详细信息。

状态图标	描述
	未连接到 BaseSpace Sequence Hub。
	已连接到 BaseSpace Sequence Hub，但未传输数据。
	已连接到 BaseSpace Sequence Hub，并且正在传输不超过 4 项运行的数据。
	已连接到 BaseSpace Sequence Hub，并且正在传输 5 项或更多运行的数据。 此图标显示时，控制软件不允许任何新的运行连接到 BaseSpace Sequence Hub。
	已从 BaseSpace Sequence Hub 断开连接，但仍有数据排队等待传输。

测序耗材概述

在 HiSeq 4000 上执行运行需要 1 个 HiSeq 3000/4000 SBS 试剂盒和 1 个簇生成试剂盒。簇生成试剂盒分为双末端测序 (PE) 和单端测序 (SR) 两种版本。

试剂盒名称	商品目录号
HiSeq 3000/4000 SBS 试剂盒 (300 次循环)	FC-410-1003
HiSeq 3000/4000 SBS 试剂盒 (150 次循环)	FC-410-1002
HiSeq 3000/4000 SBS 试剂盒 (50 次循环)	FC-410-1001
HiSeq 3000/4000 PE 簇生成试剂盒	PE-410-1001
HiSeq 3000/4000 SR 簇生成试剂盒	GD-410-1001

SBS 试剂盒包含在 HiSeq 上使用的测序试剂，且试剂量足以对 1 个流动槽测序。测序试剂装在 250 毫升的试剂瓶内，且试剂瓶可直接装入试剂托架中。试剂标签使用颜色编码，以减少装入错误。

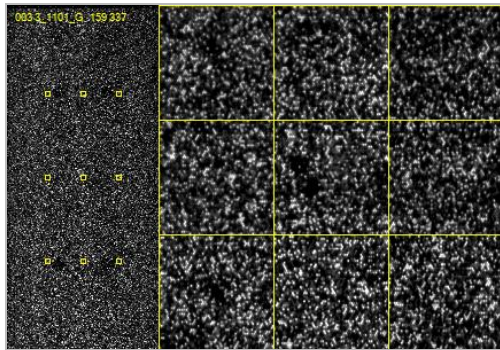
簇生成试剂盒包含在 cBot 上使用的成簇试剂，以及在 HiSeq 4000 上使用的标签和双末端测序试剂。每个簇生成试剂盒均包含配件包，其中提供流动槽垫片、用于 SBS 试剂瓶的漏斗盖和流动槽存储试管。

图形化流动槽

HiSeq 4000 使用的图形化流动槽带有数十亿个制作成流动槽玻璃的有序纳米井。这样的有序排列会增加输出片段的数目和生成的测序数据量。

图形化流动槽装在 HiSeq 3000/4000 簇生成试剂盒中。

图 6 图形化流动槽上的簇示例



第 2 章入门

启动 HiSeq 4000	7
自定义系统设置	7
查看和发送仪器数据	8
用户自备的耗材	9

启动 HiSeq 4000

- 1 启动仪器控制计算机。
- 2 等待系统完成加载，然后登录操作系统。如果需要，可联系您所在机构的管理员获取用户名和密码。
- 3 找到位于仪器左侧的电源开关，将其切换到“ON（开）”位置。
- 4 至少等待 3 分钟，以便让仪器各项设备进行配置，让仪器的 DoNotEject 驱动器进行初始化。
- 5 关闭在 DoNotEject 初始化后打开的窗口。如果该窗口未打开，请使用 MyComputer 检查 DoNotEject 驱动器。



注意

切勿弹出位于仪器机箱内部的 DoNotEject 闪存驱动器，也不要修改该驱动器上的文件。此驱动器包含硬件配置文件，每当仪器打开时都会进行初始化。

- 6 为了确保磁盘空间足够，请将仪器计算机上的先前运行数据存档到网络位置。对 O:\ 和 S:\ 盘执行快速重格式化，清除任何残留数据。
硬盘必须为空，软件才能正常运行。
- 7 使用桌面上的快捷方式图标打开 HCS。
软件初始化完成后，将会打开 Welcome（欢迎）屏幕，并且屏幕右下角将会出现“Initialized（已初始化）”图标。

仪器和控制计算机的最佳实践

- ▶ 仪器正在运行时，请勿打开计算机。务必在打开仪器之前先打开计算机。
- ▶ 仪器控制软件运行时，请勿关闭仪器。
- ▶ 关闭仪器后，请等待 1 分钟后再开启。
- ▶ 先将仪器、显示器和键盘的 USB 电缆连接至计算机的背面，再打开计算机。
- ▶ 将条形码扫描仪和鼠标连接至计算机正面的 USB 端口。

自定义系统设置

该控制软件包含对运行文件夹、LIMS 首选项和域的可自定义系统设置。“Menu Options（菜单选项）”窗口包含了一些设置，用于定义运行 ID 模板、默认文件夹位置、是否发送仪器运行状况信息、LIMS 身份验证以及 BaseSpace Enterprise 域。

要自定义界面的视图，请选择 **Menu | View（菜单|视图）**。您可以选择以全屏或窗口形式查看界面，也可以将界面最小化。

定义运行文件夹设置

- 1 从“Welcome（欢迎）”屏幕中，选择 **Menu | Tools | Options（菜单|工具|选项）** 打开“Menu Options（菜单选项）”窗口。

- 要自定义运行文件夹名称的命名约定，请修改 **Run ID Template (运行 ID 模板)** 字段中的设置。选择 **Reset (重置)** 可清除该字段中的数据。
- 要设置默认的输出位置，请输入以下各个文件夹的位置：
 - ▶ **Default Output Folder (默认输出文件夹)** — 流动槽 A 上的运行的默认输出文件夹。
 - ▶ **Default Output Folder2 (默认输出文件夹 2)** — 流动槽 B 上的运行的默认输出文件夹。



注意

Illumina 建议使用网络位置作为输出文件夹。不过，您也可以指定 O:\ 盘上 HiSeq Temp 文件夹以外的位置。不要使用 S:\ 盘或 C:\ 盘。因为 S:\ 盘专为仪器运行而保留，C:\ 盘又太小。

- 要设置 LIMS 样品表的位置，请在 **Run Setup Folder (运行设置文件夹)** 字段中输入该位置。
- 选择 **OK (确定)** 保存设置并关闭“Menu Options (菜单选项)”窗口。选择 **Cancel (取消)** 会关闭窗口而不保存设置。

设置 LIMS 首选项

- 从“Welcome (欢迎)”屏幕中，选择 **Menu | Tools | Options (菜单|工具|选项)** 打开“Menu Options (菜单选项)”窗口。
- 输入以下 LIMS 信息：
 - ▶ **LIMS Server (LIMS 服务器)** — 用于与受支持的 Illumina LIMS 交互的服务器名称。
 - ▶ **LIMS User Name (LIMS 用户名)** — 向 Illumina LIMS 验证身份时使用的用户名。
 - ▶ **LIMS Password (LIMS 密码)** — 向 Illumina LIMS 验证身份时使用的密码。
- 选择 **OK (确定)** 保存设置并关闭“Menu Options (菜单选项)”窗口。选择 **Cancel (取消)** 会关闭窗口而不保存设置。

配置域

如果您是 BaseSpace Enterprise 用户，请按照以下说明配置您的域。

- 从“Welcome (欢迎)”屏幕中，选择 **Menu | Tools | Options (菜单|工具|选项)** 打开“Options (选项)”窗口。
- 选择一个 BaseSpace 服务器选项：
 - ▶ **Cloud (云端)** — 连接到您的 BaseSpace Sequence Hub 域。
 - ▶ **Onsite (本地)** — 连接到您的 BaseSpace Onsite Sequence Hub 域。
- 输入所选服务器的域。
- 选择 **OK (确定)** 保存设置并关闭“Options (选项)”窗口。选择 **Cancel (取消)** 会关闭窗口而不保存设置。

查看和发送仪器数据

“Welcome (欢迎)”屏幕上的“Menu (菜单)”按钮和“Menu Options (菜单选项)”窗口提供了一些用于查看和发送仪器数据的选项。

- ▶ 要查看有关仪器硬件、软件版本的信息以及技术支持的联系信息，请选择 **Menu | About (菜单|关于)**。
- ▶ 选择 **Menu (菜单) | Tools (工具) | Options (选项)**，然后选择 **Send instrument health data to Illumina to help Illumina improve its products (将仪器运行状况数据发送给 Illumina 以帮助其改进产品)**，以启用 Illumina 预防性监控服务。软件界面中的设置名称可能会与本指南中的名称有所不同，具体取决于所使用的 HCS 版本。

如果打开此设置，即将将仪器性能数据发送给 Illumina。此数据可帮助 Illumina 更轻松地进行故障诊断以及检测潜在的故障，从而实现预防性维护并最大限度延长仪器正常运行时间。有关此服务的优势的详细信息，请参见 *Illumina 预防性技术说明*（文档号 1000000052503）。

此服务：

- ▶ 不发送测序数据。
- ▶ 要求将仪器连接到可访问互联网的网络。
- ▶ 默认情况下处于打开状态。要想取消此服务，请禁用 **Send instrument health data to Illumina to help Illumina improve its products**（**将仪器运行状况数据发送给 Illumina 以帮助其改进产品**）设置。



注意

软件升级后，会重新打开此设置。如果您不希望将仪器性能数据发送给 Illumina，请在每次软件升级后禁用此服务。

用户自备的耗材

耗材	供应商	用途
酒精棉片， 70% 甘油 或 70% 乙醇	WWR，商品目录号 95041-714 一般实验室供应商	清洁流动槽和流动槽台。
大玻璃瓶，至少 6 升容量	一般实验室供应商	制备维护清洗液。
250 毫升离心管	Corning，商品目录号 430776	SBS 试剂托架，其各位置中包含 PW1。 仪器清洗。
15 毫升圆锥形试管	Corning，商品目录号 430052	PE 试剂托架，其各位置中包含 PW1。 仪器清洗。 收集并称量废液。
一次性无粉手套	一般实验室供应商	一般用途。
低尘实验室棉巾纸	WWR，商品目录号 21905-026	清洁流动槽支架。
4 x 6 英寸擦镜纸	WWR，商品目录号 52846-001	清洁流动槽。
50 毫升 ProCline 300	Sigma-Aldrich，商品目录号 48912-U	维护清洗。
100 毫升 Tween 20 粘性液体	Sigma-Aldrich，商品目录号 P7949	维护清洗。
方头塑料镊子	McMaster-Carr，商品目录号 7003A22	取下流动槽垫片。
实验室级用水，18 兆欧	Millipore	SBS 和 PE 试剂托架，其各位置中包含 PW1。 仪器清洗。

第 3 章 制备试剂

简介	10
制备 SBS 试剂	10
制备标签和双末端测序试剂	10

简介

在设置运行之前，需制备要用于测序的所有试剂：SBS 试剂、标签试剂和双末端测序试剂。所有试剂都是在运行设置期间根据软件提示装入的。运行期间不需要回到仪器再次装入试剂。

在簇生成期间可以制备测序试剂。

制备 SBS 试剂

SBS 试剂是在运行开始时装入仪器的。请遵照以下说明解冻并检查 HCM、HIM 和 HSM。

解冻 SBS 试剂

- 1 将 HCM、HIM 和 HSM 从 -25°C 到 -15°C 的存储环境中取出。
- 2 在 2°C 到 8°C 温度下解冻约 16 个小时。
或者，将 HIM 和 HSM 放在装有室温去离子水的水槽中解冻约 90 分钟。请在**单独**的水槽中解冻 HCM。



注意

每次处理 HCM 后都请更换手套。

- 3 翻转每个试剂瓶将试剂混匀。
- 4 检查 HSM，确保看不到任何旋涡形状。
- 5 将 HIM 和 HSM 放在冰上。
- 6 将 HCM **单独**放在冰上，以避免交叉污染。

制备标签和双末端测序试剂

标签和双末端测序试剂是在运行开始时装入仪器的。在测序运行的标签片段和片段 2 再合成步骤中会用到这些试剂。

仅当您要对双末端测序流动槽测序或要在单端测序流动槽上进行标签文库测序时，才需遵照说明制备标签和双末端测序试剂。



警告

这组试剂含有潜在危险化学品。吸入、摄取、皮肤接触和眼睛接触都会对身体造成伤害。请穿戴防护装备，包括适合的护目用具、手套和实验室工作服以避免伤害。将用过的试剂作为化学废物处理，并根据适用的区域、国家和当地法律及法规进行丢弃。有关其他环境、健康和信息安全，请参见 support.illumina.com/sds.html 中的 SDS。

解冻并制备标签和双末端测序试剂

- 1 从 -25°C 到 -15°C 的存储环境中取出以下试剂：
 - ▶ 如果是双末端测序流动槽上的运行，需要使用：HAM、HDR、HLM2、HP11、HP14、HPM 和 HRM。对于非标签文库，不需要使用 HP14。
 - ▶ 如果是单端测序流动槽上的运行，需要使用：

- ▶ 双标签文库 — HDR、HP14 和 HRM。
 - ▶ 单标签文库 — HDR 和 HP14。
- 2 放入装有室温去离子水的烧杯中解冻约 20 分钟。
 - 3 翻转每个试管将试剂混匀。
 - 4 以 1000 转/分的转速离心 1 分钟。
 - 5 将 HAM、HLM2 和 HRM 放在冰上。
 - 6 将 HDR、HP11、HP14、HP14 和 HPM 置于室温下。


第 4 章测序

简介	12
测序工作流程	12
输入运行参数	13
装入和填装试剂	15
装入测序流动槽	19
监控运行	21
取出试剂	22
执行水洗	22
快速格式化输出盘和暂存盘	23

简介

要在 HiSeq 4000 上执行运行，请制备所有试剂，然后按照软件提示设置运行。运行设置步骤包括输入运行参数、装入和填装试剂、装入流动槽以及执行射流检查。

运行设置步骤分别在 3 个选项卡中进行：“Run Configuration (运行配置)”、“Pre-Run Setup (运行前设置)”和“Initiate Run (初始化运行)”。

- ▶ “Run Configuration (运行配置)” 屏幕包含用于设置运行参数的下拉列表、复选框或文本字段。请使用手持条形码扫描仪扫描流动槽或试剂盒 ID，或者使用触摸屏键盘输入该 ID。键盘图标位于文本字段右侧。
- ▶ 选择 **Next (下一步)** 可移至下一个屏幕，选择 **Back (返回)** 可返回到上一个屏幕。
- ▶ 在执行运行设置步骤期间，随时可以选择 **Cancel (取消)** 退出运行设置，回到“Welcome (欢迎)”屏幕。

请访问 Illumina 网站上的 [HiSeq 4000 规格页面](#)，以了解有关运行持续时间和其他性能规格的信息。

交错运行

当流动槽 A 或 B 上有正在进行的运行时，可以在相邻流动槽上启动新运行。有关详细信息，请参见 [在流动槽 A 和 B 上交错运行 \(第 32 页\)](#)。

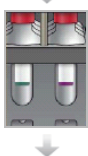
测序工作流程



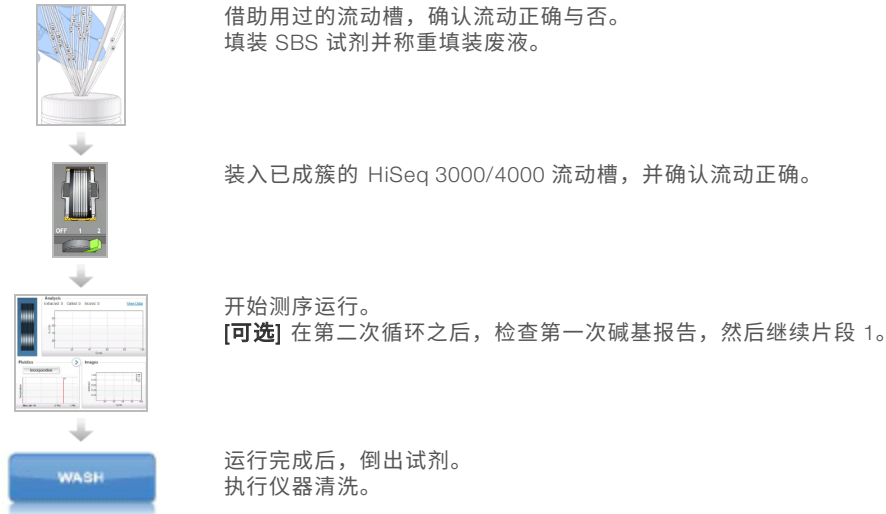
为运行准备流动槽并制备试剂。



根据控制软件界面提示输入运行参数。



装入用于片段 1 和片段 2 的 SBS 试剂。如适用，装入标签试剂和双末端测序试剂。



输入运行参数

在“Run Configuration (运行配置)”选项卡上输入一系列屏幕提供的运行参数，开始运行设置。软件会引导您完成每个屏幕上的设置，来指定 BaseSpace Sequence Hub 连接、输入耗材 ID、选择标签选项以及记录其他参数。

存储屏幕

- 1 从“Welcome (欢迎)”屏幕中，选择 **Sequence (测序)** 打开“Storage (存储)”屏幕。
- 2 **[可选]** 执行以下操作，连接到 BaseSpace Sequence Hub 或 BaseSpace Onsite Sequence Hub。
 - a 选择 **Connect to BaseSpace (连接到 BaseSpace)**。
 - b 选择 **BaseSpace** 或 **BaseSpace Onsite**。
 - c 如果您选择了 BaseSpace，请从以下选项中进行选择：
 - ▶ **Storage and Analysis (存储并分析)** — 将运行数据发送到 BaseSpace Sequence Hub 供远程监控和数据分析。使用此选项需要有样品表。
 - ▶ **Run Monitoring Only (仅限运行监控)** — 仅将 InterOp 文件发送给 BaseSpace Sequence Hub，供远程监控运行。
 - d 使用您的 Myllumina 帐户电子邮件和密码登录 BaseSpace Sequence Hub 或 BaseSpace Onsite Sequence Hub。
- 3 选择 **Browse (浏览)** 导航至首选输出文件夹位置。
- 4 确认缩略图设置为 **Save All Thumbnails (保存所有缩略图)**。
 软件将自动保存所有缩略图图像。缩略图是指从每一列 (小区或测绘带) 的许多小区中采集图像，然后组合而成的 1 个图像。
- 5 选择 **Next (下一步)**。

流动槽设置屏幕

“Flow Cell Setup (流动槽设置)”屏幕记录有关用于运行的流动槽的信息。所有字段都是必填字段。

- 1 扫描或输入要测序的流动槽的流动槽 ID (条形码)。
- 2 选择适合的流动槽类型 (HiSeq 3000/4000 PE 或 HiSeq 3000/4000 SR)。

- 3 输入将在每个屏幕上显示的实验名称，以便识别正在进行的运行。
- 4 输入用户名。
- 5 选择 **Next (下一步)**。

高级屏幕

- 1 **[可选]** 选中 **Confirm First Base (确认第一次碱基)** 复选框。
在每次运行的第 2 次循环之后，都会自动生成第一次碱基报告并放置在运行文件夹的根级别。选择此选项可让您在继续运行之前，确认第一次碱基报告。如果不选择，运行将继续进行，而不显示确认对话框。
- 2 **[可选]** 从流动槽图像中，选择要从运行中去除的通道。
默认情况下会包括所有通道。系统将自动对所有通道执行 PhiX 比对。
- 3 选择 **Next (下一步)**。

配方屏幕

配方根据“Recipe (配方)”屏幕上输入的信息自动生成。

- 1 选择其中一个“Index Type (标签类型)”选项：
 - ▶ **No Index (无标签)** — 执行无标签的单端或双末端测序运行。
 - ▶ **Single Index (单标签)** — 使用 1 个标签片段执行单端或双末端测序运行。
 - ▶ **Dual Index (双标签)** — 使用 2 个标签片段执行单端或双末端测序运行。
 - ▶ **Custom (自定义)** — 使用自定义的标签片段循环次数执行单端或双末端测序运行。
- 2 输入片段 1 和片段 2 的循环次数（如适用）。



注意

一个片段中执行的循环次数比分析的循环次数多一次。举例而言，如果要对片段 1 执行 125 次循环，则应输入 126。

- 3 如果您选择 **Custom (自定义)** 标签选项，请输入每个标签片段的循环次数。



注意

片段长度无需匹配。

- 4 确认以下自动填充的化学反应设置。
 - ▶ **SBS: HiSeq 3000/4000 SBS Kit (SBS: HiSeq 3000/4000 SBS 试剂盒)** — 显示用于片段 1 和片段 2 的 SBS 化学反应。
 - ▶ **Index: HiSeq 3000/4000 Sequencing Primer (标签: HiSeq 3000/4000 测序引物) 或 HiSeq 3000/4000 Dual Index Sequencing Primer (HiSeq 3000/4000 双标签测序引物)** — 显示用于标签片段的化学反应。
 - ▶ **PE turnaround: HiSeq 3000/4000 PE (PE 反转: HiSeq 3000/4000 PE) 或 HiSeq 3000/4000 PE Dual Index (HiSeq 3000/4000 PE 双标签)** — 显示用于双末端再合成的化学反应。
- 5 **[可选]** 选中 **Use Existing Recipe (使用现有配方)** 复选框使用自定义配方。

样品表屏幕

样品表仅为可选，只有在使用 BaseSpace Sequence Hub 执行数据分析时才必选。

- 1 选择 **Browse (浏览)** 找到样品表。
- 2 选择 **Next (下一步)**。

试剂屏幕

“Reagents (试剂)” 屏幕记录有关用于运行的试剂盒的信息。

- 1 扫描或输入 SBS 试剂盒条形码 ID。
- 2 如果是双末端测序运行，请扫描或输入簇生成试剂盒 ID。
- 3 选择用于运行的 SBS 试剂盒：
 - ▶ 对于 300 次循环试剂盒，选择 **300 Cycles (300 次循环)**。剩余循环次数默认为 325。
 - ▶ 对于 150 次循环试剂盒，选择 **150 Cycles (150 次循环)**。剩余循环次数默认为 174。
 - ▶ 对于 50 次循环试剂盒，选择 **50 Cycles (50 次循环)**。剩余循环次数默认为 74。
 - ▶ 对于部分试剂盒或多个 50 次循环试剂盒，选择 **Custom (自定义)**。在 “Cycles Remaining (剩余循环次数)” 字段中，输入试剂预期可持续使用的 SBS 循环次数。



注意

系统会根据 SBS 试剂盒 ID 自动填充 “Cycles Remaining (剩余循环次数)” 字段。软件会递减所输入的循环次数。循环次数不足时，软件会提示您装入新试剂。

- 4 选择 **Prime SBS Reagents (填装 SBS 试剂)** 以填装试剂。
- 5 选择 **Next (下一步)**。

复查屏幕

- 1 在 “Review (复查)” 屏幕上检查运行参数。
- 2 选择 **Next (下一步)** 可继续，选择 **Back (返回)** 可更改参数。

装入和填装试剂

输入运行参数之后，装入用于运行的 SBS、标签和双末端测序试剂，然后通过射流系统填装试剂。软件会通过 “Pre-Run Setup (运行前设置)” 选项卡上的一系列屏幕引导您完成这些步骤。

装入 SBS 试剂

- 1 翻转每个试剂瓶将试剂混匀。



注意

请在最后（即装入所有其他试剂之后）混合及装入 HCM，以避免交叉污染。处理好 HCM 之后，务必丢弃旧手套，换上新的手套。

- 2 将每个试剂瓶的瓶盖换成漏斗盖。
- 3 打开试剂仓门。
- 4 执行以下操作提起 SBS 试剂托架的吸管。
 - a 将吸管手柄朝您身体的方向拉动，然后提起手柄。
 - b 松开手柄将其放到凹槽顶部的插槽中。确保手柄稳稳放置在插槽中。
- 5 使用托架手柄将试剂托架滑出试剂仓。
- 6 将每个试剂瓶放置在托架上相应的编号位置。确保试剂瓶的圆锥形底部放置在托架基座的凹陷处。

表 1 SBS 试剂位置

位置	试剂	描述
1	HIM	HT 结合混合液
2	PW1	25 毫升 PW1 或实验室级用水
3	HSM	HT 扫描混合液
4	HB1	HT SBS 缓冲液 1
5	HB2	HT SBS 缓冲液 2
6	HB2	HT SBS 缓冲液 2
7	HCM	HT 分裂混合液
8	HB2	HT SBS 缓冲液 2

- 7 戴上一副新的无粉乳胶手套。
- 8 将托架滑入试剂仓中，并使托架对准仓内地板上凸起的定位点。
- 9 执行以下操作降低吸管以插入 SBS 试剂瓶中：
 - a 将吸管手柄朝您身体的方向拉动，然后降低手柄。
 - b 检查吸管，确保它们在向下插入漏斗盖时没有弯折。
 - c 松开手柄将其放到凹槽底部的插槽中。

装入标签和双末端测序试剂

- 1 翻转每个试剂瓶将试剂混匀。
- 2 执行以下操作提起双末端测序试剂托架的吸管。
 - a 朝您身体的方向拉动并提起手柄。
 - b 松开手柄将其放到凹槽顶部的插槽中。确保手柄稳稳放置在插槽中。
- 3 使用托架手柄将托架滑出试剂仓。
- 4 如果是执行无标签的单端测序运行，请跳过步骤 5 并在每个位置中放入注入了 10 毫升 PW1 或实验室级用水的 15 毫升圆锥形试管。
- 5 取下试剂管盖子，然后将每个试管放置在托架的关联编号位置处或标签颜色相匹配的位置处。

表 2 双末端测序流动槽

位置	试剂	描述
10	HRM	HT 再合成混合液
11	HLM2	HT 线性混合液 2
12	PW1	10 毫升 PW1 或实验室级用水
13	HAM	HT 扩增混合液
14	HPM	HT 扩增预混液
15	HDR	HT 变性混合液（含有甲酰胺）
16	HP11	引物混合液 - 片段 2
17	HP14*	标签引物混合液
18	PW1	10 毫升 PW1 或实验室级用水
19	PW1	10 毫升 PW1 或实验室级用水

*只有带标签的运行才需要 HP14。如未使用 HP14，请放入注入了 10 毫升 PW1 或实验室级用水的 15 毫升圆锥形试管。

表 3 单端测序流动槽

位置	试剂	描述
10	HRM*	HT 再合成混合液
11	PW1	10 毫升 PW1 或实验室级用水
12	PW1	10 毫升 PW1 或实验室级用水
13	PW1	10 毫升 PW1 或实验室级用水
14	PW1	10 毫升 PW1 或实验室级用水
15	HDR	HT 变性混合液 (含有甲酰胺)
16	PW1	10 毫升 PW1 或实验室级用水
17	HP14	标签 1 引物混合液
18	PW1	10 毫升 PW1 或实验室级用水
19	PW1	10 毫升 PW1 或实验室级用水

*只有双标签运行才需要 HRM。如未使用 HRM，请放入注入了 10 毫升 PW1 或实验室级用水的 15 毫升圆锥形试管。

- 6 将托架滑入仓中，并使托架对准仓内地板上凸起的定位点。
- 7 执行以下操作降低吸管以插入双末端测序试剂管中：
 - a 朝您身体的方向拉动并降低手柄。
 - b 检查吸管，确保它们在降低以插入试管时没有弯折。
 - c 松开手柄将其放到凹槽底部的插槽中。
- 8 选中 PW1 (25 ml) loaded in Position 2 (25 毫升 PW1 已装入到位置 2) 复选框，然后选择 Next (下一步)。

填装试剂

试剂填装步骤包括装入填装流动槽、确认正确流动，然后开始填装。



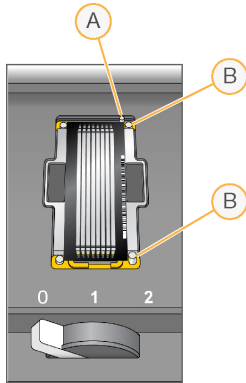
注意

请务必使用用过的流动槽来填装试剂。可以使用上次运行所用的流动槽来为后续运行填装试剂或用于运行后清洗。

装入填装流动槽

- 1 扫描或输入填装流动槽的 ID (条形码编号)。
- 2 用实验室级用水冲洗填装流动槽。用抹镜布或无绒棉巾纸擦干流动槽。
- 3 使用酒精棉片和抹镜布清洁流动槽。
- 4 将流动槽放置在流动槽支架上，入口和出口朝下，条形码在右。确保流动槽最左端箭头 (表示流动方向) 指向仪器。
- 5 朝右上定位销的方向轻轻滑动流动槽，直到它不能滑动为止。

图 7 位置在上方和右方定位销处的流动槽



- A 上定位销
B 右定位销

- 6 将您的手从流动槽移开，以防出现对准偏移。
- 7 慢慢将流动槽拉杆扳到位置 1，以形成真空并固定流动槽。
当流动槽拉杆呈绿色闪烁时，即表示已实现真空。如果拉杆不呈绿色，
请参见*可能的运行设置问题*（第 30 页）。
- 8 等待 5 秒钟左右，然后慢慢将流动槽拉杆扳到位置 2。
当流动槽拉杆呈绿色长亮时，即表示歧管已就位，流动槽已准备就绪。
- 9 确保 Vacuum Engaged（真空作用中）复选框处于选中状态，然后选择 Next（下一步）。

确认正确流动

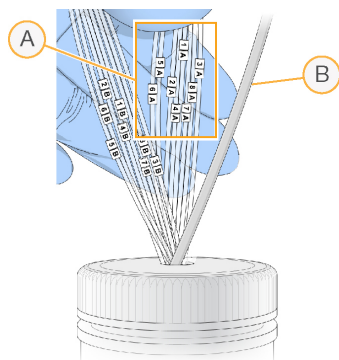
检查流动正确与否可确认流动槽和垫片是否安装正确以及歧管是否在作用中。

- 1 从下拉列表中选择位置 2。
- 2 确认以下默认值：
 - ▶ 剂量：125
 - ▶ 吸入速度：250
 - ▶ 分发速度：2000
- 3 选择 Pump（抽水）。
- 4 检查流动槽是否有气泡通过通道以及歧管附近是否有渗漏。
- 5 如气泡过多，请执行以下操作。
 - a 检查垫片上是否有阻塞物。
 - b 将吸入速度降低到 100。
 - c 另抽 125 微升水到流动槽中。
 - d 如果问题仍然存在，请取下该流动槽，重复清洁步骤，然后重新装入流动槽。
- 6 选择 Next（下一步）。

安置管线并开始填装

- 1 从废液容器中取下相应流动槽的 8 个废弃管线。

图 8 安置管线



- A 试剂位置 1-8 的流动槽废弃管线
B 冷凝泵管线

- 2 将每个废弃管线放入单独的 15 毫升空试管中。
填装完毕后要收集并称重复液。
- 3 选择 **Start Prime (开始填装)**。从填装屏幕中监控填装进度。
- 4 填装完毕后，称重废液并确认每个试管中的剂量为 1.75 毫升（总共 **14 毫升**）。
总剂量计算方法如下所示：
 - ▶ 除位置 2 外的每个 SBS 位置 250 微升 ($250 \times 7 = 1.75$ 毫升)
 - ▶ 每个通道 1.75 毫升 ($1.75 \times 8 = 14$ 毫升)
- 5 将废弃管线放回废液容器。
- 6 选择 **Next (下一步)**。

装入测序流动槽

测序流动槽的装入步骤包括取下填装流动槽、清洁流动槽支架、装入成簇的流动槽以及确认正确流动。

取出使用过的流动槽

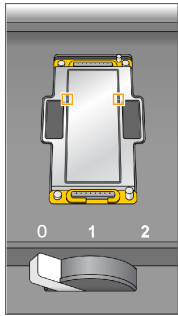
- 1 慢慢将流动槽拉杆扳到位置 1 以松开歧管。
- 2 慢慢将流动槽拉杆扳到位置 0 以解开真空密封并释放流动槽。
- 3 从流动槽支架中提起使用过的流动槽。

清洁流动槽支架

- 1 戴上一副新的无粉乳胶手套。
- 2 用蘸有实验室级用水的无绒棉巾纸擦拭流动槽支架表面，去除上面的盐分。
- 3 用酒精棉片或者蘸有乙醇或异丙醇的无绒棉巾纸擦拭流动槽支架表面。切勿让酒精滴入真空孔或落在歧管周围。
- 4 如有必要，用低尘实验室棉巾纸擦干台面。

- 5 检查流动槽支架，确保没有任何绒絮并且真空孔中没有阻塞物。

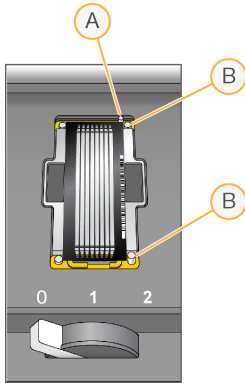
图 9 检查真空孔



装入测序流动槽

- 1 将流动槽放置在流动槽支架上，入口和出口朝下，条形码在右。确保流动槽最左端箭头（表示流动方向）指向仪器。
- 2 朝右上定位销的方向轻轻滑动流动槽，直到它不能滑动为止。

图 10 位置在上方和右方定位销处的流动槽



- A 上定位销
- B 右定位销

- 3 将您的手从流动槽移开，以防一段时间后出现对准偏移。
- 4 慢慢将流动槽拉杆扳到位置 1，以形成真空并固定流动槽。
当流动槽拉杆呈绿色闪烁时，即表示已实现真空。如果拉杆不呈绿色，请参见 [可能的运行设置问题（第 30 页）](#)。
- 5 等待 5 秒钟左右，然后慢慢将流动槽拉杆扳到位置 2。
当流动槽拉杆呈绿色长亮时，即表示歧管已就位，流动槽已准备好可供使用。
- 6 确保 Vacuum Engaged（**真空作用中**）复选框处于选中状态，然后选择 Next（**下一步**）。

确认正确流动

检查流动正确与否可确认流动槽和垫片是否安装正确以及歧管是否在作用中。

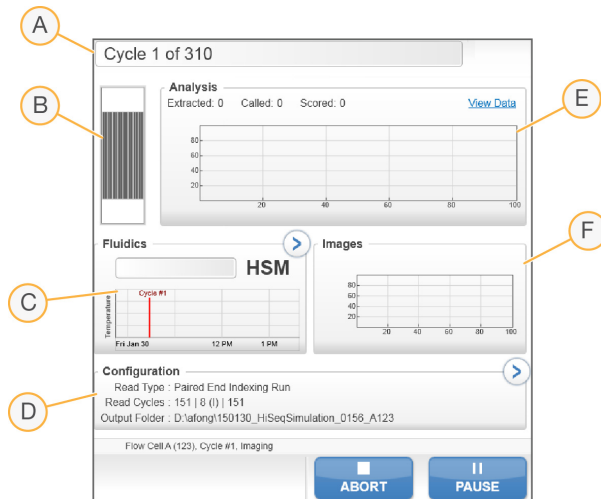
- 1 从下拉列表中选择位置 5。
- 2 输入以下值：

- ▶ 剂量：250
 - ▶ 吸入速度：250
 - ▶ 分发速度：2000
- 3 选择 Pump (抽水)。
 - 4 检查流动槽是否有气泡通过通道或者歧管附近是否有渗漏。
 - 5 如气泡过多，请执行以下操作。
 - a 检查歧管垫片上是否有阻塞物。
 - b 使用位置 6 重复该过程，以免位置 5 中的液体耗尽。
 - c 将吸入速度降低到 100。
 - d 另抽 250 微升水到流动槽中。
 - 6 选择 Next (下一步)。
 - 7 确保流动槽拉杆为绿色，然后关闭流动槽仓门。
 - 8 确保 Vacuum Engaged (真空作用中) 和 Door Closed (门已关闭) 复选框处于选中状态，然后选择 Next (下一步)。
 - 9 选择 Start (开始) 开始测序运行。

监控运行

- 1 从“Run Overview (运行概览)”屏幕中可以监控运行指标。

图 11 “运行概览”屏幕



- A **进度条** — 监控已完成循环次数。
- B **流动槽图像** — 监控已成像的通道。
- C **射流图表** — 展开射流部分可监控化学反应步骤。
- D **运行配置** — 查看当前运行的参数。
- E **分析图表** — 按循环监控质量分值。
- F **图像图表** — 按循环监控强度。对于每个已扫描测绘带，会显示一个缩略图图像。其他所有图像都不会出现在软件界面上。

第一次碱基报告

如果您在运行设置期间选择了确认第一次碱基，则在第二次循环的成像完成后，将自动打开第一次碱基确认对话框。运行将在此步骤暂停。

- 1 在确认对话框中查看第一次碱基报告。
- 2 如果结果令人满意，则选择 **Continue (继续)**。

查看运行指标

当有可用的运行指标时，Sequencing Analysis Viewer (SAV) 会自动打开并显示这些指标。指标以图表、图形和表格的形式显示。有关详细信息，请参见《Sequencing Analysis Viewer 用户指南》（文档号 15020619）。

- 1 运行期间，您可以随时选择 **Refresh (刷新)** 来查看更新的指标。

取出试剂

- 1 运行完成时，打开试剂仓门。
- 2 按以下方式提起相应 SBS 试剂托架和双末端测序试剂托架的吸管。
 - a 将吸管手柄向外拉。
 - b 在将吸管手柄向外拉的同时将它提起。
 - c 松开吸管手柄将其放到凹槽顶部的插槽中。确保吸管手柄稳稳放置在插槽中。
- 3 使用托架手柄将各试剂托架滑出试剂仓。
- 4 从各试剂托架上取出每个试剂瓶。



警告

这组试剂含有潜在危险化学品。吸入、摄取、皮肤接触和眼睛接触都会对身体造成伤害。请穿戴防护装备，包括适合的护目用具、手套和实验室工作服以避免伤害。将用过的试剂作为化学废物处理，并根据适用的区域、国家和当地法律及法规进行丢弃。有关其他环境、健康和​​安全信息，请参见 support.illumina.com/sds.html 中的 SDS。

执行水洗

每次测序运行后都需要进行水洗，以清洗系统并检查射流。维护清洗可替代运行后水洗。有关说明，请参见 [执行维护清洗 \(第 24 页\)](#)。有关说明，请参见《HiSeq 4000 用户指南》（文档号 15066496）。

如果仪器闲置了一天或更长时间，请先执行水洗，然后再开始新的测序运行。

- 1 从“Welcome (欢迎)”屏幕中，选择 **Wash | Water (清洗|水洗)**。
- 2 选择 **Yes (是)** 以清洗双末端测序试剂位置，然后选择 **Next (下一步)**。
- 3 在仪器中装入实验室级用水：
 - a 分别在 8 个 SBS 试剂瓶中加入 250 毫升实验室级用水。
 - b 分别在 10 个 PE 试管中加入 12 毫升实验室级用水。



注意

洗瓶和试管通常每 6 个月更换一次，但水需要每星期更换。

- 4 确保仪器中已装入使用过的流动槽。如果需要，请装入一个。

- 5 选择 **Next (下一步)**。
- 6 执行射流检查：
 - a 从下拉列表中选择溶液 2。
 - b 接受默认的抽液量。
 - c 选择 **Pump (抽水)**。
 - d 检查流动槽是否有气泡通过通道以及歧管附近是否有渗漏。
- 7 从废液容器中取下相应流动槽的废弃管线。
- 8 使用封口膜将废弃管线捆在一起，捆扎时须使所有末端对齐。
- 9 将捆好的管线末端放入 250 毫升洗瓶中。
- 10 选择 **Next (下一步)** 开始水洗。

位置	大约的运行时间
8 个 SBS 位置	20 分钟
8 个 SBS 位置和 10 个双末端位置	60 分钟

- 11 清洗完毕后，称重输送的剂量。

位置	总输送量	每个通道的输送量
8 个 SBS 位置	32 ml	4 ml
8 个 SBS 位置和 10 个双末端位置	72 ml	9 ml

- 12 解开废弃管线并将它们放回废液瓶中。

快速格式化输出盘和暂存盘

数据传输完成后，请对输出盘 (O:\) 和暂存盘 (S:\) 执行快速格式化。快速格式化将清理磁盘，为后续运行腾出空间，但不删除重要的系统或仪器维护文件。

运行开始前，至少要有 2 TB 才能进行长度为 2 x 151 的运行。如果磁盘空间在运行期间降至安全阈值以下，软件会暂停运行，并将流动槽置于安全状态。当有充足的磁盘空间可用时，运行会自动恢复。



注意

仪器维护日志存储在 C:\ 盘上。因此，在执行仪器清洗时对 O:\ 和 (S:\) 盘进行快速格式化比较安全。

- 1 在 Windows 中打开“Computer (计算机)”，显示计算机上的各个磁盘。
- 2 右键单击 O:\ 盘并选择 **Format (格式化)**。
- 3 从“Format (格式化)”对话框中选中 **Quick Format (快速格式化)** 复选框。
- 4 选择 **Start (开始)**。
- 5 重复 1-4 步清空 S:\ 盘。

第 5 章 维护

简介	24
执行维护清洗	24
闲置仪器	28
关闭仪器	28

简介

执行维护程序可确保仪器维持良好的性能。

- ▶ 请在仪器处于不活动状态时将其关闭或闲置。
- ▶ 除运行结束时的水洗之外，还需定期执行维护清洗，以维护射流系统。
常规仪器清洗将冲洗射流系统，并防止盐分堆积及试剂的交叉污染，从而维护仪器性能。

预防性维护

Illumina 建议您每年安排一次预防性维护服务。如果您未签订维修合同，请联系您的区域客户经理或 Illumina 技术支持部门来安排收费的预防性维护服务。

执行维护清洗

根据软件提示每 10 天执行一次维护清洗，或视情况在运行后执行维护清洗。维护清洗遵循以下两个工作流程之一来进行（取决于是否有 ProClin 300），用时大约为 90 分钟。

- ▶ **Tween 20 和 ProClin 300 清洗** — 使用用户自备的 Tween 20 和 ProClin 300 溶液清洗系统。请参见 [Tween 20 和 ProClin 300 维护清洗 \(第 24 页\)](#)。
- ▶ **Tween 20 清洗** — 使用用户自备的 Tween 20 溶液清洗系统，可能需要执行水洗。请参见 [Tween 20 维护清洗 \(第 26 页\)](#)。

如果在维护清洗前显示“Load Gasket（装入垫片）”屏幕，必须先更换前歧管和后歧管中的垫片再开始清洗。

Tween 20 和 ProClin 300 维护清洗

制备维护清洗液

清洗 1 台仪器需制备 5 升维护清洗液。清洗液在室温下最长可存储 30 天，在此期间最多可使用 3 次。请根据您所在地区的政府安全标准处置清洗液。

- 1 先加入水，然后混合以下剂量的溶液，以稀释 Tween 20：
 - ▶ 实验室级用水（225 毫升）
 - ▶ Tween 20（25 毫升）两者混合后得到浓度约 10% 的 Tween 20。
- 2 将搅拌棒放入容量至少为 6 升的空玻璃瓶中。
- 3 先加入水，然后在玻璃瓶中混合以下剂量的溶液：
 - ▶ 实验室级用水（750 毫升）
 - ▶ 10% Tween 20（250 毫升）
 - ▶ ProClin 300（1.5 毫升）混合后可得到 Tween 20 浓度约为 2.5%、ProClin 300 浓度约为 0.15% 的溶液。
- 4 在搅拌盘上彻底混匀溶液。

- 5 加入 4 升实验室级用水。
混合后可得到 Tween 20 浓度约为 0.5%、ProClin 300 浓度约为 0.03% 的溶液。
- 6 继续搅拌，直到溶液彻底混匀。
- 7 将清洗液存放在室温下的密闭容器中。

Tween 20 和 ProClin 300

- 1 从“Welcome（欢迎）”屏幕中，选择 Wash | Maintenance（清洗|维护）。
- 2 如果要使用新鲜的维护清洗液，请按如下方式将清洗液装入仪器。
 - a 分别在 8 个 SBS 瓶中加入 250 毫升新鲜的清洗液。
 - b 分别在 10 个 PE 试管中加入 12 毫升新鲜的清洗液。
 - c 为每个洗瓶和试管各分配一个试剂托架位置。在每次后续清洗中沿用这次的位置分配，以防止吸管上残留的试剂导致交叉污染。
- 3 如果您存储了之前某次运行剩余的维护清洗液，请按如下方式将清洗液装入仪器。
 - a 补充存储的清洗液并翻转将其混匀。第一次用过，重复使用清洗液的次数不要超过 2 次。
 - b 将洗瓶和试管装入分配好的试剂托架位置。

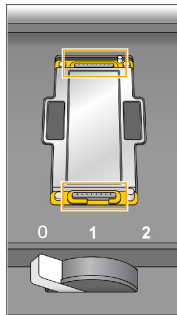


注意

一般来说，每个月更换一次洗瓶和试管即可。

- 4 清空废水瓶。
- 5 选择 Next（下一步）。
- 6 从流动槽台取下流动槽，将它置于一旁。
- 7 戴上一副新的无粉乳胶手套。
- 8 轻轻按压前垫片一侧，直到另一侧抬起。使用镊子夹紧并取下垫片。重复此步骤取下后垫片。

图 12 取下使用过的歧管垫片



- 9 在流动槽支架前端和后端的每个槽中放一片新垫片。轻轻按压到位。
- 10 重新装入之前取下的流动槽，以安装新垫片。
- 11 确保 Vacuum Engaged（真空作用中）复选框处于选中状态，然后选择 Next（下一步）。
- 12 采用默认的抽液量执行射流检查：
 - a 从下拉列表中选择溶液 2。
 - b 选择 Pump（抽水）。

- c 检查流动槽是否有气泡通过通道以及歧管附近是否有渗漏。
- d 如果持续出现气泡，请更换垫片并重复射流检查。

- 13 取下废液容器中相应流动槽的废弃管线。
- 14 使用封口膜将 8 个废弃管线捆在一起。捆扎时须使管线两端对齐。
- 15 将捆好的管线末端放入 250 毫升洗瓶中。
- 16 选择 **Next (下一步)** 开始清洗。
- 17 清洗完成后，请选择 **Return to Start (返回开始屏幕)**。
- 18 对输送的剂量称重。

位置	输送剂量
8 个 SBS 位置	74 ml
10 个双末端测序位置	52 ml
所有位置	每个通道 15.75 毫升



注意

所有洗瓶和试管已装入足够多的溶液，以确保吸管能够冲洗到。但是，由于每个位置的输送剂量有所不同，因此清洗完成后每个洗瓶和试管含有的量也有所不同。

- 19 解开废弃管线并将它们放回废液容器中。

Tween 20 维护清洗

制备维护清洗液

请务必为 Tween 20 维护清洗制备新鲜的清洗液。制备 5 升维护清洗液。这些量足以清洗一台仪器的两面。请根据您所在地区的政府安全标准处置清洗液。

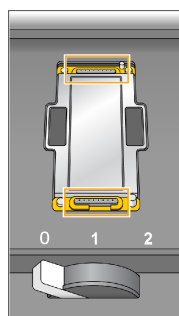
- 1 先加入水，然后混合以下剂量的溶液，以稀释 Tween 20：
 - ▶ 实验室级用水（225 毫升）
 - ▶ Tween 20（25 毫升）
 两者混合后得到浓度约 10% 的 Tween 20。
- 2 将搅拌棒放入容量至少为 6 升的空玻璃瓶中。
- 3 先加入水，然后在玻璃瓶中混合以下剂量的溶液：
 - ▶ 实验室级用水（750 毫升）
 - ▶ 10% Tween 20（250 毫升）
 混合后可得到 Tween 20 浓度约为 2.5% 的溶液。
- 4 在搅拌盘上彻底混匀溶液。
- 5 加入 4 升实验室级用水，制成 Tween 20 浓度约为 0.5% 的溶液。
- 6 继续搅拌，直到溶液彻底混匀。
- 7 立即设置清洗。

Tween 20 清洗

- 1 从“Welcome (欢迎)”屏幕中，选择 **Wash | Maintenance (清洗|维护)**。
- 2 按以下方式在仪器中装入新鲜的维护清洗液。

- a 分别在 8 个 SBS 瓶中加入 250 毫升新鲜的清洗液。
 - b 分别在 10 个 PE 试管中加入 12 毫升新鲜的清洗液。
- 3 清空废水瓶。
 - 4 选择 **Next (下一步)**。
 - 5 从流动槽台取下流动槽，将它置于一旁。
 - 6 戴上一副新的无粉乳胶手套。
 - 7 轻轻按压前垫片一侧，直到另一侧抬起。使用镊子夹紧并取下垫片。重复此步骤取下后垫片。

图 13 取下使用过的歧管垫片



- 8 在流动槽支架前端和后端的每个槽中放一片新垫片。轻轻按压到位。
- 9 重新装入之前取下的流动槽，以安装新垫片。
- 10 确保 **Vacuum Engaged (真空作用中)** 复选框处于选中状态，然后选择 **Next (下一步)**。
- 11 采用默认的抽液量执行射流检查：
 - a 从下拉列表中选择溶液 2。
 - b 选择 **Pump (抽水)**。
 - c 检查流动槽是否有气泡通过通道以及歧管附近是否有渗漏。
 - d 如果持续出现气泡，请更换垫片并重复射流检查。
- 12 取下废液容器中相应流动槽的废弃管线。
- 13 使用封口膜将 8 个废弃管线捆在一起。捆扎时须使管线两端对齐。
- 14 将捆好的管线末端放入 250 毫升洗瓶中。
- 15 选择 **Next (下一步)** 开始清洗。
- 16 清洗完成后，请选择 **Return to Start (返回开始屏幕)**。
- 17 对输送的剂量称重。

位置	输送剂量
8 个 SBS 位置	74 ml
10 个双末端测序位置	52 ml
所有位置	每个通道 15.75 毫升

**注意**

所有洗瓶和试管已装入足够多的溶液，以确保吸管能够冲洗到。但是，由于每个位置的输送剂量有所不同，因此清洗完成后每个洗瓶和试管含有的量也有所不同。

18 解开废弃管线并将它们放回废液容器中。

水洗

如果执行 Tween 20 清洗后仪器将闲置 5 天以上，请执行水洗。水洗可冲洗掉射流系统中的 Tween 20。

- 1 从“Welcome（欢迎）”屏幕中，选择 **Wash | Water（清洗|水洗）**。
- 2 按如下方式在仪器中装入实验室级用水。
 - a 分别在 8 个 SBS 试剂瓶中加入至少 20 毫升实验室级用水。
 - b 分别在 10 个 PE 试管中加入 10 毫升实验室级用水。



注意

请勿再次使用 Tween 20 清洗步骤中用过的水、试剂瓶和管线。这些水可能会被吸管上残留的试剂污染。

- 3 将洗瓶和试管装入仪器中相应的试剂托架。
- 4 选择 **Next（下一步）** 开始清洗。
- 5 清洗完毕后，称重输送的剂量。

位置	输送剂量
8 个 SBS 位置	32 ml
8 个 SBS 位置和 10 个双末端位置	72 ml

6 解开废弃管线并将它们放回废液容器中。

闲置仪器

如果仪器要闲置不超过 10 天，请根据以下说明做好准备。如果闲置时间超过 10 天，请关闭仪器。

- 1 执行维护清洗以冲洗系统。
- 2 让流动槽留在流动槽台并将流动槽拉杆扳到位置 2。让歧管留在提升位置。
- 3 在试剂托架的每个位置中装入 10 毫升实验室级用水，然后降低吸管。
- 4 使用仪器前，请执行水洗。

关闭仪器

请执行以下步骤安全地准备射流并关闭系统。只有您在未来 10 天或更长时间内不打算使用仪器时才能将其关闭。如果您打算在未来 10 天内使用仪器，请闲置仪器。

- 1 执行维护清洗以冲洗系统。
- 2 从流动槽台取下流动槽。
- 3 用酒精棉片或者蘸有乙醇或异丙醇的无绒棉巾纸擦拭流动槽支架表面。



注意

切勿让酒精滴入真空孔或落在歧管周围。如有必要，用低尘实验室棉巾纸擦干台面。

- 4 在试剂托架的每个位置中装入 10 毫升实验室级用水，然后降低吸管。
- 5 关闭仪器。

6 要重新启动仪器，请执行以下操作：

- a 在所有试剂位置装入水。
- b 打开仪器。
- c 执行水洗。

附录 A 故障诊断

日志文件	30
可能的运行设置问题	30
执行射流检查	30
在 HiSeq 4000 上暂停或结束运行	31
在流动槽 A 和 B 上交错运行	32
可能需要进行片段 1 引物再次杂化的情形	32

日志文件

日志文件将列出控制软件中发生的任何错误。此文件用于故障诊断。

要访问日志文件，请在“Welcome（欢迎）”屏幕中选择 **Menu | Tools | Show Log（菜单|工具|显示日志）**。

可能的运行设置问题

问题	可能原因	操作
软件不能初始化。	软件无法初始化内部硬件设备。	关闭错误消息，然后重新启动仪器软件。 如果问题仍然存在，请重新启动仪器计算机。如果您要重新启动计算机，请先关闭仪器，以确保能够正确识别 DoNotEject 驱动器。 如果在重新启动仪器计算机之后问题仍然存在，请关闭仪器，至少等待 60 秒，然后再重新启动仪器。
流动槽拉杆呈橙色。	流动槽未安装到位。 真空未密封。 歧管未提起。	取下流动槽并重复清洁步骤。 确保垫片存在且安装到位。 重新装入流动槽。 如果先前的步骤不起作用，请尝试更换垫片，然后重新装入流动槽。
流动槽拉杆呈橙色闪烁。	真空状态，但不完全。	取下流动槽并重复清洁步骤。 确保垫片存在且安装到位。 重新装入流动槽。 如果先前的步骤不起作用，请尝试更换垫片，然后重新装入流动槽。
流动槽拉杆呈绿色并闪烁。	真空压力状况良好。	将流动槽拉杆切换到位置 2。
射流供应能力差。	系统中可能存在气泡。	重新放置流动槽并确认孔朝下。 查看垫片周围是否有白色沉淀物。如果存在沉淀物，请更换垫片。务必在执行仪器维护清洗之前更换垫片。 确认吸管组件已降低到位，并且每个吸管都与试剂接触。
片段 1 中配准失败表现为，在流动槽的某个部分中无强度且簇通过过滤为 0%。从小区 1（入口）到小区 28（出口），簇通过过滤的百分比突然降低。	流动槽未安装到位。	如果运行尚未完成双末端反转，请停止运行并再次杂化流动槽。在重新开始运行前，请参见 装入测序流动槽（第 19 页） ，以确保流动槽放置恰当。 如果运行已完成双末端反转，则使用新流动槽设置新运行。

执行射流检查

在仪器安装期间和诊断射流问题时执行射流检查。

- 1 在“Welcome（欢迎）”屏幕上选择 **Check（检查）**。
- 2 扫描或输入填装流动槽的清洗流动槽 ID（条形码编号）。在此步骤中，请务必使用**用过的**流动槽。
- 3 将使用过的流动槽装入仪器中。

- 4 分别在 8 个 SBS 试剂瓶中加入 PW1 或实验室级用水，然后将这些试剂瓶装到相应的 SBS 试剂托架上。
- 5 从下拉列表中选择溶液 2。
- 6 确认以下默认值：
 - ▶ 剂量：250
 - ▶ 吸入速度：250
 - ▶ 分发速度：2000
- 7 选择 Pump（抽水）。
- 8 检查流动槽是否有气泡通过通道以及歧管附近是否有渗漏。
- 9 如果存在过大的气泡：
 - a 检查歧管垫片上是否有阻塞物。
 - b 将吸入速度降低到 100。
 - c 另抽 250 微升水到流动槽中。

在 HiSeq 4000 上暂停或结束运行

结束运行并不提供保存数据或恢复运行的选项。检查运行组件或设置在相邻流动槽上进行的运行时，可能需要暂停运行。

暂停运行

当有需要时，可暂停运行以检查试剂量等运行组件。在正常操作时，无需暂停运行。

当暂停的运行恢复后，RTA2 会自动恢复，以免恢复的运行丢失数据。有关详细信息，请参见 [实时分析（第 33 页）](#)。

- 1 从“Run Overview（运行概览）”屏幕中，选择 **Pause | Normal Pause（暂停|正常暂停）**。
- 2 选择 **Yes（是）** 确认命令。
软件会完成当前的化学反应或成像命令，然后将流动槽置于安全状态。
- 3 选择 **Resume（恢复）** 可恢复运行。

运行期间更换试剂

如果您开始运行时只使用了部分试剂量，则可使用“Change Reagents（更换试剂）”功能暂停运行并补充试剂。



- 1 从“Run Overview（运行概览）”屏幕中，选择 **Pause（暂停）** 打开暂停菜单。
- 2 选择 **Change Reagents（更换试剂）**。
- 3 选择 **Yes（是）** 确认暂停命令。
软件会完成当前的化学反应或成像命令，将流动槽置于安全状态，然后打开“Reagents（试剂）”屏幕。
- 4 输入以下参数：
 - ▶ 新试剂的试剂盒 ID。
 - ▶ 试剂预期可持续使用的循环次数。
- 5 选择 **Next（下一步）** 继续装入试剂。

结束运行

如果 RTA2 被终止，该软件将不会恢复处理，也不会保存运行数据。因此，运行在被停止之后无法恢复。



注意

在 HiSeq 4000 上结束运行这一操作**无法撤销**。

- 1 要结束运行，请选择 **Abort (中止)**。确认或取消该命令。
- 2 确认命令后会打开“Welcome (欢迎)”屏幕。
- 3 继续执行运行后步骤。



注意

如果是在片段 1 期间停止运行的，则可以在 cBot 上执行引物再次杂化。引物再次杂化后，在 HiSeq 4000 上可开始新运行以对流动槽进行测序。

在流动槽 A 和 B 上交错运行

- 1 选择 **Pause | Normal Pause (暂停|正常暂停)**。
- 2 等待软件完成当前化学反应或成像步骤。
系统将自动进入安全状态。
- 3 确认已成功暂停运行。
运行暂停时，会显示“Resume (恢复)”按钮。
- 4 设置新运行。
- 5 装入新的流动槽以执行新运行后，关闭仓门。
- 6 选择 **Start (开始)** 开始新运行。
- 7 在相邻流动槽上，选择 **Resume (恢复)** 可恢复暂停的运行。
软件会自动控制两个流动槽上的化学反应和成像流程。

可能需要进行片段 1 引物再次杂化的情形

如果片段 1 的指标指出簇的数量少、强度低或有其他问题，您可以执行片段 1 引物再次杂化来挽救流动槽。片段 1 引物再次杂化在 cBot 上执行，不会损坏流动槽上的簇。

HiSeq 4000 图形化流动槽上进行的片段 1 引物杂化需要使用以下 Illumina 耗材：

- ▶ HiSeq 3000/4000 cBot 多引物再次杂化试剂盒（商品目录号 GD-305-2001）
- ▶ HiSeq cBot 歧管（商品目录号 SY-401-2015）

有关详细信息，请参见《HiSeq 3000/4000 流动槽上的片段 1 引物再次杂化》（文档号 15058794）。

附录 B 实时分析

实时分析概述	33
实时分析工作流程	34

实时分析概述

HiSeq 4000 借助对实时分析软件 RTA2 的实施。RTA2 在仪器计算机上运行，会从图像提取强度、执行碱基检出，并为碱基检出分配质量分值。RTA2 和控制软件通过 Web HTTP 接口和共享内存文件进行通信。RTA2 一旦被终止，处理过程便无法恢复，并且运行数据也不会保存下来。



注意

RTA2 不会计算逆多路复用性能，因此将不填充 Sequencing Analysis Viewer (SAV) 中的“Index (标签)”选项卡。

输入文件

RTA2 需要以下输入文件：

- ▶ 包含在本地系统内存中的小区图像。
- ▶ RunInfo.xml，在运行开始时由控制软件自动生成。RTA2 从此文件中读取运行名称、循环次数、片段是否带标签以及流动槽上小区的数目。
- ▶ RTA.exe.config，它是 XML 格式的软件配置文件。

RTA2 接收来自控制软件的命令，这些命令包括 RunInfo.xml 文件的位置信息以及是否指定了可选输出文件夹。

输出文件

每个通道的图像在内存中均以小区的形式传递给 RTA2。RTA2 根据这些图像以一组带有质量分值的碱基检出文件和过滤文件的形式生成初级输出。其他文件支持生成初级输出文件。

- ▶ **碱基检出文件** — 对于所分析的每个小区，会为每个循环的每个小区生成一个压缩的碱基检出 (*.bcl) 文件。碱基检出文件包含碱基检出及相关的质量分值。
- ▶ **过滤文件** — 每个小区都会生成过滤信息，这些信息包含在整个运行期间每个小区的一个过滤 (*.filter) 文件中。该过滤文件指定簇是否通过过滤。
- ▶ **簇位置文件** — 一个簇位置 (s.locs) 文件包含流动槽上每个簇的 X、Y 坐标。

初级输出文件用于后续数据分析。请使用 bcl2fastq 转换软件进行逆多重分析和 FASTQ 转换。要转换 HiSeq 4000 中的数据，请使用 bcl2fastqv2.16 或更高版本。有关最新软件版本和下载的信息，请参见 Illumina 网站上的 HiSeq 4000 支持页面。

RTA2 提供作为 InterOp 文件存储的运行质量实时指标。InterOp 文件是二进制文件，其中包含小区、循环和片段级别指标，需要有这些文件才能在 Sequencing Analysis Viewer 中查看指标。要查看 RTA2 生成的指标，请使用 SAV v1.10.2 或更高版本。

有关各输出文件的详细信息，请参见[测序输出文件](#)（第 37 页）。

错误处理

RTA2 会创建日志文件并将其写入 RTALogs 文件夹。错误记录在 *.tsv 文件格式的错误文件中。在处理结束时，以下日志和错误文件会传送到最终输出目的地：

- ▶ *GlobalLog*.tsv 汇总重要运行事件。
- ▶ *LaneNLog*.tsv 列出每个通道的处理事件。
- ▶ *Error*.tsv 列出在运行期间发生的错误。
- ▶ *WarningLog*.tsv 列出在运行期间发生的警告。

数据传输

在整个运行过程中，RTA2 将请求 Run Copy Service 进行数据传输，该软件管理向指定的输出文件夹位置的传输。如果使用 BaseSpace Sequence Hub，则将由 BaseSpace Broker 管理向 BaseSpace Sequence Hub 的数据传输。网络连接中断时，RTA2 将继续处理并在本地写入数据。连接恢复后，数据传输随即恢复。

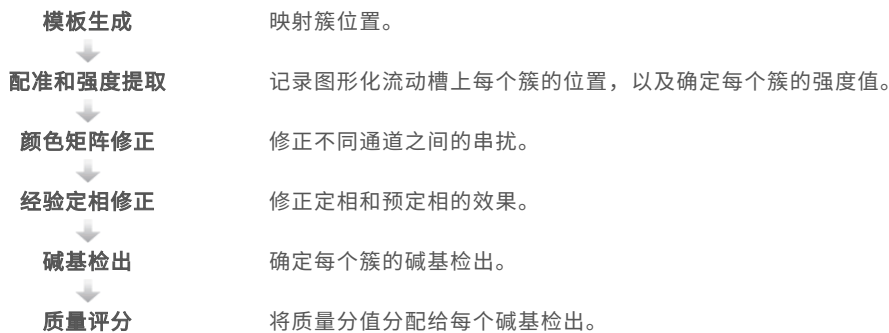


注意

确保您的网络连接符合将运行数据发送到 BaseSpace Sequence Hub 所需的最低要求。有关详细信息，请参见场地准备指南。

处理完毕，RTA2 将创建名为 RTAComplete.txt 的标记文件。此文件生成后，数据传送即告完成。屏幕底部的传感器指示器将显示传输状态。有关详细信息，请参见[活动和传感器指示器](#)（第 4 页）。

实时分析工作流程



模板生成

模板生成会使用 X 和 Y 坐标定义小区中每个簇的位置。模板用作配准和强度提取的后续步骤的参考。

由于图形化流动槽的阵列安排，簇位置可通过行数、列数以及纳米井之间的距离预先确定。有关详细信息，请参见[图形化流动槽](#)（第 6 页）。

簇位置会写入整个运行的一个簇位置 (s.locs) 文件。

配准和强度提取

配准和强度提取在生成簇位置的模板之后开始。

- ▶ 配准会将簇的模板位置转换为四色通道每个通道中图像上的位置。
- ▶ 强度提取用于确定给定图像的模板中每个簇的强度值。

如果某次循环中有任何图像的配准失败，则在该循环中不会为该小区生成碱基检出。使用 SAV 可检查缩略图图像并标识配准失败的图像。

颜色矩阵修正

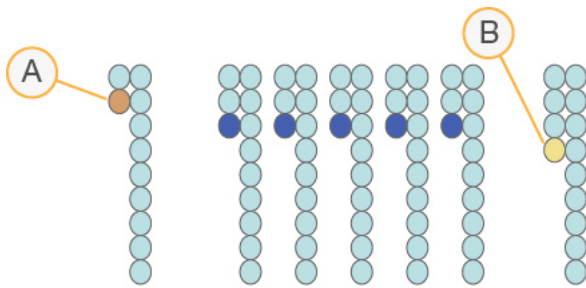
进行配准和强度提取之后，RTA2 会修正不同通道之间的串扰。例如，若某个簇在 C 通道中显示强度，同时某些强度也显示在 A 通道中，则会发生串扰。通过使用 4×4 颜色矩阵，RTA2 可生成串扰较少或无串扰的矩阵修正强度，从而平衡颜色通道之间总体强度的差异。

经验定相修正

在测序反应期间，簇中的每个 DNA 链在每次循环中会扩展一个碱基。定相和预定相在 DNA 链与当前结合循环异相时发生。

- ▶ 当碱基落在后面时，便会发生定相。
- ▶ 当碱基跳到前面时，便会发生预定相。

图 14 定相和预定相



- A 具有定相碱基的片段
- B 具有预定相碱基的片段

RTA2 将使用经验定相修正算法来修正定相和预定相的效果，这可最大限度确保整个运行期间每次循环的数据质量。

碱基检出

为串扰、定相和预定相修正原始强度之后，强度最亮的通道就是该循环中该簇的碱基检出。在使用 RTA2 的 HiSeq 4000 上，碱基检出于第 3 次循环之后开始。

碱基检出用于确定特定循环中给定小区的每个簇的碱基（A、C、G 或 T）。碱基检出保存到碱基检出 (*.bcl) 文件中，这些文件是二进制文件，每个检出和质量分值占 1 个字节。每个碱基检出文件均包含碱基检出及碱基检出质量分值。要实现碱基检出，簇必须先通过纯度过滤。未通过过滤或因无图像或图像无法配准而无法检出的簇会标记为无检出。无检出以 (N) 表示。

簇通过过滤

在对片段 1 执行前 25 次循环期间，纯度过滤器会从分析结果中去除低质量簇。如果在前 25 次循环中，纯度值低于 0.6 的碱基检出不超过 1 个，簇将通过过滤。纯度定义为最亮的碱基强度与最亮和第二亮的碱基强度之和的比。通过过滤的簇的百分比在分析报告中以 %PF 表示。

HiSeq 4000 图形化流动槽含有有序簇阵列。原始簇计数中既不含簇的空井，也有存在多个测序的多克隆井，但它们都无法通过过滤。因此，图形化流动槽上有序阵列的簇通过过滤百分比相对较低。

图 15 空井和多克隆井（包含在原始簇计数中）

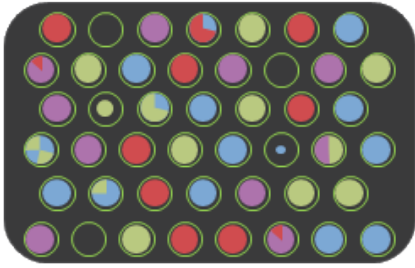
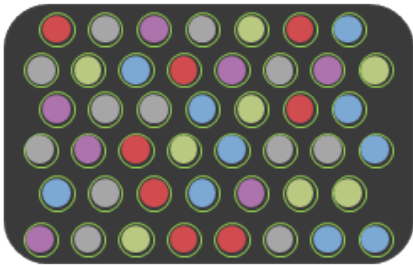


图 16 包含非 PF 簇的井（显示为灰色）



质量评分

质量分值（或 Q-score）是对碱基检出不正确概率的预测。Q-score 越高，表示碱基检出的质量越高，正确率也越高。

Q-score 是一种传达小错误概率的简单方法。Q(X) 代表质量分值，其中 X 是分值。下表显示了质量分值与错误概率之间的关系。

Q-Score Q(X)	错误概率
Q40	0.0001（万分之一）
Q30	0.001（千分之一）
Q20	0.01（百分之一）
Q10	0.1（十分之一）



注意

质量评分基于 Phred 算法的修改版本计算。

质量评分会计算每个碱基检出的一组预测因素，然后使用预测因素值在质量表中查找 Q-score。创建质量表的目的是根据特定的测序平台和化学反应版本配置为生成的运行提供最准确的质量预测。

确定 Q-score 之后，结果会记录在碱基检出文件中。

Q-Score 分组

RTA2 会将质量分值分成几个特定范围或不同分组，并为每个范围分配值。Q-score 分组可以在不影响下游应用程序的准确性或性能的情况下大幅降低所需的存储空间。

Q-score 分组对于分析过程的效率以及 HiSeq 4000 高输出模式下的数据传输有着积极的作用。因为该压缩算法能够更有效地压缩文件，所以生成的 *.bcl 文件很小。写入仪器计算机并传输到网络位置的数据变得更少，文件复制速度变得更快。

附录 C 输出文件

测序输出文件	37
输出文件夹结构	37
小区编号	38

测序输出文件

文件类型	文件描述、位置和名称
碱基检出文件	所分析的每个小区均纳入一个碱基检出文件中，该文件包含碱基检出和已编码的质量分值。 Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — 对于每个通道，文件均存储在每个循环的文件夹中。 s_[通道]_[小区].bcl.gz ，其中通道为一位数的通道编号，小区为四位数的小区编号。系统将使用 gzip 压缩方式来压缩碱基检出文件。
簇位置文件	对于每个小区，1 个簇位置文件包含每个簇的 XY 坐标。簇位置文件是模板生成的成果。 Data\Intensities — 运行的一个文件存储在 Intensities 文件夹中。 s.locs
过滤文件	过滤文件指定簇是否通过过滤。过滤文件在第 26 次循环时使用前 25 次循环的数据生成。 Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] — 文件存储在每个通道和小区的各文件夹中。 s_[通道]_[小区].filter
InterOp 文件	用于 Sequencing Analysis Viewer 的二进制报告文件。InterOp 文件会在整个运行期间加以更新。 InterOp 文件夹
实时分析配置文件	实时分析配置文件创建于运行开始时，列出运行的设置。 [根文件夹] RTAConfiguration.xml
运行信息文件	列出运行名称、每个片段中的循环次数、片段是否带标签以及流动槽上测绘带和小区的数量。运行信息文件创建于运行开始时。 [根文件夹] RunInfo.xml
缩略图文件	在成像期间，每次循环时每个测绘带中的各通道和小区的缩略图图像。 Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1] — 文件存储在每个通道的各文件夹中，每次循环一个子文件夹。 s_[通道]_[小区]_[通道].jpg — 小区以四位数编号表示，这些数字分别代表表面、测绘带和小区。 请参见 小区编号 (第 38 页)。

输出文件夹结构

- 📁 Config — 运行的配置设置。
- 📁 Data
 - 📁 Intensities
 - 📁 BaseCalls
 - 📁 L00[X] — 各通道的碱基检出文件，每次循环累积在 1 个文件中。
 - 📄 s.locs
 - 📁 Images
 - 📁 Focus
 - 📁 L00[X] — 各通道的聚焦图像。
- 📁 InterOp — Sequencing Analysis Viewer 使用的二进制文件。
- 📁 Logs — 描述运行事件的日志文件。
- 📁 Recipe — 以试剂夹盒 ID 命名的运行特定配方文件。

📁 RTALogs — 描述 RTA2 事件的日志文件。

📁 Thumbnail_Images — 小区子集中 9 个位置的缩略图（为每次循环和每个碱基生成）。

📄 RTAConfiguration.xml

📄 RunInfo.xml

📄 RunParameters.xml

运行文件夹名称和路径

运行文件夹是存放测序运行的输出的根文件夹。在运行设置期间，软件会提示您输入运行文件夹的路径。默认情况下，该文件夹使用以下格式命名：

YYMMDD_<计算机名称>_<运行编号>_<流动槽所处方位><流动槽 ID>

例如： 110114_SN106_0716_A90095ACXX

仪器每执行一次测序运行，运行编号便会递增 1。在运行设置步骤中输入的流动槽所处方位（A 或 B）和流动槽 ID 会附加到运行文件夹名称中。

运行文件夹会写入到运行设置期间所指定的输出路径中。流动槽 A 的临时运行文件夹会写入到 D: 盘，流动槽 B 的临时运行文件夹会写入到 E: 盘。

小区编号

每次循环中，HiSeq 3000/4000 图形化流动槽会在每个通道的顶面和底面的 112 个小区内成像。8 个通道中，每一个通道都有 2 个测绘带，每个测绘带有 28 个小区。小区根据位置编号。



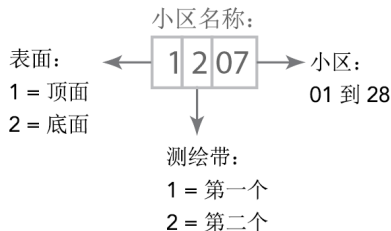
注意

测绘带是流动槽通道内的一条小区。

小区名称是一个 4 位数字，代表其在流动槽上的位置。

- ▶ 第 1 位数表示表面：
 - ▶ 1 表示顶面
 - ▶ 2 表示底面
- ▶ 第 2 位数表示测绘带：
 - ▶ 1 表示第 1 个测绘带
 - ▶ 2 表示第 2 个测绘带
- ▶ 最后 2 位表示小区，从 01 到 28。小区编号从 01 开始（位于流动槽的输出端）一直到 28 结束（位于输入端）。

图 17 小区编号



此示例中的小区指流动槽顶面第 2 个测绘带上的第 7 个小区。

索引

A

安全 1
安装, 射流检查 30

B

bcl2fastq, 版本 33
BaseSpace Broker 34
BaseSpace Enterprise 8
BaseSpace Onsite Sequence Hub
 集成 1
 连接运行 13
 域配置 8
BaseSpace Sequence Hub
 集成 1
 连接运行 13
 数据传输 34
 图标 5
 样品表 14
 域配置 8
帮助
 SAV 22
 成簇 10
 文档 1
 引物再次杂化 32
帮助, 技术 43
保存缩略图 13
报告, 第一次碱基结合 22
比对 PhiX 14
标记文件 34
标签方案 14
标签选项 14

C

菜单选项窗口 7
仓室 1
测绘带 13, 38
测序步骤, 概述 12
 RTA 34
测序耗材 5, 10
查找簇 34
场地准备 1, 34
橙色流动槽拉杆 30
初始化软件 7
初始化软件, 故障诊断 30
传感器 4

传感器指示器

 BaseSpace Sequence Hub 5
 Run Copy Service 4
串扰 35
纯度过滤 35
簇位置 6, 34
簇阵列 35
簇质量 35
存储容量
 优化 36
存储维护清洗液 24, 26
错误 34
 概率 36
错误日志 30, 34

D

打开仪器 7
第一次碱基报告 14
第一次碱基结合 22
垫片 24
垫片, 故障诊断 30
定位销 17, 20
定相 35
多克隆井 35

F

FASTQ 转换 33
放置流动槽 17, 20
废弃管线 19, 26-27

G

光学模块 2

H

HCS 3
 错误日志 30
 打开 7
 视图选项 7
耗材
 Illumina 测序试剂盒 5
 用户自备 9
合规性 1
化学反应步骤, 监控 21
化学反应设置 14

I

Illumina 预防性监控服务 8
InterOp 文件 33, 37

J

技术协助 43
碱基检出文件 35
交叉污染, 防止 25
解决 4
警报 4
 描述 3

K

可用磁盘空间 23
客户支持 43

L

LIMS
 服务器 8
 设置 8
连接 USB 电缆 7
临时文件夹 38
流动槽
 成像 38
 簇阵列 34-35
 定位 3
 放置 17, 20
 检查 18, 21
 流动槽 ID 13
 填装 17
 图形化 6
流动槽拉杆 2
 橙色 30
 闪烁 30
流动槽拉杆闪烁 30
流动槽设置屏幕 13
流动槽所处方位 2-3, 38
漏斗盖 15

M

命名
 小区 38
 运行文件夹 8, 38
默认文件夹位置 8

N

纳米井 6
内存文件 33
逆多重分析 33

P

PF % 35
PhiX 比对 14
Phred 算法 36
配方, 自定义 14
配置文件 37
配准, 故障诊断 34
配准失败 30
配准失败, 片段 1 30
片段 1 故障诊断 30, 32

Q

Q-score 36
气泡 18, 21
强度, 监控 21
强度值 34
清空磁盘空间 23
清洗
 好处 24
 水洗与维护清洗 24
 维护清洗液 24, 26
 系统要求 22, 24

R

RTA 3
RTA2
 结束运行 32
 输入文件 33
 终止 33
Run Copy Service 4, 34
Run Copy Service 图标 4
日志文件 37
软件
 功能 1
 故障诊断 30
 已安装应用程序 3

S

SAV 3
 InterOp 文件 37
 版本 33
 标签选项卡 33
 文档 22
 SBS 试剂盒 5
 SBS 试剂位置 15
 商品目录号
 Illumina 再次杂化试剂盒 32
 歧管 32
 用户自备的耗材 9
 设置, 软件 7
 射流
 维护 22
 射流系统 2
 故障诊断 30
 进入 2
 维护 24
 渗漏 18, 21
 实验名称 13
 实验室设置 1, 34
 试剂
 测序 10
 处理运行后 22
 记录试剂盒 ID 15
 在运行期间更换 31
 制备 10
 试剂冷却器, 温度 3
 试剂屏幕 15
 试剂托架 3
 试剂位置
 SBS 试剂托架 15
 输出盘 23
 输出文件夹
 结构 37
 位置 8, 13
 输送剂量
 水洗 23
 填装 19
 维护清洗 26-27
 数据
 Illumina 预防性 8
 发送到 Illumina 8
 压缩 36
 转换 33
 数据传输 23, 34
 数据传输状态
 BaseSpace Sequence Hub 5
 Run Copy Service 4

数据丢失 32-33
 水洗
 持续时间和频率 22
 输送剂量 23
 缩略图 13, 37
 所需磁盘空间 23

T

填装
 可选设置 15
 填装废液 19
 填装流动槽 17
 填装准备 19
 通道
 流动槽 14, 38
 图标 3-4
 数据传输状态 4
 图像, 保存 13
 图形化流动槽 1, 6, 34
 托架, 试剂 3

U

USB 电缆, 连接 7

W

网络连接 34
 维护, 预防性 24
 维护清洗 24
 频率 24
 输送剂量 26-27
 重复使用清洗液 24, 26
 重复使用溶液 25
 维护清洗液 24, 26
 位置, 试剂
 SBS 15
 温度, 试剂冷却器 3
 文档 1, 43
 文件夹结构 37
 文件夹位置 8, 37-38
 文件位置 37
 无检出 (N) 35

X

闲置, 可接受持续时间 28
 相邻运行 32
 小区 33, 38

- 循环次数
 - 执行的值与输入的值 14

Y

- 颜色, 状态栏 2
- 样品表, 需要 14
- 应用程序, 已安装 3
- 硬件功能 1
- 预定相 35
- 预防性维护 24
- 预期剂量
 - 水洗 23
 - 填装 19
 - 维护清洗 26-27
- 域, 配置 8
- 远程监控 13
- 运行参数, 复查 15
- 运行概览屏幕 21
- 运行后清洗 22
- 运行设置
 - 剩余循环次数 15
 - 填装试剂 15
- 运行文件夹, 临时 38
- 运行文件夹位置 38
- 运行信息文件 37
- 运行指标 21, 33

Z

- 再次杂化 32
- 在线支持 1
- 在运行期间更换试剂 31
- 暂存盘 23
- 暂停选项 31-32
- 真空系统 2
- 支持页面 1
- 质量表 36
- 质量分值
 - 监控 21
- 重复使用维护清洗液 25
- 重新启动仪器 29
- 转换数据 33
- 状态栏颜色 2
- 自定义配方 14

技术协助

如需技术协助，请与 Illumina 技术支持部门联系。

网站：www.illumina.com
电子邮件：techsupport@illumina.com

Illumina 客户支持部门电话号码

地区	免费电话	区域电话
北美	+1.800.809.4566	
爱尔兰	+353 1800936608	+353 016950506
奥地利	+43 800006249	+43 19286540
澳大利亚	+1.800.775.688	
比利时	+32 80077160	+32 34002973
丹麦	+45 80820183	+45 89871156
德国	+49 8001014940	+49 8938035677
法国	+33 805102193	+33 170770446
芬兰	+358 800918363	+358 974790110
荷兰	+31 8000222493	+31 207132960
挪威	+47 800 16836	+47 21939693
日本	0800.111.5011	
瑞典	+46 850619671	+46 200883979
瑞士	+41 565800000	+41 800200442
西班牙	+34 911899417	+34 800300143
新加坡	+1.800.579.2745	
新西兰	0800.451.650	
意大利	+39 800985513	+39 236003759
英国	+44 8000126019	+44 2073057197
中国	400.066.5835	
中国台湾	00806651752	
中国香港	800960230	
其他国家/地区	+44.1799.534000	

安全数据表 (safety data sheet, 简称 SDS) — 可通过 Illumina 网站 (support.illumina.com/sds.html) 获取。

产品文档 — 可通过 Illumina 网站下载 PDF 版本。请转到 support.illumina.com，选择一个产品，然后选择 Documentation & Literature (文档与文献)。

20015630

文档号 15066496 v05 CHS

材料号 20015630



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A.

+1.800.809.ILMN (4566)

+1.858.202.4566 (北美洲以外地区)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

仅供研究使用，不可用于诊断过程。

© 2018 Illumina, Inc. 保留所有权利。

illumina®