

Ce document et son contenu sont exclusifs à Illumina, Inc. et ses sociétés affiliées (« Illumina »), et sont exclusivement destinés à l'usage contractuel de son client dans le cadre de l'utilisation du ou des produits décrits dans les présentes et ne peuvent servir à aucune autre fin. Ce document et son contenu ne seront utilisés ou distribués à aucune autre fin et ne seront communiqués, divulgués ou reproduits d'aucune façon sans le consentement écrit préalable d'Illumina. Illumina ne cède aucune licence en vertu de son brevet, de sa marque de commerce, de ses droits d'auteur ou de ses droits traditionnels ni des droits similaires d'un tiers quelconque par ce document.

Les instructions contenues dans ce document doivent être suivies strictement et explicitement par un personnel qualifié et adéquatement formé de façon à assurer l'utilisation correcte et sûre du ou des produits décrits dans les présentes. Le contenu intégral de ce document doit être lu et compris avant l'utilisation de ce ou ces produits.

SI UN UTILISATEUR NE LIT PAS COMPLÈTEMENT ET NE SUIT PAS EXPLICITEMENT TOUTES LES INSTRUCTIONS CONTENUES DANS LES PRÉSENTES, IL RISQUE DE CAUSER DES DOMMAGES AU(X) PRODUIT(S), DES BLESSURES, NOTAMMENT AUX UTILISATEURS ET À D'AUTRES PERSONNES, AINSI QUE D'AUTRES DOMMAGES MATÉRIELS, ANNULANT AUSSI TOUTE GARANTIE S'APPLIQUANT AU(X) PRODUIT(S).

ILLUMINA DÉCLINE TOUTE RESPONSABILITÉ DÉCOULANT DE L'UTILISATION INAPPROPRIÉE DU OU DES PRODUITS DÉCRITS DANS LES PRÉSENTES (Y COMPRIS LEURS COMPOSANTES ET LE LOGICIEL).

© 2018 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

Toutes les marques de commerce sont la propriété d'Illumina, Inc. ou de leurs détenteurs respectifs. Pour obtenir des renseignements sur les marques de commerce, consultez la page www.illumina.com/company/legal.html.

Historique des révisions

| Document | Date | Description des modifications |
|--|--------------|---|
| Support n° 20000451 Document n° 15035786 v02 | Mars 2018 | <p>Ajout de cBot 2 comme instrument de génération d'amplifiats compatible. Il est possible d'exécuter l'étape de la génération d'amplifiats pour une analyse à débit élevée et pour une analyse rapide sur les instruments cBot 2 ou cBot.</p> <p>Ajout de Custom Protocol Selector à la section Ressources supplémentaires.</p> <p>Ajout de renseignements sur le service de surveillance Illumina Proactive à la section Afficher et envoyer les données de l'instrument.</p> <p>Ajout d'une remarque concernant la fréquence approximative du renouvellement des tubes et des flacons de lavage.</p> <p>Remplacement du nom du logiciel d'analyse par BaseSpace Sequence Hub.</p> <p>Mise à jour des renseignements sur les réactifs pour remplacer le HP12 par le HP14.</p> <p>Mise à jour des instructions relatives au démarrage de l'instrument :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Retrait du nom d'utilisateur et du mot de passe par défaut nécessaires pour la connexion au système d'exploitation. Illumina recommande l'utilisation d'identifiants spécifiques au site. • Le chargement du système doit se faire avant la connexion au système d'exploitation et non après. • Augmentation de la durée nécessaire à la configuration des dispositifs de l'instrument et à l'initialisation du lecteur DoNotEject, qui passe d'une à trois minutes. • Ajout d'une remarque : les disques durs doivent être vides pour un fonctionnement correct. <p>Retrait de la recommandation d'effectuer un lavage de maintenance au lieu d'un lavage à l'eau après une analyse à débit élevée.</p> <p>Retrait de volumes distribués erronés pour le lavage à l'eau après l'analyse rapide.</p> <p>Correction du format de dénomination du fichier d'analyse pour inclure le côté de la Flow Cell.</p> <p>Mise à jour des procédures de lavage de maintenance.</p> |
| Support n° 20000451 Document n° 15035786 v01 | Octobre 2015 | <p>Ajout de directives pour la préparation des réactifs SBS, réactifs d'indexage, réactifs appariés et réactifs de génération d'amplifiats.</p> <p>Ajout de renseignements sur BaseSpace Onsite.</p> <p>Ajout de recommandations relatives au service de maintenance préventive annuelle.</p> |

| Document | Date | Description des modifications |
|--------------------|---------------|--|
| N° 15035786 Rév. D | Novembre 2014 | <p>Mise à jour des descriptions de logiciel pour la version 2.2.58. du logiciel de commande HiSeq.</p> <p>Mise à jour du flux de travail du mode Rapid Run (Analyse rapide). Compatibilité avec la chimie HiSeq Rapid v2.</p> <p>Remplacement du lavage de maintenance au NaOH par le lavage de maintenance au Tween 20 et au ProClin 300, avec notamment des renseignements relatifs à la préparation, au stockage et à l'élimination de la solution de lavage de maintenance.</p> <p>Mise à jour des descriptions du lavage de maintenance et du lavage à l'eau pour préciser qu'un lavage à l'eau est nécessaire après une analyse.</p> <p>Ajout de descriptions du flux de travail, des fichiers d'entrée et de sortie, du traitement des erreurs et de la notation de la qualité au chapitre Real-Time Analysis.</p> <p>Mise à jour du numéro de référence des lingettes alcoolisées VWR. Nouveau numéro : 95041-714.</p> <p>Mise à jour de l'URL pour les fiches signalétiques (SDS) : support.illumina.com/sds.html.</p> |
| N° 15035786 Rév. C | Avril 2014 | <p>Mise à jour des descriptions du logiciel de commande HiSeq version 2.2. Inclusion du mode de débit élevé HiSeq v4, suppression de la ligne de contrôle optionnelle, compartimentage par score de qualité par défaut et option permettant d'utiliser différents programmes d'indexage dans chaque ligne.</p> <p>Ajout du flux de travail HiSeq v4 pour une utilisation avec la chimie HiSeq v4.</p> <p>Ajout du calcul pour le volume d'amorçage SBS total.</p> |
| N° 15035786 Rév. B | Novembre 2013 | <p>Suppression des instructions de préparation des réactifs. Pour obtenir les instructions sur la préparation des réactifs, dont les renseignements sur différents primers de séquençage, consultez la documentation de la trousse associée.</p> <p>Réactifs suivants remplacés :</p> <ul style="list-style-type: none"> • RMR pour RMX |
| N° 15035786 Rév. A | Octobre 2012 | Publication originale. |

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Historique des révisions | iii |
| Chapitre 1 Vue d'ensemble | 1 |
| Introduction | 1 |
| Ressources supplémentaires | 1 |
| Composants de l'instrument | 2 |
| Présentation des consommables pour le séquençage | 6 |
| Chapitre 2 Pour commencer | 8 |
| Démarrer le système HiSeq 2500 | 8 |
| Personnaliser les paramètres du système | 8 |
| Afficher et envoyer les données de l'instrument | 9 |
| Consommables fournis par l'utilisateur | 10 |
| Chapitre 3 Séquençage en mode HiSeq v4 | 12 |
| Introduction | 12 |
| Flux de travail de séquençage HiSeq v4 | 13 |
| Préparer les réactifs | 13 |
| Saisir les paramètres de l'analyse | 15 |
| Charger et amorcer les réactifs | 18 |
| Charger la Flow Cell de séquençage | 23 |
| Surveiller l'analyse | 26 |
| Décharger les réactifs | 27 |
| Réaliser un lavage à l'eau | 27 |
| Chapitre 4 Séquençage en mode TruSeq v3 | 29 |
| Introduction | 29 |
| Flux de travail de séquençage TruSeq v3 | 30 |
| Préparer les réactifs pour la lecture 1 | 31 |
| Saisir les paramètres de l'analyse | 35 |
| Charger et amorcer les réactifs | 38 |
| Charger la Flow Cell de séquençage | 42 |
| Surveiller l'analyse | 45 |
| Préparer les réactifs pour la lecture 2 | 46 |
| Décharger les réactifs | 49 |
| Réaliser un lavage à l'eau | 49 |
| Chapitre 5 Séquençage en mode d'analyse rapide | 51 |
| Introduction | 51 |
| Flux de travail de séquençage en mode d'analyse rapide | 52 |
| Préparer les réactifs | 52 |
| Effectuer une vérification de volume | 54 |
| Saisir les paramètres de l'analyse | 54 |

| | |
|--|------------|
| Charger et amorcer les réactifs | 58 |
| Charger la Flow Cell de séquençage | 62 |
| Surveiller l'analyse | 65 |
| Décharger les réactifs | 66 |
| Réaliser un lavage à l'eau | 66 |
| Chapitre 6 Maintenance | 68 |
| Introduction | 68 |
| Réaliser un lavage de maintenance | 68 |
| Basculer entre les modes de séquençage | 73 |
| Laisser l'instrument inactif | 74 |
| Arrêter l'instrument | 74 |
| Annexe A Dépannage | 76 |
| Problèmes possibles de configuration de l'analyse | 76 |
| Réaliser une vérification de la fluidique | 76 |
| BaseSpace n'est pas disponible | 77 |
| Arrêter et reprendre une analyse | 77 |
| Interrompre une analyse | 80 |
| Échelonner les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B | 80 |
| Diviser les troussees SBS | 81 |
| Réhybridation du primer | 82 |
| Annexe B Real-Time Analysis | 84 |
| Présentation de Real-Time Analysis | 84 |
| Flux de travail de Real-Time Analysis | 85 |
| Surveiller les indicateurs de l'analyse | 88 |
| Annexe C Fichiers et dossiers de sortie | 90 |
| Fichiers de sortie de séquençage | 90 |
| Structure du dossier de sortie | 91 |
| Numérotation des plaques | 92 |
| Images miniatures | 92 |
| Index | 94 |
| Assistance technique | 100 |

Chapitre 1 Vue d'ensemble

| | |
|--|---|
| Introduction | 1 |
| Ressources supplémentaires | 1 |
| Composants de l'instrument | 2 |
| Présentation des consommables pour le séquençage | 6 |

Introduction

Le système HiSeq^{MD} 2500 procure la puissance et l'efficacité requises pour la génomique à grande échelle. Il associe des techniques novatrices et la technologie SBS éprouvée pour établir de nouveaux standards de rendement, de simplicité et de rentabilité. Deux options à débit élevé procurent la meilleure profondeur de couverture qui soit et une analyse rapide fournit des résultats en peu de temps.

Fonctionnalités

- ▶ **Imagerie à double surface** : le système HiSeq 2500 utilise un système d'épifluorescence à quatre caméras avec une technologie de numérisation de pointe pour permettre une imagerie à double surface.
- ▶ **Double Flow Cell** : le système HiSeq 2500 est un système à double Flow Cell, qui permet le séquençage d'une seule Flow Cell ou de deux Flow Cell avec des longueurs de séquence différentes simultanément.
- ▶ **Génération d'amplifiats sur l'instrument** : le système HiSeq 2500 offre le mode d'analyse rapide, qui comprend la génération d'amplifiats sur l'instrument.
- ▶ **Réfrigérant pour réactifs haute capacité** : le compartiment de réactifs est un réfrigérant haute capacité qui contient suffisamment de réactifs pour la réalisation de toute l'analyse de séquençage.
- ▶ **Fluidique intégrée pour les analyses à lectures appariées** : la fluidique appariée intégrée fournit des réactifs à partir du compartiment de réactifs vers la Flow Cell pour la resynthèse de la lecture 2 et le séquençage indexé.
- ▶ **Options de commande de l'interface** : l'interface logicielle de l'instrument permet de choisir des options relatives à la configuration de l'analyse et au fonctionnement de l'instrument. Utilisez l'écran tactile ou le clavier intégré pour saisir votre choix.
- ▶ **Définition des bases en temps réel** : le logiciel de l'instrument extrait des intensités des images et réalise des définitions des bases dont la qualité est notée sur l'ordinateur de l'instrument. Cette méthode permet de surveiller les indicateurs de qualité lors de l'analyse et de gagner du temps lors des analyses de données ultérieures.
L'analyse en aval des données de séquençage peut être effectuée avec le logiciel d'analyse d'Illumina ou avec un logiciel tiers sur Illumina Compute, Illumina BaseSpace ou une infrastructure personnalisée.
- ▶ **Intégration de BaseSpace^{MD} Sequence Hub** : le flux de travail de séquençage est intégré à BaseSpace Sequence Hub, l'environnement informatique consacré à la génomique d'Illumina pour l'analyse des données, leur stockage et leur partage. Au cours de l'analyse, les fichiers de sortie sont transférés en temps réel vers BaseSpace Sequence Hub ou BaseSpace Onsite Sequence Hub.

Ressources supplémentaires

La documentation suivante est disponible en téléchargement sur le site Web d'Illumina. Consultez régulièrement les pages d'assistance pour voir la plus récente version de ces documents.

| Ressource | Description |
|--|--|
| Custom Protocol Selector | Assistant pour la génération de la documentation personnalisée dans son intégralité en fonction de la méthode de préparation des librairies, des paramètres d'analyse et de la méthode d'analyse utilisée pour le séquençage. |
| <i>Guide de préparation du site des systèmes HiSeq 2500, 1500 et 2000 (document n° 15006407)</i> | Fournit les spécifications relatives à l'espace du laboratoire, les exigences électriques et les considérations environnementales. |
| <i>Guide de sécurité et de conformité du système HiSeq 2500 (document n° 1000000000651)</i> | Fournit des renseignements concernant l'étiquetage de l'instrument, les certifications de conformité et les questions de sécurité. |
| <i>Guide de dénaturation et de dilution de librairies des systèmes HiSeq et GAllx (document n° 15050107)</i> | Fournit des instructions pour la dénaturation et la dilution des librairies préparées pour une analyse de séquençage et la préparation d'une librairie de contrôle PhiX. Cette étape s'applique à la plupart des types de librairie. |

Consultez la page d'aide du système HiSeq 2500 sur le site Web d'Illumina pour accéder à la documentation, aux téléchargements de logiciels, à la formation en ligne et aux foires aux questions.

Composants de l'instrument

Le système HiSeq 2500 est constitué de l'instrument, de l'écran, de l'ordinateur de commande de l'instrument et des accessoires, comme un clavier et une souris ainsi qu'un lecteur de code à barres. L'instrument compte quatre compartiments principaux : le module optique, le compartiment de Flow Cell, le compartiment fluïdique et le compartiment de réactifs. Une barre d'état éclairée indique l'état de fonctionnement de l'instrument.

Figure 1 Composants externes



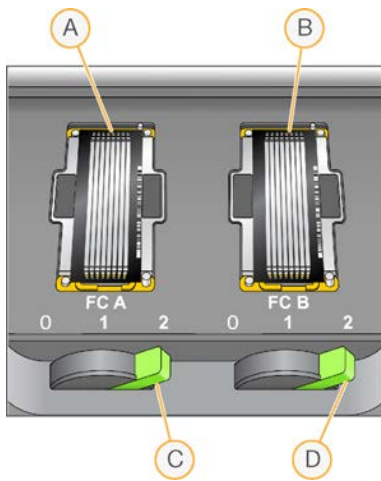
- A **Module optique** : contient les composants optiques qui permettent l'imagerie à double surface de la Flow Cell et l'imagerie simultanée de A, C, G et T en utilisant l'épifluorescence. Le faisceau laser d'excitation passe à travers l'objectif et la fluorescence est recueillie simultanément à travers le même objectif.
- B **Compartiment de la Flow Cell et station de chargement du modèle** : contient la platine de la Flow Cell commandée par dépression, qui maintient la Flow Cell en place pendant les analyses de séquençage. En mode d'analyse rapide, la station de chargement du modèle transfère les librairies vers la Flow Cell pour la génération d'amplifiats sur l'instrument.

- C **Compartment fluide** : contient les pompes fluidiques qui envoient les réactifs à la Flow Cell, puis au conteneur à déchets.
- D **Barre d'état** : utilise trois couleurs comme indicateurs de l'état de l'instrument. Le bleu indique que l'instrument effectue une analyse, l'orange, qu'il nécessite une intervention, et le vert, que l'instrument est prêt à commencer l'analyse suivante.
- E **Compartment de réactifs** : contient les supports des réactifs requis pour les analyses de séquençage et la solution de lavage pour les lavages de l'instrument.

Compartment de Flow Cell

Le compartiment de Flow Cell contient la platine de Flow Cell, les stations thermiques, le système à vide et les connexions fluidiques vers chacune des Flow Cell.

Figure 2 Platine de Flow Cell avec deux Flow Cells



- A Flow Cell A
- B Flow Cell B
- C Levier de Flow Cell A
- D Levier de Flow Cell B

La Flow Cell A est située sur la gauche, la Flow Cell B sur la droite. Chaque Flow Cell est positionnée sur la platine de Flow Cell, qui entre et ressort du champ d'action du module optique sur instruction du logiciel de commande. Pour l'ouverture du compartiment de Flow Cell et le chargement ou le retrait d'une Flow Cell, la platine de Flow Cell doit être dans sa position la plus avancée.

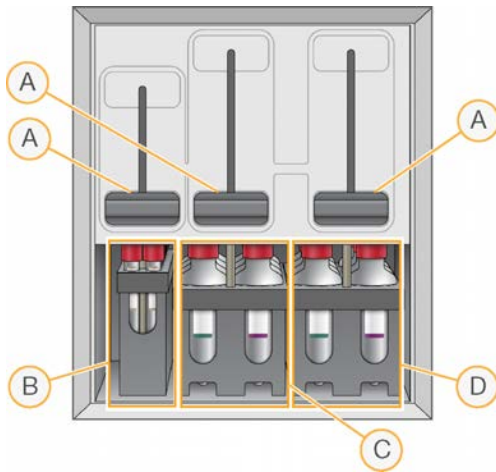
La Flow Cell est placée sur le portoir de Flow Cell avec les ports d'entrée et de sortie orientés vers le bas. La Flow Cell est maintenue en place grâce au système de décompression sous le portoir de Flow Cell. Le levier de Flow Cell éclairé en face de chaque portoir de Flow Cell commande cette dépression. Le levier de Flow Cell devient vert lorsque le joint de décompression est hermétique.

Compartment de réactifs

Le compartiment de réactifs est un réfrigérateur pour réactifs haute capacité qui contient trois supports de réactifs : deux pour les réactifs SBS et un pour les réactifs de génération d'amplifiats, d'indexage et appariés. Les poignées du dispositif d'aspiration abaissent les dispositifs d'aspiration dans les flacons de réactif.

- ▶ **Supports de réactifs SBS** : contiennent des flacons coniques de 250 ml. Le support de réactifs de la Flow Cell A se trouve dans la position centrale et le support de la Flow Cell B est situé dans la position la plus à droite. Chaque support de réactifs présente des positions numérotées qui correspondent à des branchements sur la soupape du sélecteur de réactifs interne.
- ▶ **Support de réactifs de génération d'amplifiats, d'indexage et appariés** : situé dans la position de gauche. Il comporte deux rangées de positions numérotées dans lesquelles se trouvent des flacons coniques de 15 ml contenant les réactifs appariés et d'indexage. La rangée de gauche est destinée à la Flow Cell A, et la rangée de droite, à la Flow Cell B.
- ▶ **Réfrigérant pour réactifs**: le réfrigérant pour réactifs accueille les supports de réactifs et se maintient à une température interne de 2 °C à 8 °C.

Figure 3 Compartiment de réactifs



- A Poignées des dispositifs d'aspiration
- B Support de réactifs pour les réactifs de génération d'amplifiats, d'indexage et appariés
- C Support de réactif pour les réactifs SBS destinés à la Flow Cell A
- D Support de réactif pour les réactifs SBS destinés à la Flow Cell B






Logiciels de l'instrument HiSeq 2500

Trois applications logicielles sont installées sur l'ordinateur de l'instrument :

- ▶ **Logiciel de commande HiSeq 2500** : l'interface du HiSeq Control Software (HCS) vous guide tout au long des étapes de configuration d'une analyse de séquençage. Au cours de l'analyse, le logiciel de commande active le matériel de l'instrument, contrôle la fluidique, définit les températures et présente un récapitulatif visuel des statistiques de qualité.
- ▶ **Logiciel Real-Time Analysis** : intégré au logiciel de commande, le logiciel Real-Time Analysis (RTA) effectue la définition des bases et associe un score de qualité à chaque base pour chaque cycle. Pour plus de renseignements, consultez la section *Real-Time Analysis*, page 84.
- ▶ **Logiciel Sequencing Analysis Viewer** : le visualiseur d'analyse de séquençage (SAV) fournit des statistiques détaillées de qualité.

Icônes d'état

Une icône d'état située dans le coin supérieur droit de chaque écran affiche les modifications des conditions, les erreurs ou les avertissements qui surviennent lors de la configuration de l'analyse ainsi que pendant l'analyse.

| Icône d'état | Nom de l'état | Description |
|---|---------------|---|
|  | État correct | Aucune modification. Le système est normal. |
|  | Information | À titre d'information. Aucune action n'est requise. |
|  | Attention | Information qui nécessite peut-être votre attention. |
|  | Avertissement | Les avertissements n'interrompent pas l'analyse, mais ils requièrent peut-être une intervention avant de continuer. |
|  | Erreur | En règle générale, les erreurs interrompent l'analyse et requièrent une intervention avant sa reprise. |

Lorsqu'un changement de condition se produit, l'icône correspondante clignote afin de vous alerter.

- ▶ Sélectionnez l'icône pour ouvrir la fenêtre d'état et afficher une description de la condition.
- ▶ Sélectionnez **Acknowledge** (Accepter) pour accepter le message et **Close** (Fermer) pour fermer la boîte de dialogue.

Indicateurs d'activité et de capteurs

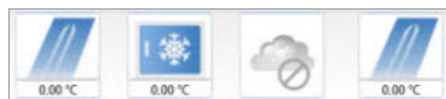
L'écran de bienvenue comprend une série d'icônes dans le coin inférieur droit. Les icônes indiquent l'activité de l'instrument, ainsi que l'état des composants spécifiques en fonction des capteurs de l'instrument.

Figure 4 Indicateurs d'activité



De gauche à droite, les indicateurs d'activité représentent les moteurs X, Y et Z, la fonctionnalité de l'électronique, la caméra, le système fluïdique et les fonctions de traitement.

Figure 5 Indicateurs de capteurs



De gauche à droite, les indicateurs de capteur représentent la température de la Flow Cell A, la température du réfrigérant pour réactifs, l'état du transfert des données, l'état du nuage BaseSpace Hub et la température de la Flow Cell B.

Espace disponible sur le disque

L'ordinateur de l'instrument HiSeq a une capacité de stockage dépassant 2,7 To par Flow Cell. Les données de la Flow Cell A sont stockées sur le lecteur D: et les données de la Flow Cell B sont stockées sur le lecteur E:.

À la fin de chaque cycle d'imagerie pour chaque ligne, le logiciel vérifie l'espace disque disponible sur les lecteurs locaux D: et E:. Si l'espace disque est faible, le logiciel interrompt l'analyse et met la Flow Cell en état de sécurité. Libérez de l'espace pour poursuivre l'analyse, qui reprendra automatique lorsqu'il y aura assez d'espace disponible.

Présentation des consommables pour le séquençage

Pour faire une analyse sur l'instrument HiSeq 2500, vous aurez besoin d'une trousse SBS et d'une trousse d'amplifiats.

Les trousse SBS comportent des réactifs de séquençage utilisés sur le système HiSeq, avec suffisamment de réactifs pour le séquençage d'une Flow Cell. Les trousse SBS Rapid comportent un ensemble de bouchons verseurs. Les réactifs de séquençage sont fournis dans des flacons de 250 ml qui se chargent directement dans les supports de réactif. Les étiquettes de réactifs respectent un code de couleurs pour réduire les erreurs de chargement.

Les trousse d'amplifiats pour les modes à débit élevé contiennent des réactifs de génération d'amplifiats utilisés avec les instruments cBot 2 ou cBot, des réactifs d'indexage et des réactifs appariés utilisés avec l'instrument HiSeq 2500, et des bouchons verseurs pour les flacons de réactifs SBS. Les trousse d'amplifiats rapides contiennent des réactifs de génération d'amplifiats, des réactifs d'indexage et des réactifs appariés. Tous les réactifs sont utilisés avec l'instrument HiSeq et sont en quantité suffisante pour générer des amplifiats sur une Flow Cell. Toutes les trousse d'amplifiats contiennent des joints de Flow Cell et sont disponibles dans les versions appariée et à lecture unique.

Trousses de réactifs pour le mode HiSeq v4

| Nom de la trousse | N° de référence |
|--|-----------------|
| Trousse SBS HiSeq v4 (250 cycles) | FC-401-4003 |
| Trousse SBS HiSeq v4 (50 cycles) | FC-410-4002 |
| Trousse d'amplifiats à lecture unique HiSeq v4 | GD-401-4001 |
| Trousse d'amplifiats appariés HiSeq v4 | PE-401-4001 |

Trousses de réactifs pour le mode TruSeq v3

| Nom de la trousse | N° de référence |
|---|-----------------|
| Trousse SBS TruSeq v3 (200 cycles) | FC-401-3001 |
| Trousse SBS TruSeq v3 (50 cycles) | FC-401-3002 |
| Trousse d'amplifiats à lecture unique TruSeq v3 | GD-401-3001 |
| Trousse d'amplifiats appariés TruSeq v4 | PE-401-3001 |

Primers de séquençage pour les bibliothèques Nextera

Le primer de séquençage pour l'index 1 (HP8) et le primer de séquençage pour la lecture 2 (HP7) fournis dans la trousse d'amplifiats TruSeq v3 ne sont pas compatibles avec les bibliothèques Nextera. Lors du séquençage des bibliothèques Nextera, utilisez le primer de séquençage de l'index 1 (HP14) et le primer de séquençage de la lecture 2 (HP11) fournis dans la boîte de primers de séquençage à index double TruSeq.

La réalisation d'une analyse à double index sur une Flow Cell à lecture unique nécessite le HP9, qui est inclus dans la version SR (à lecture unique) de la trousse.

| Nom de la trousse | N° de référence |
|---|-----------------|
| Boîte de primers de séquençage à index double TruSeq, SR (version à lecture unique) | FC-121-1003 |
| Boîte de primers de séquençage à index double TruSeq, PE (version appariée) | PE-121-1003 |

Trousses de réactifs pour le mode d'analyse rapide

| Nom de la trousse | N° de référence |
|--|-----------------|
| Trousse SBS HiSeq Rapid v2 (500 cycles) | FC-402-4023 |
| Trousse SBS HiSeq Rapid v2 (200 cycles) | FC-402-4021 |
| Trousse SBS HiSeq Rapid v2 (50 cycles) | FC-402-4022 |
| Trousse d'amplifiats à lecture unique HiSeq Rapid v2 | GD-402-4002 |
| Trousse d'amplifiats à lecture appariée HiSeq Rapid v2 | PE-402-4002 |

Chapitre 2 Pour commencer

| | |
|---|----|
| Démarrer le système HiSeq 2500 | 8 |
| Personnaliser les paramètres du système | 8 |
| Afficher et envoyer les données de l'instrument | 9 |
| Consommables fournis par l'utilisateur | 10 |

Démarrer le système HiSeq 2500

- 1 Démarrez l'ordinateur de commande de l'instrument.
- 2 Attendez que le système se charge, puis connectez-vous au système d'exploitation. Si nécessaire, consultez l'administrateur de votre établissement pour obtenir le nom d'utilisateur et le mot de passe.
- 3 Localisez l'interrupteur de tension situé sur le côté gauche de l'instrument et mettez-le à ON (Marche).
- 4 Attendez au moins trois minutes que les dispositifs de l'instrument soient configurés et que le lecteur de l'instrument appelé DoNotEject s'initialise.
- 5 Fermez la fenêtre qui s'ouvre lorsque DoNotEject est initialisé. Si la fenêtre ne s'ouvre pas, regardez dans MyComputer pour trouver le lecteur DoNotEject.



REMARQUE

N'éjectez jamais le lecteur flash DoNotEject situé à l'intérieur du châssis de l'instrument et ne modifiez jamais les fichiers qu'il contient. Ce lecteur contient des fichiers de configuration du matériel et s'initialise à chaque mise sous tension de l'instrument.

- 6 Pour assurer un espace disque adéquat, archivez les données issues des analyses précédentes présentes sur l'ordinateur de l'instrument sur un emplacement réseau. Effectuez un reformatage rapide des lecteurs O:\ et S:\ afin d'effacer toutes les données restantes.
Les disques durs doivent être vides pour que le logiciel fonctionne correctement.
- 7 Ouvrez le logiciel HCS à l'aide de l'icône de raccourci présente sur le bureau.
Lorsque le logiciel est initialisé, l'écran Mode Select (Sélection du mode) s'affiche et l'icône d'initialisation apparaît dans le coin inférieur droit de l'écran.

Meilleures pratiques pour l'utilisation de l'instrument et de l'ordinateur de commande

- ▶ Ne mettez pas l'ordinateur sous tension lorsque l'instrument est en marche. Mettez toujours l'ordinateur sous tension avant l'instrument.
- ▶ Ne mettez pas l'instrument hors tension lorsque le logiciel de commande de l'instrument est en marche.
- ▶ Attendez une minute après avoir éteint l'instrument pour le remettre en marche.
- ▶ Branchez les câbles USB de l'instrument, de l'écran et du clavier à l'arrière de l'ordinateur avant de mettre l'ordinateur sous tension.
- ▶ Branchez le lecteur de codes à barres et la souris aux ports USB situés à l'avant de l'ordinateur.

Personnaliser les paramètres du système

Le logiciel de commande comprend des paramètres de système personnalisables pour les dossiers d'analyse et les préférences LIMS. La fenêtre Menu Options (Options du menu) comprend des paramètres permettant de définir le modèle d'identifiant d'analyse, l'emplacement des dossiers par défaut, la possibilité

d'envoyer des renseignements sur l'état de l'instrument à Illumina, ainsi que l'authentification LIMS.

Pour personnaliser l'affichage de votre interface, sélectionnez **Menu | View** (Menu | Affichage). Vous pouvez choisir d'afficher l'interface en plein écran ou dans une fenêtre, ou de la réduire.

Pour activer la commande afin d'initialiser le logiciel manuellement, sélectionnez **Menu | Scanner**.

Définir les paramètres du dossier d'analyse

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Menu | Tools | Options** (Menu | Outils | Options) pour ouvrir la fenêtre Menu Options (Options du menu).
- 2 Pour personnaliser les règles d'attribution des noms pour les noms des dossiers d'analyse, modifiez les paramètres dans le champ **Run ID Template** (Modèle d'identifiant d'analyse). Sélectionnez **Reset** (Réinitialiser) pour vider le champ.
- 3 Pour paramétrer les emplacements de sortie par défaut, saisissez un emplacement pour chacun des dossiers suivants :
 - ▶ **Default Output Folder** (Dossier de sortie par défaut) : dossier de sortie par défaut pour les analyses effectuées sur la Flow Cell A.
 - ▶ **Default Output Folder2** (Dossier de sortie par défaut2) : dossier de sortie par défaut pour les analyses effectuées sur la Flow Cell B.



REMARQUE

Ces emplacements peuvent être modifiés pour chaque analyse.

- 4 Pour définir l'emplacement où les fichiers temporaires sont placés durant l'analyse, saisissez un emplacement dans le champ **Default Temp Folder 1** (Dossier temporaire par défaut 1).
- 5 Afin de paramétrer un emplacement pour les formulaires d'échantillons LIMS, saisissez un emplacement dans le champ **Run Setup Folder** (Dossier de configuration de l'analyse).
- 6 Cliquez sur **OK** pour enregistrer votre travail et fermer la fenêtre Menu Options (Options du menu). Cliquez sur **Cancel** (Annuler) pour fermer sans enregistrer.

Paramétrer les préférences LIMS

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Menu | Tools | Options** (Menu | Outils | Options) pour ouvrir la fenêtre Menu Options (Options du menu).
- 2 Saisissez les paramètres LIMS suivants :
 - ▶ **LIMS Server** (Serveur LIMS) : nom du serveur pour les interactions avec le système de gestion des informations de laboratoire (LIMS) d'Illumina pris en charge.
 - ▶ **LIMS User Name** (Nom d'utilisateur LIMS) : nom d'utilisateur utilisé lors de l'authentification sur Illumina LIMS.
 - ▶ **LIMS Password** (Mot de passe LIMS) : mot de passe utilisé lors de l'authentification sur Illumina LIMS.
- 3 Cliquez sur **OK** pour enregistrer votre travail et fermer la fenêtre Menu Options (Options du menu). Cliquez sur **Cancel** (Annuler) pour fermer sans enregistrer.

Afficher et envoyer les données de l'instrument

Le bouton Menu à l'écran de bienvenue et la fenêtre Menu Options (Options du menu) fournissent des options relatives à l'affichage et à l'envoi des données de l'instrument.

- ▶ Pour afficher des renseignements sur le matériel de l'instrument, les versions de logiciels et les coordonnées de l'assistance technique, sélectionnez **Menu | About** (Menu | À propos).

- **Send instrument health information to Illumina to aid technical support** (Envoyer les données sur l'état de l'instrument à Illumina pour faciliter l'assistance technique) : Sélectionnez cette option pour activer le service de surveillance Illumina Proactive. Le nom du paramètre affiché dans l'interface du logiciel pourrait être différent du nom indiqué dans le présent guide, selon la version du logiciel de commande HiSeq utilisée.

Lorsque ce paramètre est activé, les données relatives à la performance de l'instrument sont transmises à Illumina. Ces données facilitent le dépannage par Illumina et lui permettent de détecter les pannes potentielles, d'exécuter une maintenance proactive et d'optimiser le temps d'utilisation de l'instrument. Pour plus de renseignements sur les avantages de ce service, consultez la *note technique d'Illumina Proactive (document n° 1000000052503)*.

Ce service :

- Ne transmet pas de données de séquençage.
- Nécessite la connexion de l'instrument à un réseau ayant accès à Internet.
- Est activé par défaut. Pour choisir de ne pas utiliser ce service, désactivez le paramètre **Send instrument health information to Illumina to aid technical support** (Envoyer les données sur l'état de l'instrument à Illumina pour faciliter l'assistance technique).



REMARQUE

Ce paramètre est automatiquement réactivé lors de la mise à jour du logiciel. Si vous ne souhaitez pas faire parvenir à Illumina les données sur la performance de l'instrument, désactivez le service après chaque mise à jour du logiciel.

Consommables fournis par l'utilisateur

| Consommable | Fournisseur | Utilisation |
|---|--|--|
| Tampons imbibés d'alcool isopropylique à 70 % ou Éthanol à 70 % | WWR, n° de référence 95041-714 Fournisseur de laboratoire général | Nettoyage de la Flow Cell et de la platine de Flow Cell. |
| Bonbonne, au moins six litres | Fournisseur de laboratoire général | Préparation de la solution de lavage de maintenance. |
| Tubes pour centrifugeuse, 250 ml | Corning, n° de référence 430776 | Supports de réactifs SBS, positions contenant la solution PW1. Lavage de l'instrument. |
| Tubes coniques, 15 ml | Corning, n° de référence 430052 | Supports de réactifs appariés, positions contenant la solution PW1. Lavage de l'instrument. Collecte et mesure des volumes de déchets. |
| Tubes coniques, 50 ml, autoportants (facultatif) | Corning, n° de référence 430921 | Stockage des Flow Cell. |
| Gants jetables sans talc | Fournisseur de laboratoire général | Utilisation générale. |
| Tissu de laboratoire non pelucheux | WWR, n° de référence 21905-026 | Nettoyage du portoir de Flow Cell. |
| Papier pour lentilles, 10,1 × 15,2 cm (4 × 6 po) | WWR, n° de référence 52846-001 | Nettoyage de la Flow Cell. |
| Pointes de pipette, 200 µl | Fournisseur de laboratoire général | Division des volumes de réactifs. |
| Pointes de pipette, 1 000 µl | Fournisseur de laboratoire général | Division des volumes de réactifs. |

| Consommable | Fournisseur | Utilisation |
|-------------------------------------|--|---|
| ProClin 300, 50 ml | Sigma-Aldrich, n° de référence 48912-U | Lavage de maintenance. |
| Tween 20, liquide visqueux, 100 ml | Sigma-Aldrich, n° de référence P7949 | Lavage de maintenance. |
| Brucelles en plastique à bout carré | McMaster-Carr, n° de référence 7003A22 | Retrait des joints de la Flow Cell. |
| Eau de laboratoire, 18 mégohms | Millipore | Supports de réactifs SBS et appariés, positions contenant la solution PW1. Lavage de l'instrument. |

Tubes de microcentrifugeuse pour le mode d'analyse rapide

| Consommable | Fournisseur |
|------------------------------------|---|
| Tube de microcentrifugeuse, 1,5 ml | VWR, n° de référence 20170-038, n° de référence 20170-650 ou n° de référence 89000-028 Axygen, n° de référence MCT-150-C |
| Tube de microcentrifugeuse, 1,7 ml | VWR, n° de référence 20170-575 Axygen, n° de référence MCT-175-C Sorenson BioScience, n° de référence 16070 |

Chapitre 3 Séquençage en mode HiSeq v4

| | |
|--|----|
| Introduction | 12 |
| Flux de travail de séquençage HiSeq v4 | 13 |
| Préparer les réactifs | 13 |
| Saisir les paramètres de l'analyse | 15 |
| Charger et amorcer les réactifs | 18 |
| Charger la Flow Cell de séquençage | 23 |
| Surveiller l'analyse | 26 |
| Décharger les réactifs | 27 |
| Réaliser un lavage à l'eau | 27 |

Introduction

Pour effectuer une analyse de séquençage en mode HiSeq v4 sur l'instrument HiSeq 2500, préparez tous les réactifs, puis suivez les invites du logiciel pour configurer l'analyse. Les étapes de configuration de l'analyse consistent à entrer les paramètres de l'analyse, à charger et amorcer les réactifs, à charger la Flow Cell et à procéder à une vérification du système fluidique.

Pour obtenir des renseignements sur la durée des analyses ainsi que sur d'autres caractéristiques de performance, consultez la page relative aux caractéristiques de l'instrument HiSeq 2500 sur le site Web d'Illumina.

Échelonner des analyses

Vous pouvez démarrer une nouvelle analyse sur la Flow Cell A ou sur la Flow Cell B lorsqu'une analyse est en cours sur la Flow Cell adjacente. Pour de plus amples renseignements, consultez la section *Échelonner les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B*, page 80.

Types d'analyse pour la chimie HiSeq v4

Le tableau suivant indique les types d'analyse de séquençage et le nombre de cycles possibles pour chaque lecture lorsque vous utilisez la chimie HiSeq v4. Utilisez ces renseignements lors de la configuration de l'analyse.

| Type d'analyse | Cycles de la lecture 1 | Cycles de lecture de l'index 1 (i7) | Cycles de lecture de l'index 2 (i5) | Cycles de la lecture 2 | Nombre total de cycles |
|--------------------------------|------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|--|
| Lecture unique, sans index | ≤ 126 | -- | -- | -- | ≤ 126 |
| Lecture unique, index simple | ≤ 126 | 6 ou 7 ¹ 8 ² | -- | -- | ≤ 133 ¹ ≤ 134 ² |
| Lecture unique, index double | ≤ 126 | 8 | 8 | -- | ≤ 142 |
| Lecture appariée, sans index | ≤ 126 | -- | -- | ≤ 126 | ≤ 252 |
| Lecture appariée, index simple | ≤ 126 | 7 ¹ 8 ² | -- | ≤ 126 | ≤ 259 ¹ ≤ 260 ² |
| Lecture appariée, Index double | ≤ 126 | 8 | 7 + 8 ³ | ≤ 126 | ≤ 275 |

¹ Nombre de cycles pour les bibliothèques à index simple

² Nombre de cycles pour les bibliothèques à index double

³ La lecture de l'index 2 d'une analyse appariée à index double comprend sept cycles supplémentaires uniquement chimiques

Flux de travail de séquençage HiSeq v4



Préparez tous les réactifs pour l'analyse.



Saisissez les paramètres de l'analyse.



Lorsque vous y êtes invité, chargez tous les réactifs pour l'analyse :

- Chargez les réactifs SBS pour la lecture 1 et la lecture 2.
- Pour les analyses indexées, chargez les réactifs d'indexage.
- Pour les analyses à lectures appariées, chargez les réactifs appariés.

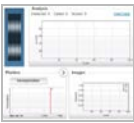


Vérifiez le flux au moyen d'une Flow Cell usagée.

Amorcez les réactifs SBS et mesurez les déchets d'amorçage.



Chargez la Flow Cell en amplifiats pour le séquençage. Vérifiez que le flux est correct.



Démarrez l'analyse de séquençage.

[Facultatif] Après le cycle 1, inspectez le rapport de la première base, puis continuez la lecture 1. L'analyse continue de la manière spécifiée dans les paramètres de l'analyse.



Lorsque l'analyse est terminée, déchargez les réactifs et effectuez un lavage de l'instrument.

Préparer les réactifs

Avant de configurer l'analyse, préparez tous les réactifs pour le séquençage : réactifs SBS, réactifs d'indexage et réactifs appariés, au besoin. Chargez tous les réactifs lorsque vous y êtes invité par le logiciel de commande. Lorsque vous utilisez la chimie HiSeq v4, il n'est pas nécessaire de charger de nouveau des réactifs durant l'analyse.

Les réactifs peuvent être préparés pendant la génération d'amplifiats. Pour obtenir des directives sur la préparation des réactifs de génération d'amplifiats et sur la génération des amplifiats, consultez le *Guide du système cBot* (document n° 15006165).

Diviser les réactifs

Il est possible de diviser une trousse de 250 cycles en deux ensembles de réactifs pour effectuer des analyses plus courtes. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Diviser les troussees SBS*, page 81.

Préparer les réactifs SBS

Les réactifs SBS sont chargés dans l'instrument au début de l'analyse. Pour la préparation des réactifs, suivez les directives ci-dessous afin de décongeler les réactifs SBS.

Décongeler les réactifs SBS

- 1 Retirez le CRM, l'IRM et l'USM de leur lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C. Protégez l'IRM de la lumière.
- 2 Décongelez-les à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant 16 heures environ. Vous pouvez aussi décongeler l'IRM et l'USM dans un bain d'eau désionisée à température ambiante pendant environ 90 minutes. Décongelez le CRM dans un bain d'eau *distinct*.



REMARQUE

Changez toujours de gants après avoir manipulé le CRM.

- 3 Retournez chaque flacon pour en mélanger le contenu.
- 4 Réservez l'IRM et l'USM sur de la glace. Réservez le CRM *séparément* sur de la glace afin d'éviter la contamination croisée.
- 5 Utilisez le PW1, le SB1, le SB2 et le SB3 sortant directement de leur lieu de stockage.

Préparer les réactifs d'indexage

Les réactifs d'indexage sont utilisés durant les lectures d'indexage d'une analyse de séquençage indexée.

Les trousse d'amplifiats appariés et à lecture unique comprennent le HP14, qui est utilisé pour la lecture 1 de l'index 1 (i7), sans égard au type de Flow Cell. Seule la trousse d'amplifiats à lecture unique comprend le HP9, qui est nécessaire pour une analyse à index double sur une Flow Cell à lecture unique.

| Type d'analyse | Type de Flow Cell | Index 1 (i7) | Index 2 (i5) |
|----------------------------------|-------------------|--------------|--------------|
| Lecture appariée à index simple | Appariée | HP14 | -- |
| Lecture unique à index simple | Lecture unique | HP14 | -- |
| Lecture appariée à index double* | Appariée | HP14 | -- |
| Lecture unique à index double | Lecture unique | HP14 | HP9 |

* Les analyses appariées à index double utilisent le FRM, un réactif apparié, pour l'index 2.

Décongeler les réactifs d'indexage

- 1 Retirez les réactifs suivants de leur lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C :
 - ▶ Pour toutes les analyses indexées sur une Flow Cell appariée : FDR et HP14
 - ▶ Pour toutes les analyses à index simple sur une Flow Cell à lecture unique : FDR et HP14
 - ▶ Pour toutes les analyses à index double sur une Flow Cell à lecture unique : FDR, HP9 et HP14
- 2 Décongelez les réactifs dans un bain d'eau désionisée à température ambiante pendant environ 20 minutes.

Préparer le FDR et le HP14

- 1 Inversez les tubes pour mélanger le contenu.
- 2 Centrifugez à 1 000 tr/min pendant une minute.

- 3 Réservez à température ambiante.

Préparer le HP9

- 1 Inversez pour mélanger.
- 2 Passez brièvement les tubes à la centrifugeuse à impulsions pour recueillir les gouttelettes.
- 3 Réservez à température ambiante.

Préparer les réactifs appariés

Les réactifs appariés sont utilisés lors de l'étape de resynthèse de la lecture 2 d'une analyse de séquençage à lecture appariée.



AVERTISSEMENT

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et un sarrau de laboratoire adapté à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html.

Décongeler les réactifs appariés

- 1 Retirez les réactifs suivants de leur lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C :
 - ▶ Pour les analyses sans index : AMS, FDR, FLM2, FPM, FRM et HP11
 - ▶ Pour les analyses indexées : AMS, FLM2, FPM, FRM et HP11
- 2 Décongelez les réactifs dans un bécher rempli d'eau à température ambiante pendant environ 20 minutes.
- 3 Placez l'AMS, le FLM2 et le FRM sur de la glace.

Préparer l'AMS, le FDR, le FLM2, le FPM, le FRM et le HP11

- 1 Inversez pour mélanger.
- 2 Centrifugez à 1 000 tr/min pendant une minute.
- 3 Placez l'AMS, le FLM2 et le FRM sur de la glace.
- 4 Réservez le FDR, le FPM et le HP11 à température ambiante.

Saisir les paramètres de l'analyse

Commencez la configuration de l'analyse en saisissant les paramètres de l'analyse dans une série d'écrans sous l'onglet Run Configuration (Configuration de l'analyse). Le logiciel vous guidera à travers les écrans afin de spécifier la connectivité BaseSpace Sequence Hub, de saisir les identifiants des consommables, de sélectionner les options d'indexage et de consigner d'autres paramètres.

Écran Integration (Intégration)

L'écran Integration (Intégration) permet de connecter l'analyse à BaseSpace Sequence Hub.

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Sequence | New Run** (Séquence | Nouvelle analyse) pour afficher l'écran Integration (Intégration).
- 2 **[Facultatif]** Connectez-vous à BaseSpace Sequence Hub ou BaseSpace Onsite Sequence Hub comme suit :
 - a Sélectionnez **BaseSpace** ou **BaseSpace Onsite**.
 - b Si vous avez sélectionné BaseSpace, sélectionnez l'une des options suivantes :
 - ▶ **Storage and Analysis** (Stockage et analyse) : envoie les données de l'analyse à BaseSpace Sequence Hub pour une surveillance à distance et une analyse des données. Cette option requiert une feuille d'échantillons.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Surveillance de l'analyse uniquement) : envoi des fichiers InterOp à BaseSpace Sequence Hub uniquement, ce qui permet de surveiller l'analyse à distance.
 - c Connectez-vous à BaseSpace Sequence Hub ou BaseSpace Onsite Sequence Hub avec l'adresse courriel et le mot de passe de votre compte Myllumina.
- 3 **[Facultatif]** Pour procéder sans vous connecter à BaseSpace Sequence Hub, sélectionnez **None** (Aucun).
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Storage (Stockage)

- 1 Cochez la case **Save to an output folder** (Enregistrer dans un dossier de sortie), puis sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour accéder à l'emplacement réseau de votre choix.
Si l'analyse est connectée à BaseSpace Sequence Hub pour le stockage et l'analyse, cette étape est facultative.
- 2 Sélectionnez **Zip BCL files** (Compresser les fichiers BCL) pour réduire l'espace de stockage requis.
Si l'analyse est connectée à BaseSpace Sequence Hub, l'option **Zip BCL files** (Compresser les fichiers BCL) est sélectionnée par défaut.



REMARQUE

Le paramètre **Bin Q-Scores** (Éliminer les scores de qualité) est activé par défaut afin de réduire l'espace de stockage requis. Ce paramètre regroupe les scores de qualité sur une plage de valeurs plus étendue sans nuire à la précision ou aux performances.

- 3 Sélectionnez l'une des options Save Auxiliary Files (Enregistrer les fichiers auxiliaires) suivantes :
 - ▶ **Save All Thumbnails** (Enregistrer toutes les miniatures) : enregistre toutes les images miniatures. Une miniature est un échantillon d'images en provenance de nombreuses plaques dans chaque colonne de plaques, ou témoin, combinées en une seule image miniature.
 - ▶ **Save Tile Thumbnails** (Enregistrer les miniatures de plaques) : enregistre les images miniatures des plaques. Les miniatures de plaques représentent une seule plaque au lieu d'un échantillon de plaques dans un témoin.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Flow Cell Setup (Configuration de la Flow Cell)

L'écran Flow Cell Setup (Configuration de la Flow Cell) consigne des renseignements sur la Flow Cell utilisée pour l'analyse. Tous les champs sont requis.

- 1 Numérisez ou saisissez l'identifiant (numéro du code à barres) de la Flow Cell à séquencer.
L'identifiant de la Flow Cell sert à déterminer le type de Flow Cell et la compatibilité des réactifs.
- 2 Assurez-vous que le type de Flow Cell est **HiSeq Flow Cell v4**.

- 3 Saisissez un nom d'expérience qui apparaîtra sur chaque écran et permettra l'identification de l'analyse en cours.
- 4 Saisissez un nom d'utilisateur, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Advanced (Paramètres avancés)

- 1 **[Facultatif]** Cochez la case **Confirm First Base** (Confirmer la première base).
Un rapport de la première base est automatiquement généré pour chaque analyse. Si vous cochez cette option, le rapport de la première base s'ouvrira avant que l'analyse puisse se poursuivre.
- 2 **[Facultatif]** Décochez la case **Align to PhiX** (Aligner sur PhiX) pour chaque ligne ne contenant pas le contrôle PhiX.
Vous pouvez également sélectionner les lignes de l'image de la Flow Cell pour ajouter ou supprimer des lignes en vue d'un alignement PhiX.
Par défaut, toutes les lignes sont cochées pour que l'alignement soit fait.



REMARQUE

Avec les logiciels HCS v2.2 et RTA v1.18, vous n'avez pas besoin d'une ligne de contrôle dédiée; elle est facultative.

- 3 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Recipe (Formule)

- 1 Choisissez parmi les options de type d'index suivantes :
 - ▶ **No Index** (Sans index) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée sans index.
 - ▶ **Single Index** (Index simple) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec une seule lecture d'indexage.
 - ▶ **Dual Index** (Index double) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec deux lectures d'indexage.
 - ▶ **Custom** (Personnalisé) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec un nombre personnalisé de cycles pour les lectures d'index.
- 2 Si l'option Dual Index (Index double) ou l'option Custom (Personnalisé) est choisie, sélectionnez un format de Flow Cell, soit **Single Read** (À lecture unique) ou **Paired End** (Appariée).
- 3 Entrez le nombre de cycles pour la lecture 1 et la lecture 2, s'il y a lieu.
Chaque lecture comprend un cycle de plus que le nombre de cycles analysés. Par exemple, pour effectuer 125 cycles pour la lecture 1, entrez 126.
- 4 Pour l'option d'indexage **Custom** (Personnalisé), saisissez le nombre de cycles pour les lectures d'index.



REMARQUE

Les longueurs de lecture peuvent ne pas être identiques.

- 5 Vérifiez les paramètres de chimie suivants, générés automatiquement :
 - ▶ **SBS** : trousse SBS HiSeq v4
 - ▶ **Index** : index simple HiSeq v4 ou index double HiSeq v4
 - ▶ **Rotation des lectures appariées** : trousse d'amplifiats appariés HiSeq v4
- 6 **[Facultatif]** Cochez la case **Use Existing Recipe** (Utiliser la formule existante) pour utiliser une formule personnalisée.

Écran Sample Sheet (Feuille d'échantillons)

Les feuilles d'échantillons sont facultatives, sauf si vous utilisez BaseSpace Sequence Hub pour effectuer les analyses des données ou si vous réalisez une analyse indexée.



REMARQUE

HCS v2.2 permet un programme d'indexage différent dans chaque ligne.

- 1 Sélectionnez **Browse** (parcourir) pour localiser la feuille d'échantillons.
- 2 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Reagents (Réactifs)

L'écran Reagents (Réactifs) consigne des renseignements sur les trousse de réactifs utilisées pour votre analyse. L'identifiant de la trousse de réactifs (numéro du code à barres commençant par **RGT**) est utilisé pour déterminer le type de trousse de réactifs et la compatibilité du mode d'analyse.

- 1 Numériser ou saisissez l'identifiant de la trousse de réactifs SBS.
- 2 Pour les analyses à lectures appariées, numériser ou saisissez l'identifiant de la trousse de réactifs pour la trousse d'amplifiats appariés.
- 3 Sélectionnez la trousse de réactifs SBS à utiliser pour l'analyse :
 - ▶ Sélectionnez **250 Cycles** pour une trousse de 250 cycles. Le nombre de cycles restants est défini sur 275 par défaut.
 - ▶ Sélectionnez **50 Cycles** pour une trousse de 50 cycles. Le nombre de cycles restants est défini sur 74 par défaut.
 - ▶ Sélectionnez **Custom** (Personnalisé) pour une trousse partielle ou plusieurs trousse de 50 cycles. Dans le champ Cycles Remaining (Cycles restants), entrez le nombre de cycles SBS que doivent couvrir les réactifs.



REMARQUE

Pour les trousse partielles, le logiciel effectue un compte à rebours du nombre de cycles saisi. Lorsqu'il reste peu de cycles, le logiciel vous invite à charger de nouveaux réactifs.

- 4 Sélectionnez **Prime SBS Reagents** (Amorcer les réactifs SBS) pour amorcer les réactifs.
- 5 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Review (Révision)

- 1 Vérifiez les paramètres de l'analyse depuis l'écran Review (Révision).
- 2 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour continuer ou **Back** (Retour) pour modifier les paramètres.

Charger et amorcer les réactifs

Une fois définis les paramètres de l'analyse, chargez les réactifs SBS, les réactifs d'indexage et les réactifs appariés destinés à l'analyse, puis amorcez les réactifs dans le système fluidique. Le logiciel vous guide à travers ces étapes à l'aide d'une série d'écrans sous l'onglet Pre-Run Setup (Configuration avant analyse).

Charger les réactifs SBS

- 1 Retournez chaque tube de réactif plusieurs fois pour mélanger le réactif.



ATTENTION

Traitez le flacon de CRM en dernier, après avoir chargé tous les autres réactifs, pour éviter la contamination croisée. Changez toujours de gants après avoir manipulé le CRM.

- 2 Remplacez le bouchon de chaque flacon par un bouchon verseur.
- 3 Ouvrez la porte du compartiment de réactifs.
- 4 Relevez les dispositifs d'aspiration du support de réactifs SBS, comme suit :
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers vous, puis relevez-la.
 - b Relâchez la poignée dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée soit bien fixée dans la fente.
- 5 Faites glisser le support de réactifs hors du compartiment de réactifs.
- 6 Placez chaque flacon de réactif sur le support, dans la position numérotée pertinente. Veillez à ce que l'extrémité conique du flacon repose dans l'encoche située à la base du support.

Tableau 1 Positions des réactifs SBS

| Position | Réactif | Description |
|----------|--------------------|---|
| 1 | IRM | Mélange principal de réactifs d'incorporation |
| 2 | PW1 | 25 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire |
| 3 | USM | Mélange de balayage universel |
| 4 | Tampon SBS 1 (SB1) | Tampon à forte salinité |
| 5 | Tampon SBS 2 (SB2) | Tampon de lavage d'incorporation |
| 6 | Tampon SBS 2 (SB2) | Tampon de lavage d'incorporation |
| 7 | CRM | Mélange de réactifs de clivage |
| 8 | Tampon SBS 3 (SB3) | Tampon de clivage |

- 7 Enfilez une nouvelle paire de gants en latex sans talc.
- 8 Glissez le support de réactifs dans le compartiment de réactifs. Aligned le support sur le guide surélevé du plancher du compartiment.
- 9 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les flacons de réactifs SBS, comme suit.
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers vous, puis abaissez-la.
 - b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois abaissés dans les bouchons verseurs.
 - c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.
- 10 Cochez la case **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 [25 ml] chargé).

Charger les réactifs d'indexage

- 1 Assurez-vous que le support à paires de bases appariées n'est pas utilisé pour la resynthèse pour la lecture 2, la préparation de la lecture d'index 1 (i7) ou la préparation de la lecture d'index 2 (i5) dans la Flow Cell adjacente.
- 2 Relevez les dispositifs d'aspiration du support de réactifs appariés, comme suit :

- a Tirez la poignée vers vous, puis soulevez-la.
 - b Relâchez la poignée dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée soit bien fixée dans la fente.
- 3 Faites glisser le support de réactifs hors du compartiment de réactifs à l'aide de la poignée du support.
 - 4 Débouchez les tubes de réactifs et placez chaque tube sur le support dans la position numérotée qui lui est associée ou selon l'étiquette de couleur correspondante.

Tableau 2 Flow Cell à lecture unique

| Position | Réactif | Description |
|----------|---------|--|
| 15 | FDR | Réactif de dénaturation rapide (contient du formamide) |
| 16 | HP9* | Primer de séquençage de l'index i5 |
| 17 | HP14 | Primer de séquençage de l'index i7 |

* HP9 est uniquement nécessaire pour les analyses à index double. Si le HP9 n'est pas utilisé, chargez un tube conique de 15 ml contenant 10 ml d'eau de laboratoire à la position n° 16.

Tableau 3 Flow Cell appariées

| Position | Réactif | Description |
|----------|---------|--|
| 10 | FRM* | Mélange de resynthèse rapide |
| 15 | FDR | Réactif de dénaturation rapide (contient du formamide) |
| 17 | HP14 | Primer de séquençage de l'index i7 |

*Chargez le FRM en position 10 pour des analyses à index double sur une Flow Cell appariée. Du FRM doit être chargé à la position 10 pour toutes les analyses à lectures appariées, quelles que soient les options d'indexage.

- 5 Si vous effectuez une analyse à lectures appariées, ignorez les étapes 6 à 9.
- 6 Placez des tubes coniques de 15 ml contenant 10 ml d'eau de laboratoire dans les positions inutilisées sur le support apparié.
- 7 Glissez le support de réactifs dans le compartiment de réactifs. Alignez le support sur le guide surélevé du plancher du compartiment.
- 8 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les tubes de réactifs appariés, comme suit.
 - a Tirez la poignée vers vous, puis abaissez-la.
 - b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois plongés dans les tubes.
 - c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.
- 9 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Charger les réactifs appariés

- 1 Relevez les dispositifs d'aspiration du support de réactifs appariés, comme suit :
 - a Tirez la poignée vers vous, puis soulevez-la.
 - b Relâchez la poignée dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée soit bien fixée dans la fente.
- 2 Faites glisser le support de réactifs hors du compartiment de réactifs à l'aide de la poignée du support.
- 3 Débouchez les tubes de réactifs et placez chaque tube sur le support dans la position numérotée qui lui est associée ou selon l'étiquette de couleur correspondante.

Tableau 4 Flow Cell à lecture appariée

| Position | Réactif | Description |
|----------|---------|--|
| 10 | FRM* | Mélange de resynthèse rapide |
| 11 | FLM2 | Mélange de linéarisation rapide 2 |
| 13 | AMS | Mélange d'amplification rapide |
| 14 | FPM | Prémélange d'amplification rapide |
| 15 | FDR* | Réactif de dénaturation rapide (contient du formamide) |
| 16 | HP11 | Primer de séquençage pour la lecture 2 |

* Si vous chargez des réactifs d'indexage pour une analyse à index simple, le FMR est déjà chargé à la position 10. Si vous chargez des réactifs d'indexage pour une analyse à index double, le FMR et le FDR sont déjà chargés.

- 4 Placez des tubes coniques de 15 ml contenant 10 ml d'eau de laboratoire dans les positions inutilisées sur le support apparié.
- 5 Glissez le support de réactifs dans le compartiment de réactifs. Alignez le support sur le guide surélevé du plancher du compartiment.
- 6 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les tubes de réactifs appariés, comme suit.
 - a Tirez la poignée vers vous, puis abaissez-la.
 - b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois plongés dans les tubes.
 - c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.
- 7 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Amorcer les réactifs

Les étapes d'amorçage des réactifs comprennent le chargement d'une Flow Cell d'amorçage, la vérification de l'adéquation du flux et le démarrage de l'amorce.



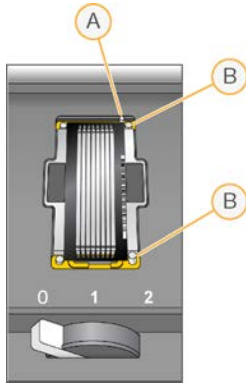
ATTENTION

Utilisez systématiquement une Flow Cell **usagée** pour amorcer les réactifs. Vous pouvez utiliser la Flow Cell d'une analyse précédente pour l'amorçage des réactifs en vue d'une analyse ultérieure ou d'un lavage après analyse.

Charger une Flow Cell d'amorçage

- 1 Rincez la Flow Cell d'amorçage avec de l'eau de laboratoire. Séchez-la à l'aide d'un chiffon pour nettoyage de lentilles ou d'un tissu non pelucheux.
- 2 Nettoyez-la à l'aide de lingettes alcoolisées et d'un chiffon pour nettoyage de lentilles.
- 3 Placez la Flow Cell sur le portoir de Flow Cell, les ports d'entrée et de sortie orientés **vers le bas** et le code à barres vers la droite. Veillez à ce que la flèche sur le côté gauche de la Flow Cell, qui indique le sens du flux, pointe vers l'instrument.
- 4 Faites glisser doucement la Flow Cell vers les broches de guidage supérieure et de droite jusqu'à ce qu'elle s'enclenche.

Figure 6 Flow Cell positionnée contre les broches de guidage supérieure et de droite



- A Broche de guidage supérieure
- B Broches de guidage de droite

- 5 Retirez votre main de la Flow Cell afin d'éviter que l'alignement ne dévie.
- 6 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour engager la décompression et maintenir la Flow Cell.
Lorsque le levier de Flow Cell clignote en vert, la décompression est en cours. Si le voyant du levier n'est pas vert, consultez la section *Problèmes possibles de configuration de l'analyse*, page 76.
- 7 Attendez environ cinq secondes, puis placez lentement le levier de la Flow Cell en position 2.
Lorsque le levier de Flow Cell est vert et ne clignote plus, cela signifie que les collecteurs sont en place et que la Flow Cell est prête.
- 8 Assurez-vous que la case **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) est cochée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Vérifier que le flux est correct

La vérification du flux confirme que la Flow Cell et les joints sont correctement installés et que le collecteur est engagé.

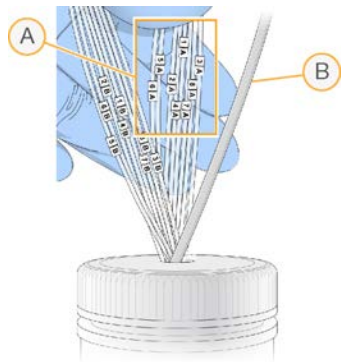
- 1 Numérisez ou saisissez l'identifiant de la Flow Cell d'amorçage (numéro du code à barres).
- 2 Sélectionnez la position **2** dans la liste déroulante.
- 3 Vérifiez les valeurs par défaut suivantes :
 - ▶ Volume : **125**
 - ▶ Taux d'aspiration : **250**
 - ▶ Taux de distribution : **2 000**
- 4 Sélectionnez **Pump** (Pompe).
- 5 Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
- 6 Si trop de bulles sont présentes, procédez comme suit :
 - a Vérifiez l'absence d'obstructions au niveau des joints.
 - b Diminuez le taux d'aspiration à 100.
 - c Pompez 125 µl d'eau supplémentaires vers la Flow Cell.

- d Si le problème persiste, retirez la Flow Cell, répétez les étapes de nettoyage, puis rechargez la Flow Cell.

Positionner les tubes et démarrer l'amorçage

- 1 Retirez les huit tubes d'évacuation de la Flow Cell appropriée du conteneur à déchets.

Figure 7 Positionner les tubes



- A Tubes d'évacuation de la Flow Cell pour les positions de réactifs 1 à 8
 B Tubes de la pompe de condensation

- 2 Placez chaque tube d'évacuation dans un tube vide distinct de 15 ml. Les déchets sont récupérés et mesurés lorsque l'amorçage est terminé.
- 3 Sélectionnez **Start Prime** (Démarrer l'amorçage). Surveillez la progression de l'amorçage à l'écran Prime (Amorçage).
- 4 Lorsque l'amorçage est terminé, mesurez les déchets et confirmez que le volume de chaque tube est de 1,75 ml pour un total de **14 ml**.
 Le total est calculé comme suit :
 - ▶ 250 µl pour chaque position SBS, sauf pour la position 2 ($250 \times 7 = 1,75$ ml)
 - ▶ 1,75 ml pour chaque ligne ($1,75 \times 8 = 14$ ml)
- 5 Remettez les tubes d'évacuation dans le conteneur à déchets.
- 6 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Charger la Flow Cell de séquençage

Le chargement de la Flow Cell de séquençage comprend le retrait de la Flow Cell d'amorçage, le nettoyage du portoir de Flow Cell, le chargement de la Flow Cell en amplifiats et la vérification de l'adéquation du flux.

Retirer la Flow Cell usagée

- 1 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour libérer les collecteurs.
- 2 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 0 pour désengager le joint de décompression et libérer la Flow Cell.
- 3 Soulevez la Flow Cell utilisée du portoir de Flow Cell.

Nettoyer le portoir de Flow Cell

- 1 Enfilez une nouvelle paire de gants en latex sans talc.
- 2 À l'aide d'un tissu non pelucheux imprégné d'eau de laboratoire, essuyez la surface du portoir de Flow Cell afin de retirer les sels.
- 3 À l'aide d'une lingette alcoolisée ou d'un tissu non pelucheux imprégné d'éthanol ou d'isopropanol, essuyez la surface du portoir de Flow Cell. Veillez à ce que l'alcool ne s'écoule pas dans les trous de décompression ou autour des collecteurs.
- 4 Le cas échéant, séchez la platine à l'aide d'un chiffon de laboratoire peu pelucheux.
- 5 Inspectez le portoir de Flow Cell pour vous assurer qu'il ne contient pas de peluche et que les trous de décompression ne sont pas obstrués.

Figure 8 Inspecter les trous de décompression



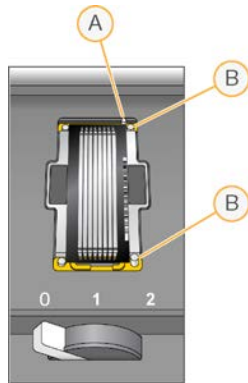
Nettoyer la Flow Cell

- 1 Retirez la Flow Cell en amplifiats de son conteneur en utilisant une paire de plastistats.
- 2 Rincez la Flow Cell avec de l'eau de laboratoire. Séchez à l'aide d'un chiffon pour nettoyage de lentilles.
- 3 Pliez une lingette alcoolisée jusqu'à ce qu'elle fasse la taille de la Flow Cell environ.
- 4 Tenez à deux doigts les bords de la Flow Cell de manière à ce que les ports d'entrée et de sortie soient face vers le *haut*.
- 5 Essuyez chaque côté de la Flow Cell d'un seul mouvement de balayage. Répétez jusqu'à ce qu'elle soit propre, en repliant la lingette d'alcool entre chaque mouvement.
- 6 Séchez à l'aide d'un chiffon sec pour nettoyage de lentilles.
- 7 Protégez la Flow Cell de la poussière jusqu'à ce que vous soyez prêt à la charger dans l'instrument.

Charger la Flow Cell de séquençage

- 1 Placez la Flow Cell sur le portoir de Flow Cell, les ports d'entrée et de sortie orientés **vers le bas** et le code à barres vers la droite. Veillez à ce que la flèche sur le côté gauche de la Flow Cell, qui indique le sens du flux, pointe vers l'instrument.
- 2 Faites glisser doucement la Flow Cell vers les broches de guidage supérieure et de droite jusqu'à ce qu'elle s'enclenche.

Figure 9 Flow Cell positionnée contre les broches de guidage supérieure et de droite



- A Broche de guidage supérieure
- B Broches de guidage de droite

- 3 Retirez votre main de la Flow Cell afin d'éviter que l'alignement ne dévie avec le temps.
- 4 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour engager la décompression et maintenir la Flow Cell.
Lorsque le levier de Flow Cell clignote en vert, la décompression est en cours. Si le voyant du levier n'est pas vert, consultez la section *Problèmes possibles de configuration de l'analyse*, page 76.
- 5 Attendez environ cinq secondes, puis placez lentement le levier de la Flow Cell en position 2.
Lorsque le levier de Flow Cell est vert et ne clignote plus, cela signifie que les collecteurs sont en place et que la Flow Cell est prête à être utilisée.
- 6 Assurez-vous que la case **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) est cochée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Vérifier que le flux est correct

La vérification du flux confirme que la Flow Cell et les joints sont correctement installés et que le collecteur est engagé.

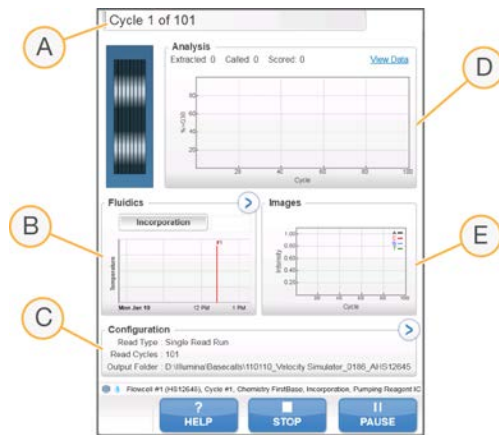
- 1 Sélectionnez la position **5** dans la liste déroulante.
- 2 Vérifiez les valeurs par défaut suivantes :
 - ▶ Volume : **250**
 - ▶ Taux d'aspiration : **250**
 - ▶ Taux de distribution : **2 000**
- 3 Sélectionnez **Pump** (Pompe).
- 4 Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes ou de fuites à proximité des collecteurs.
- 5 Si trop de bulles sont présentes, procédez comme suit :
 - a Vérifiez l'absence d'obstructions au niveau des joints de collecteur.
 - b Répétez le processus en utilisant la position 6 afin d'éviter de vider la position 5.
 - c Diminuez le taux d'aspiration à 100.
 - d Pompez 250 µl supplémentaires vers la Flow Cell.
- 6 Sélectionnez **Next** (Suivant).

- 7 Assurez-vous que le levier de Flow Cell est vert, puis fermez la porte du compartiment de Flow Cell.
- 8 Assurez-vous que les cases à cocher **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) et **Door Closed** (Porte fermée) sont sélectionnées, puis cliquez sur **Next** (Suivant).
- 9 À l'écran Read Barcode (Lire le code à barres), attendez que le balayage soit terminé.
L'identifiant de la Flow Cell est numérisé pour confirmer sa correspondance avec l'identifiant de la Flow Cell saisi à l'écran Flow Cell Setup (Configuration de la Flow Cell). Le balayage prend environ trois minutes, ou sept minutes s'il s'agit d'une analyse à double Flow Cell.
- 10 Sélectionnez **Start** (Démarrer) pour commencer l'analyse de séquençage.

Surveiller l'analyse

- 1 Surveillez les indicateurs de l'analyse à l'écran Run Overview (Aperçu de l'analyse).

Figure 10 Écran Run Overview (Aperçu de l'analyse)



- A **Barre de progression** : surveillance du nombre de cycles terminés.
- B **Graphique de la fluidique** : développement de la section de la fluidique pour surveiller les étapes de la chimie.
- C **Configuration de l'analyse** : vérification des paramètres de l'analyse en cours.
- D **Graphique d'analyse** : contrôle des scores de qualité par cycle.
- E **Graphique d'images** : contrôle des intensités par cycle.

Rapport de la première base

Si vous avez sélectionné l'option de confirmation de la première base au moment de la configuration de l'analyse, la boîte de dialogue de confirmation de la première base s'ouvre automatiquement une fois l'imagerie du premier cycle terminée. L'analyse s'interrompt à cette étape.

- 1 Vérifiez le rapport de la première base dans la boîte de dialogue de confirmation.
- 2 Si les résultats sont satisfaisants, sélectionnez **Continue** (Continuer).

Afficher les indicateurs de l'analyse

Lorsque des indicateurs d'analyse sont disponibles, le Sequencing Analysis Viewer (SAV) s'ouvre automatiquement et les affiche. Les indicateurs apparaissent sous forme de tracés, de graphiques et de tableaux. Pour plus de renseignements, consultez le *Guide de l'utilisateur du logiciel Sequencing Analysis Viewer (document n° 15020619)*.

- 1 Pour afficher les indicateurs mis à jour, sélectionnez **Refresh** (Actualiser) à tout moment pendant l'analyse.

Décharger les réactifs

- 1 Lorsque l'analyse est terminée, ouvrez la porte du compartiment de réactifs.
- 2 Relevez les dispositifs d'aspiration du support apparié et du support SBS correspondants comme suit :
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers l'extérieur.
 - b Soulevez la poignée du dispositif d'aspiration tout en la tirant vers l'extérieur.
 - c Relâchez la poignée du dispositif d'aspiration dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée du dispositif d'aspiration demeure de manière sécurisée dans la fente.
- 3 Faites glisser chaque support de réactifs hors du compartiment de réactifs, à l'aide des poignées des supports.
- 4 Retirez chaque flacon du support de réactifs.



AVERTISSEMENT

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et un sarrau de laboratoire adapté à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html.

Réaliser un lavage à l'eau

Un lavage à l'eau est requis après chaque analyse de séquençage afin de laver le système et de vérifier la fluidique. Le lavage de maintenance est une solution de remplacement facultative au lavage à l'eau après analyse. Pour obtenir des directives, consultez la section *Réaliser un lavage de maintenance*, page 68. Pour obtenir des directives, consultez le Guide du système HiSeq 2500 (document n° 15035786).

Si l'instrument n'a pas été utilisé pendant au moins une journée, lavez-le à l'eau avant de démarrer une nouvelle analyse de séquençage.

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Wash | Water** (Lavage | Eau).
- 2 Sélectionnez **Yes** (Oui) pour laver les positions des réactifs appariés, puis sélectionnez **Next** (Suivant).
- 3 Chargez l'instrument avec de l'eau de laboratoire :
 - a Remplissez huit flacons SBS avec 250 ml d'eau de laboratoire.
 - b Remplissez 10 tubes appariés avec 12 ml d'eau de laboratoire.



REMARQUE

Les tubes et les flacons de lavage sont généralement remplacés tous les six mois, même si l'eau est remplacée chaque semaine environ.

- 4 Assurez-vous qu'une Flow Cell usagée est chargée. Si nécessaire, chargez une Flow Cell usagée.
- 5 Sélectionnez **Next** (Suivant).
- 6 Effectuez une vérification de la fluidique :
 - a Sélectionnez la solution 2 dans la liste déroulante.
 - b Acceptez les valeurs de pompe par défaut.
 - c Sélectionnez **Pump** (Pompe).
 - d Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
- 7 Retirez les tubes d'évacuation correspondant à la Flow Cell du conteneur à déchets.
- 8 Rassemblez les tubes d'évacuation à l'aide d'un parafilm. Assurez-vous de l'alignement régulier de l'extrémité des tubes.
- 9 Placez les extrémités des tubes groupés dans un flacon de 250 ml.
- 10 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour lancer le lavage à l'eau.

| Positions | Durée approximative de l'analyse |
|---|----------------------------------|
| Huit positions SBS | 20 minutes |
| Huit positions SBS et dix positions à paires de bases appariées | 60 minutes |

- 11 Lorsque le lavage est terminé, mesurez le volume distribué.

| Positions | Volume total distribué | Volume distribué par ligne |
|---|------------------------|----------------------------|
| Huit positions SBS | 32 ml | 4 ml |
| Huit positions SBS et dix positions à paires de bases appariées | 72 ml | 9 ml |

- 12 Détachez les tubes d'évacuation et remplacez-les dans le flacon à déchets.

Chapitre 4 Séquençage en mode TruSeq v3

| | |
|---|----|
| Introduction | 29 |
| Flux de travail de séquençage TruSeq v3 | 30 |
| Préparer les réactifs pour la lecture 1 | 31 |
| Saisir les paramètres de l'analyse | 35 |
| Charger et amorcer les réactifs | 38 |
| Charger la Flow Cell de séquençage | 42 |
| Surveiller l'analyse | 45 |
| Préparer les réactifs pour la lecture 2 | 46 |
| Décharger les réactifs | 49 |
| Réaliser un lavage à l'eau | 49 |

Introduction

Pour réaliser une analyse de séquençage en mode TruSeq v3 sur l'instrument HiSeq 2500, préparez les réactifs SBS pour la lecture 1 et les réactifs d'indexage avant de configurer l'analyse. Suivez les invites du logiciel pour configurer l'analyse. Les étapes de configuration de l'analyse consistent à entrer les paramètres de l'analyse, à charger et amorcer les réactifs, à charger la Flow Cell et à procéder à une vérification du système fluide. Après la lecture 1 et les lectures d'index, préparez et chargez les réactifs appariés et les réactifs SBS pour la lecture 2.

Pour obtenir des renseignements sur la durée des analyses ainsi que sur d'autres caractéristiques de performance, consultez la page relative aux caractéristiques de l'instrument HiSeq 2500 sur le site Web d'Illumina.

Échelonner des analyses

Vous pouvez démarrer une nouvelle analyse sur la Flow Cell A ou sur la Flow Cell B lorsqu'une analyse est en cours sur la Flow Cell adjacente. Pour de plus amples renseignements, consultez la section *Échelonner les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B*, page 80.

Types d'analyse pour la chimie TruSeq v3

Le tableau suivant indique les types d'analyse de séquençage et le nombre de cycles possibles pour chaque lecture lorsque vous utilisez la chimie TruSeq v3. Utilisez ces renseignements lors de la configuration de l'analyse.

| Type d'analyse | Cycles de la lecture 1 | Cycles de lecture de l'index 1 (i7) | Cycles de lecture de l'index 2 (i5) | Cycles de la lecture 2 | Nombre total de cycles |
|------------------------------|------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|--|
| Lecture unique, sans index | ≤ 101 | -- | -- | -- | ≤ 101 |
| Lecture unique, index simple | ≤ 101 | 6 ou 7 ¹ 8 ² | -- | -- | ≤ 108 ¹ ≤ 109 ² |
| Lecture unique, index double | ≤ 101 | 8 | 8 | -- | ≤ 117 |
| Lecture appariée, sans index | ≤ 101 | -- | -- | ≤ 101 | ≤ 202 |

| Type d'analyse | Cycles de la lecture 1 | Cycles de lecture de l'index 1 (i7) | Cycles de lecture de l'index 2 (i5) | Cycles de la lecture 2 | Nombre total de cycles |
|--------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|--|
| Lecture appariée, index simple | ≤ 101 | 7 ¹ 8 ² | -- | ≤ 101 | ≤ 209 ¹ ≤ 210 ² |
| Lecture appariée, Index double | ≤ 101 | 8 | 7 + 8 ³ | ≤ 101 | ≤ 225 |

¹ Nombre de cycles pour les bibliothèques à index simple

² Nombre de cycles pour les bibliothèques à index double

³ La lecture de l'index 2 d'une analyse appariée à index double comprend sept cycles supplémentaires uniquement chimiques

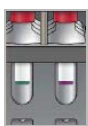
Flux de travail de séquençage TruSeq v3



Préparez les réactifs SBS pour la lecture 1 et les réactifs d'indexage.



Définissez les paramètres de l'analyse à l'aide du logiciel de commande.



Lorsque vous y êtes invité, chargez tous les réactifs pour la lecture 1 :

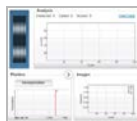
- Chargez les réactifs SBS pour la lecture 2, sauf l'ICB.
- Pour les analyses indexées, chargez les réactifs d'indexage.



Vérifiez le flux au moyen d'une Flow Cell usagée. Amorcez les réactifs SBS et mesurez les déchets d'amorçage.



Chargez la Flow Cell en amplifiats pour le séquençage. Vérifiez que le flux est correct.

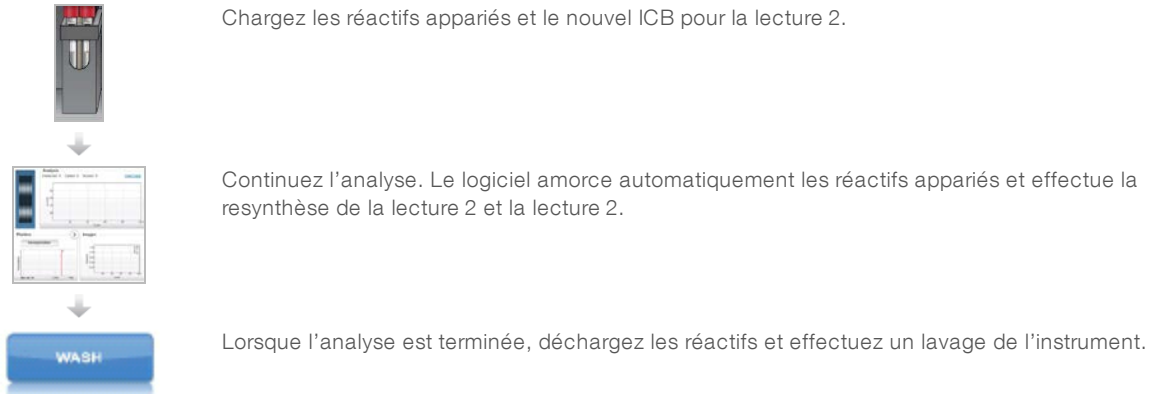


Démarrez l'analyse de séquençage.

[Facultatif] Après le cycle 1, inspectez le rapport de la première base, puis continuez la lecture 1. L'analyse continue de la manière indiquée dans les paramètres de l'analyse.



Préparez les réactifs appariés et le nouvel ICB pour la lecture 2.



Préparer les réactifs pour la lecture 1

Avant de configurer l'analyse, préparez les réactifs pour la lecture 1 et les lectures d'index. Chargez les réactifs préparés lorsque vous y êtes invité par le logiciel de commande.

Les réactifs pour la lecture 1 peuvent être préparés pendant la génération d'amplifiats. Pour obtenir des directives sur la préparation des réactifs de génération d'amplifiats et sur la génération des amplifiats, consultez le *Guide du système cBot (document n° 15006165)*.



REMARQUE

Les réactifs de la lecture 2 sont préparés pendant la lecture 1.

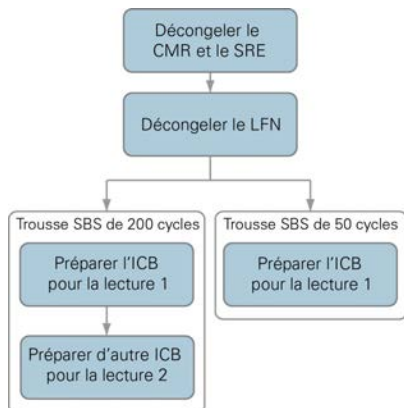
Diviser les réactifs

Il est possible de diviser une trousse de 200 cycles en deux ensembles de réactifs pour effectuer des analyses plus courtes. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Diviser les trousse SBS*, page 81.

Préparer les réactifs SBS

Les étapes de la préparation des réactifs SBS comprennent la décongélation du CMR, du LFN et du SRE, puis la préparation de l'ICB avec le LFN et l'EDP. L'utilisation de la trousse SBS de 200 cycles nécessite la division de l'ICB en deux portions, soit une pour chacune des lectures 1 et 2, durant la préparation. Pour l'indexage double, l'étape de la préparation de l'ICB comprend le calcul des volumes appropriés de réactifs.

Figure 11 Flux de travail pour la préparation des réactifs SBS



Décongeler les réactifs SBS

- 1 Retirez le CMR et le SRE de leur lieu de stockage maintenu entre -25 °C et -15 °C.
- 2 Décongelez-les à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant 16 heures environ.
Vous pouvez aussi décongeler le SRE dans un bain d'eau désionisée à température ambiante pendant environ 90 minutes. Décongelez le CMR dans un bain d'eau *distinct*.



REMARQUE

Changez toujours de gants après avoir manipulé le CMR.

- 3 Inversez pour mélanger les réactifs.
- 4 Réservez le SRE sur de la glace. Réservez *séparément* le CMR sur de la glace afin d'éviter la contamination croisée.
- 5 Retirez le LFN de son lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C :
 - ▶ Pour la trousse SBS de 50 cycles : retirez un tube.
 - ▶ Pour la trousse SBS de 200 cycles : retirez deux tubes.
- 6 Décongelez le LFN dans un bécher rempli d'eau désionisée à température ambiante pendant environ 20 minutes.
- 7 Utilisez l'ICB, le SB1, le SB2 et le SB3 sortant directement du lieu de stockage maintenu entre 2 °C et 8 °C.

Préparer l'ICB pour la lecture 1 (sans index ou à index simple) (trousse de 50 cycles)

- 1 Ajoutez le contenu d'un tube de LFN au flacon d'ICB.
- 2 Rincez le tube de LFN avec de l'ICB pour vous assurer que tout le LFN est transféré.
- 3 Ajoutez le contenu du tube d'EDP à la solution d'ICB et de LFN.
- 4 Rincez le tube d'EDP avec un mélange d'ICB et de LFN pour vous assurer que tout l'EDP est transféré.
- 5 Mettez le bouchon sur le flacon contenant l'EDP, l'ICB et le FLN et renversez le flacon pour mélanger.
- 6 Réservez sur de la glace.

Préparer l'ICB pour la lecture 1 (sans index ou à index simple) (trousse de 200 cycles)

- 1 Ajoutez 47 ml d'ICB dans un flacon vide de 250 ml pour obtenir deux flacons d'ICB.
- 2 Réservez le flacon contenant 47 ml d'ICB pour la lecture 2, entre 2°C et 8°C.
- 3 Ajoutez le contenu de deux tubes de LFN au flacon d'ICB initial.
- 4 Rincez chaque tube de LFN avec de l'ICB pour vous assurer que tout le LFN est transféré.
- 5 Ajoutez 1,1 ml d'EDP à la solution d'ICB et de LFN.
- 6 Remplacez l'EDP inutilisé dans son lieu de stockage, entre -25 °C et -15 °C.
- 7 Mettez le bouchon sur le flacon contenant l'EDP, l'ICB et le FLN et renversez le flacon pour mélanger.
- 8 Réservez sur de la glace.

Préparer l'ICB pour la lecture 1 (index double)

Suivez les directives ci-dessous pour calculer et préparer le volume d'ICB nécessaire pour la lecture 1 d'une analyse à index double.

- 1 Mesurez les volumes suivants d'EDP, d'ICB et de LFN pour chaque tranche de 10 cycles de séquençage devant être effectuée à la lecture 1.

| Réactif | Volume pour 10 cycles | Stockage |
|---------|-----------------------|--------------|
| ICB | 4,57 ml | 2 à 8 °C |
| LFN | 0,6 ml | -25 à -15 °C |
| EDP | 0,11 ml | -25 à -15 °C |

- 2 Transférez le volume d'ICB mesuré dans un flacon de 250 ml.
- 3 Ajoutez le volume de LFN mesuré dans le nouveau flacon d'ICB.
- 4 Rincez chaque tube de LFN avec de l'ICB pour vous assurer que tout le LFN est transféré.
- 5 Ajoutez le volume d'EDP mesuré à la solution d'ICB et de LFN.
- 6 Rincez le tube d'EDP avec la solution d'ICB et de LFN pour vous assurer que tout l'EDP est transféré.
- 7 Mettez le bouchon sur le flacon contenant l'EDP, l'ICB et le FLN et renversez le flacon pour mélanger.
- 8 Réservez sur de la glace.

Exemple de calcul

Une analyse appariée à index double de 101 cycles comporte 225 cycles au total :

- ▶ 124 cycles (101 + 8 + 7 + 8) pour la lecture 1 et les lectures d'index
- ▶ 101 cycles pour la lecture 2

| Lecture 1 et lectures d'index (124 cycles) | Lecture 2 (101 cycles) |
|--|--------------------------------|
| 124 cycles / 10 cycles = 12,4 | 101 cycles / 10 cycles = 10 |
| • ICB : 12,4 x 4,57 ml = 56,9 ml | • ICB : 10 x 4,57 ml = 45,7 ml |
| • LFN : 12,4 x 0,6 ml = 7,44 ml | • LFN : 10 x 0,6 ml = 6 ml |
| • EDP : 12,4 x 0,11 ml = 1,36 ml | • EDP : 10 x 0,11 ml = 1,1 ml |

Utilisez le même calcul pour toutes les analyses à index double. Basez le calcul sur le nombre total de cycles de la lecture 1 et des lectures d'index accrus du nombre total de cycles de la lecture 2. Pour les analyses appariées à index double, incluez les sept cycles de chimie seulement dans la lecture d'index 2.

Préparer les réactifs d'indexage

Les réactifs d'indexage sont utilisés durant les lectures d'indexage d'une analyse de séquençage indexée. Préparez les réactifs appropriés selon le type d'analyse et le type de librairie.

| Type d'analyse | Type de librairie | Index 1 (i7) | Index 2 (i5) |
|-------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|
| Index simple | Toutes les librairies sauf Nextera | HP8 | -- |
| | Librairies Nextera | HP14* | -- |
| Appariée à Index double | Toutes les librairies sauf Nextera | HP8 | RMR |
| | Librairies Nextera | HP14* | RMR |

| Type d'analyse | Type de librairie | Index 1 (i7) | Index 2 (i5) |
|-------------------------------|------------------------------------|--------------|--------------|
| Lecture unique à index double | Toutes les librairies sauf Nextera | HP8 | HP9* |
| | Librairies Nextera | HP14* | HP9* |

* Le primer est fourni dans la boîte de primers de séquençage à index double TruSeq.

Décongeler les réactifs d'indexage

- Retirez les réactifs suivants de leur lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C :
 - ▶ Pour toutes les analyses d'indexage : HP3, HP14 ou HP8, et HT2
 - ▶ Pour les analyses à index double sur une Flow Cell à lecture unique : HP9
 - ▶ Pour les analyses à index double sur une Flow Cell appariée : RMR
- Décongelez les réactifs dans un bécher rempli d'eau désionisée à température ambiante pendant environ 20 minutes.

Préparer le HT2

- Inversez pour mélanger.
- Centrifugez à 1 000 tr/min pendant une minute.
- Réservez à température ambiante.

Préparer le HP3 pour les analyses à index double

- Renversez pour mélanger le contenu, puis passez à la centrifugeuse à impulsions.
- Combinez les volumes de HP3 et de PW1 suivants :
 - ▶ Pour les analyses à index simple : transférez 3 325 µl de PW1 dans un tube conique vide de 15 ml, puis ajoutez 175 µl de HP3.
 - ▶ Pour les analyses à index double : transférez 3 800 µl de PW1 dans un tube conique vide de 15 ml, puis ajoutez 200 µl de HP3.
- Inversez pour mélanger.
- Centrifugez à 1 000 tr/min pendant une minute.
- Réservez à température ambiante.

Préparer le HP8 ou le HP14

- Inversez pour mélanger.
- Centrifugez à 1 000 tr/min pendant une minute.
- Réservez à température ambiante.

Préparer le RMR

- Inversez pour mélanger.
- Centrifugez à 1 000 tr/min pendant une minute. *N'agitez pas les tubes.*
- Réservez sur de la glace.

Préparer le HP9

- 1 Inversez pour mélanger.
- 2 Passez brièvement les tubes à la centrifugeuse à impulsions pour recueillir les gouttelettes.
- 3 Réservez à température ambiante.

Saisir les paramètres de l'analyse

Commencez la configuration de l'analyse en saisissant les paramètres de l'analyse dans une série d'écrans sous l'onglet Run Configuration (Configuration de l'analyse). Le logiciel vous guidera à travers les écrans afin de spécifier la connectivité BaseSpace Sequence Hub, de saisir les identifiants des consommables, de sélectionner les options d'indexage et de consigner d'autres paramètres.

Écran Integration (Intégration)

L'écran Integration (Intégration) permet de connecter l'analyse à BaseSpace Sequence Hub.

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Sequence | New Run** (Séquence | Nouvelle analyse) pour afficher l'écran Integration (Intégration).
- 2 **[Facultatif]** Connectez-vous à BaseSpace Sequence Hub ou BaseSpace Onsite Sequence Hub comme suit :
 - a Sélectionnez **BaseSpace** ou **BaseSpace Onsite**.
 - b Si vous avez sélectionné BaseSpace, sélectionnez l'une des options suivantes :
 - ▶ **Storage and Analysis** (Stockage et analyse) : envoie les données de l'analyse à BaseSpace Sequence Hub pour une surveillance à distance et une analyse des données. Cette option requiert une feuille d'échantillons.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Surveillance de l'analyse uniquement) : envoi des fichiers InterOp à BaseSpace Sequence Hub uniquement, ce qui permet de surveiller l'analyse à distance.
 - c Connectez-vous à BaseSpace Sequence Hub ou BaseSpace Onsite Sequence Hub avec l'adresse courriel et le mot de passe de votre compte Myllumina.
- 3 **[Facultatif]** Pour procéder sans vous connecter à BaseSpace Sequence Hub, sélectionnez **None** (Aucun).
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Storage (Stockage)

- 1 Cochez la case **Save to an output folder** (Enregistrer dans un dossier de sortie), puis sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour accéder à l'emplacement réseau de votre choix.
Si l'analyse est connectée à BaseSpace Sequence Hub pour le stockage et l'analyse, cette étape est facultative.
- 2 Sélectionnez **Zip BCL files** (Compresser les fichiers BCL) pour réduire l'espace de stockage requis.
Si l'analyse est connectée à BaseSpace Sequence Hub, l'option **Zip BCL files** (Compresser les fichiers BCL) est sélectionnée par défaut.



REMARQUE

Le paramètre **Bin Q-Scores** (Éliminer les scores de qualité) est activé par défaut afin de réduire l'espace de stockage requis. Ce paramètre regroupe les scores de qualité sur une plage de valeurs plus étendue sans nuire à la précision ou aux performances.

- 3 Sélectionnez l'une des options Save Auxiliary Files (Enregistrer les fichiers auxiliaires) suivantes :
 - ▶ **Save All Thumbnails** (Enregistrer toutes les miniatures) : enregistre toutes les images miniatures. Une miniature est un échantillon d'images en provenance de nombreuses plaques dans chaque colonne de plaques, ou témoin, combinées en une seule image miniature.
 - ▶ **Save Tile Thumbnails** (Enregistrer les miniatures de plaques) : enregistre les images miniatures des plaques. Les miniatures de plaques représentent une seule plaque au lieu d'un échantillon de plaques dans un témoin.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Flow Cell Setup (Configuration de la Flow Cell)

L'écran Flow Cell Setup (Configuration de la Flow Cell) consigne des renseignements sur la Flow Cell utilisée pour l'analyse.

- 1 Numérisiez ou saisissez l'identifiant (numéro du code à barres) de la Flow Cell à séquencer. L'identifiant de la Flow Cell sert à déterminer le type de Flow Cell et la compatibilité des réactifs.
- 2 Confirmez que le type de Flow Cell est **HiSeq Flow Cell v3**.
- 3 Saisissez un nom d'expérience qui apparaîtra sur chaque écran et permettra l'identification de l'analyse en cours.
- 4 Saisissez un nom d'utilisateur, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Advanced (Paramètres avancés)

- 1 **[Facultatif]** Cochez la case **Confirm First Base** (Confirmer la première base).
Un rapport de la première base est automatiquement généré pour chaque analyse. Si vous cochez cette option, le rapport de la première base s'ouvrira avant que l'analyse puisse poursuivre.
- 2 **[Facultatif]** Décochez la case **Align to PhiX** (Aligner sur PhiX) pour chaque ligne ne contenant pas le contrôle PhiX.
Vous pouvez également sélectionner les lignes de l'image de la Flow Cell pour ajouter ou supprimer des lignes en vue d'un alignement PhiX.
Par défaut, toutes les lignes sont cochées pour que l'alignement soit fait.



REMARQUE

Avec les logiciels HCS v2.2 et RTA v1.18, vous n'avez pas besoin d'une ligne de contrôle dédiée; elle est facultative.

- 3 **[Facultatif]** Sélectionnez **Keep Intensity Files** (Conserver les fichiers d'intensité) pour une réanalyse ultérieure ou un traitement personnalisé.



REMARQUE

Si cette option est sélectionnée, la taille du dossier de sortie des données augmente considérablement. L'enregistrement des fichiers d'intensité n'est pas requis pour les analyses sur instrument.

- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Recipe (Formule)

Une formule est générée automatiquement à partir des renseignements saisis à l'écran Recipe (Formule).

- 1 Choisissez parmi les options de type d'index suivantes :
 - ▶ **No Index** (Sans index) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée sans index.

- ▶ **Single Index** (Index simple) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec une seule lecture d'indexage.
 - ▶ **Dual Index** (Index double) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec deux lectures d'indexage.
 - ▶ **Custom** (Personnalisé) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec un nombre personnalisé de cycles pour les lectures d'index.
- 2 Si l'option Dual Index (Index double) ou l'option Custom (Personnalisé) est choisie, sélectionnez un format de Flow Cell, soit **Single Read** (À lecture unique) ou **Paired End** (Appariée).
 - 3 Entrez le nombre de cycles pour la lecture 1 et la lecture 2, s'il y a lieu.
Chaque lecture comprend un cycle de plus que le nombre de cycles analysés. Par exemple, pour effectuer 125 cycles pour la lecture 1, entrez 126.
 - 4 Pour l'option d'indexage **Custom** (Personnalisé), saisissez le nombre de cycles pour les lectures d'index.



REMARQUE

Les longueurs de lecture peuvent ne pas être identiques.

- 5 Vérifiez les paramètres de chimie suivants, générés automatiquement :
 - a **SBS** : trousse SBS TruSeq v3
 - b **Index** : boîte de primers de séquençage multiplex TruSeq ou boîte de primers de séquençage à index double TruSeq
 - c **Rotation des lectures appariées** : trousse d'amplifiats appariés TruSeq v3
- 6 **[Facultatif]** Cochez la case **Use Existing Recipe** (Utiliser la formule existante) pour utiliser une formule personnalisée.

Écran Sample Sheet (Feuille d'échantillons)

Les feuilles d'échantillons sont facultatives, sauf si vous utilisez BaseSpace Sequence Hub pour effectuer les analyses des données ou si vous réalisez une analyse indexée.



REMARQUE

HCS v2.2 permet un programme d'indexage différent dans chaque ligne.

- 1 Sélectionnez **Browse** (parcourir) pour localiser la feuille d'échantillons.
- 2 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Reagents (Réactifs)

L'écran Reagents (Réactifs) consigne des renseignements sur les trousse de réactifs utilisées pour votre analyse. L'identifiant de la trousse de réactifs (numéro du code à barres commençant par **RGT**) est utilisé pour déterminer le type de trousse de réactifs et la compatibilité avec le mode d'analyse.

- 1 Numériser ou saisissez l'identifiant de la trousse de réactifs SBS.
- 2 Pour les analyses à lectures appariées, numériser ou saisissez l'identifiant de la trousse de réactifs pour la trousse d'amplifiats appariés.
- 3 Sélectionnez la trousse de réactifs SBS à utiliser pour l'analyse :
 - ▶ Sélectionnez **200 Cycles** pour une trousse de 200 cycles. Le nombre de cycles restants est défini sur 209 par défaut.
 - ▶ Sélectionnez **50 Cycles** pour une trousse de 50 cycles. Le nombre de cycles restants est défini sur 59 par défaut.

- ▶ Sélectionnez **Custom** (Personnalisé) pour une trousse partielle ou plusieurs trousse de 50 cycles. Dans le champ Cycles Remaining (Cycles restants), entrez le nombre de cycles SBS que doivent couvrir les réactifs.



REMARQUE

Pour les trousse partielles, le logiciel effectue un compte à rebours du nombre de cycles saisi. Lorsqu'il reste peu de cycles, le logiciel vous invite à charger de nouveaux réactifs.

- 4 Sélectionnez **Prime SBS Reagents** (Amorcer les réactifs SBS) pour amorcer les réactifs.
- 5 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Review (Révision)

- 1 Vérifiez les paramètres de l'analyse depuis l'écran Review (Révision).
- 2 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour continuer ou **Back** (Retour) pour modifier les paramètres.

Charger et amorcer les réactifs

Une fois définis les paramètres de l'analyse, chargez les réactifs SBS, les réactifs d'indexage et les réactifs appariés destinés à l'analyse, puis amorcez les réactifs dans le système fluide. Le logiciel vous guide à travers ces étapes à l'aide d'une série d'écrans sous l'onglet Pre-Run Setup (Configuration avant analyse).

Charger les réactifs SBS

- 1 Remplacez le bouchon de chaque flacon de réactifs par un bouchon verseur.



ATTENTION

Traitez le flacon de CMR en dernier, après avoir chargé tous les autres réactifs, pour éviter la contamination croisée. Changez toujours de gants après avoir manipulé le CMR.

- 2 Ouvrez la porte du compartiment de réactifs.
- 3 Relevez les dispositifs d'aspiration du support de réactifs SBS, comme suit :
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers vous, puis relevez-la.
 - b Relâchez la poignée dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée soit bien fixée dans la fente.
- 4 Faites glisser le support de réactifs hors du compartiment de réactifs.
- 5 Placez chaque flacon de réactif sur le support, dans la position numérotée pertinente. Veillez à ce que l'extrémité conique du flacon repose dans l'encoche située à la base du support.

Tableau 5 Positions des réactifs SBS

| Position | Réactif | Description |
|----------|--------------------|--------------------------------------|
| 1 | ICB | Mélange d'incorporation |
| 2 | PW1 | 25 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire |
| 3 | SRE | Réactif de mélange de dépistage |
| 4 | Tampon SBS 1 (SB1) | Tampon à forte salinité |
| 5 | Tampon SBS 2 (SB2) | Tampon de lavage d'incorporation |
| 6 | Tampon SBS 2 (SB2) | Tampon de lavage d'incorporation |

| Position | Réactif | Description |
|----------|--------------------|-------------------------------|
| 7 | CMR | Réactif de mélange de clivage |
| 8 | Tampon SBS 3 (SB3) | Tampon de clivage |

- 6 Glissez le support de réactifs dans le compartiment de réactifs. Alignez le support sur le guide surélevé du plancher du compartiment.
- 7 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les flacons de réactifs SBS, comme suit.
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers vous, puis abaissez-la.
 - b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois abaissés dans les bouchons verseurs.
 - c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.
- 8 Cochez la case **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 [25 ml] chargé).

Charger les réactifs d'indexage

- 1 Assurez-vous que le support à paires de bases appariées n'est pas utilisé pour la resynthèse pour la lecture 2, la préparation de la lecture d'index 1 (i7) ou la préparation de la lecture d'index 2 (i5) dans la Flow Cell adjacente.
- 2 Relevez les dispositifs d'aspiration du support de réactifs appariés, comme suit :
 - a Tirez la poignée vers vous, puis soulevez-la.
 - b Relâchez la poignée dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée soit bien fixée dans la fente.
- 3 Faites glisser le support de réactifs hors du compartiment de réactifs à l'aide de la poignée du support.
- 4 Débouchez les tubes de réactifs et placez chaque tube sur le support dans la position numérotée qui lui est associée ou selon l'étiquette de couleur correspondante.

Tableau 6 Analyse à index simple

| Position | Réactif | Description |
|----------|-------------|--|
| 17 | HP8 ou HP14 | Mélange de primers de séquençage pour l'index 1 (i7) |
| 18 | HP3 | Solution de dénaturation |
| 19 | HT2 | Tampon de lavage |

Tableau 7 Analyse à index double sur une Flow Cell à lecture unique

| Position | Réactif | Description |
|----------|-------------|---|
| 16 | HP9 | Mélange de primers de séquençage à lecture unique pour l'index 2 (i5) |
| 17 | HP8 ou HP14 | Mélange de primers de séquençage pour l'index 1 (i7) |
| 18 | HP3 | Solution de dénaturation |
| 19 | HT2 | Tampon de lavage |

Tableau 8 Analyse à index double sur une Flow Cell à paires de bases appariées

| Position | Réactif | Description |
|----------|-------------|--|
| 10 | RMR | Mélange de resynthèse |
| 17 | HP8 ou HP14 | Mélange de primers de séquençage pour l'index 1 (i7) |
| 18 | HP3 | Solution de dénaturation |
| 19 | HT2 | Tampon de lavage |

- 5 Placez des tubes coniques de 15 ml contenant 10 ml d'eau de laboratoire dans des positions de supports non utilisées.
- 6 Glissez le support de réactifs dans le compartiment de réactifs. Alignez le support sur le guide surélevé du plancher du compartiment.
- 7 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les tubes de réactifs appariés, comme suit.
 - a Tirez la poignée vers vous, puis abaissez-la.
 - b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois plongés dans les tubes.
 - c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.
- 8 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Amorcer les réactifs

Les étapes d'amorçage des réactifs comprennent le chargement d'une Flow Cell d'amorçage, la vérification de l'adéquation du flux et le démarrage de l'amorce.



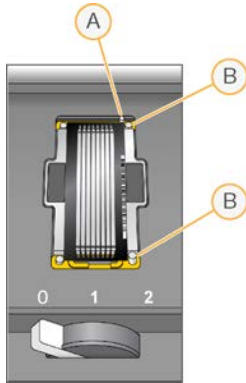
ATTENTION

Utilisez systématiquement une Flow Cell *usagée* pour amorcer les réactifs. Vous pouvez utiliser la Flow Cell d'une analyse précédente pour l'amorçage des réactifs en vue d'une analyse ultérieure ou d'un lavage après analyse.

Charger une Flow Cell d'amorçage

- 1 Rincez la Flow Cell d'amorçage avec de l'eau de laboratoire. Séchez-la à l'aide d'un chiffon pour nettoyage de lentilles ou d'un tissu non pelucheux.
- 2 Nettoyez-la à l'aide de lingettes alcoolisées et d'un chiffon pour nettoyage de lentilles.
- 3 Placez la Flow Cell sur le portoir de Flow Cell, les ports d'entrée et de sortie orientés **vers le bas** et le code à barres vers la droite. Veillez à ce que la flèche sur le côté gauche de la Flow Cell, qui indique le sens du flux, pointe vers l'instrument.
- 4 Faites glisser doucement la Flow Cell vers les broches de guidage supérieure et de droite jusqu'à ce qu'elle s'enclenche.

Figure 12 Flow Cell positionnée contre les broches de guidage supérieure et de droite



- A Broche de guidage supérieure
- B Broches de guidage de droite

- 5 Retirez votre main de la Flow Cell afin d'éviter que l'alignement ne dévie.
- 6 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour engager la décompression et maintenir la Flow Cell.
Lorsque le levier de Flow Cell clignote en vert, la décompression est en cours. Si le voyant du levier n'est pas vert, consultez la section *Problèmes possibles de configuration de l'analyse*, page 76.
- 7 Attendez environ cinq secondes, puis placez lentement le levier de la Flow Cell en position 2.
Lorsque le levier de Flow Cell est vert et ne clignote plus, cela signifie que les collecteurs sont en place et que la Flow Cell est prête.
- 8 Assurez-vous que la case **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) est cochée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Vérifier que le flux est correct

La vérification du flux confirme que la Flow Cell et les joints sont correctement installés et que le collecteur est engagé.

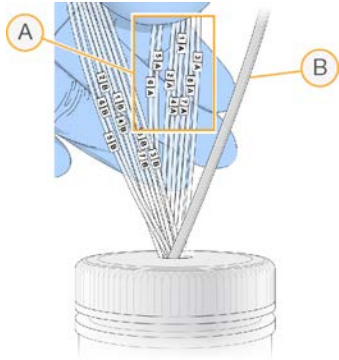
- 1 Numérisez ou saisissez l'identifiant de la Flow Cell d'amorçage (numéro du code à barres).
- 2 Sélectionnez la position **2** dans la liste déroulante.
- 3 Vérifiez les valeurs par défaut suivantes :
 - ▶ Volume : **125**
 - ▶ Taux d'aspiration : **250**
 - ▶ Taux de distribution : **2 000**
- 4 Sélectionnez **Pump** (Pompe).
- 5 Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
- 6 Si trop de bulles sont présentes, procédez comme suit :
 - a Vérifiez l'absence d'obstructions au niveau des joints.
 - b Diminuez le taux d'aspiration à 100.
 - c Pompez 125 µl d'eau supplémentaires vers la Flow Cell.

- d Si le problème persiste, retirez la Flow Cell, répétez les étapes de nettoyage, puis rechargez la Flow Cell.

Positionner les tubes et démarrer l'amorçage

- 1 Retirez les huit tubes d'évacuation de la Flow Cell appropriée du conteneur à déchets.

Figure 13 Positionner les tubes



- A Tubes d'évacuation de la Flow Cell pour les positions de réactifs 1 à 8
 B Tubes de la pompe de condensation

- 2 Placez chaque tube d'évacuation dans un tube vide distinct de 15 ml. Les déchets sont récupérés et mesurés lorsque l'amorçage est terminé.
- 3 Sélectionnez **Start Prime** (Démarrer l'amorçage). Surveillez la progression de l'amorçage à l'écran Prime (Amorçage).
- 4 Lorsque l'amorçage est terminé, mesurez les déchets et confirmez que le volume de chaque tube est de 1,75 ml pour un total de **14 ml**.
 Le total est calculé comme suit :
 - ▶ 250 µl pour chaque position SBS, sauf pour la position 2 ($250 \times 7 = 1,75$ ml)
 - ▶ 1,75 ml pour chaque ligne ($1,75 \times 8 = 14$ ml)
- 5 Remplacez les tubes d'évacuation dans le conteneur à déchets.
- 6 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Charger la Flow Cell de séquençage

Le chargement de la Flow Cell de séquençage comprend le retrait de la Flow Cell d'amorçage, le nettoyage du portoir de Flow Cell, le chargement de la Flow Cell en amplifiats et la vérification de l'adéquation du flux.

Retirer la Flow Cell usagée

- 1 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour libérer les collecteurs.
- 2 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 0 pour désengager le joint de décompression et libérer la Flow Cell.
- 3 Soulevez la Flow Cell utilisée du portoir de Flow Cell.

Nettoyer le portoir de Flow Cell

- 1 Enfilez une nouvelle paire de gants en latex sans talc.
- 2 À l'aide d'un tissu non pelucheux imprégné d'eau de laboratoire, essuyez la surface du portoir de Flow Cell afin de retirer les sels.
- 3 À l'aide d'une lingette alcoolisée ou d'un tissu non pelucheux imprégné d'éthanol ou d'isopropanol, essuyez la surface du portoir de Flow Cell. Veillez à ce que l'alcool ne s'écoule pas dans les trous de décompression ou autour des collecteurs.
- 4 Le cas échéant, séchez la platine à l'aide d'un chiffon de laboratoire peu pelucheux.
- 5 Inspectez le portoir de Flow Cell pour vous assurer qu'il ne contient pas de peluche et que les trous de décompression ne sont pas obstrués.

Figure 14 Inspecter les trous de décompression



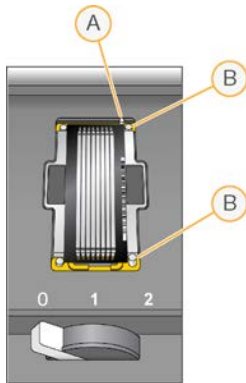
Nettoyer la Flow Cell

- 1 Retirez la Flow Cell en amplifiats de son conteneur en utilisant une paire de plastistats.
- 2 Rincez la Flow Cell avec de l'eau de laboratoire. Séchez à l'aide d'un chiffon pour nettoyage de lentilles.
- 3 Pliez une lingette alcoolisée jusqu'à ce qu'elle fasse la taille de la Flow Cell environ.
- 4 Tenez à deux doigts les bords de la Flow Cell de manière à ce que les ports d'entrée et de sortie soient face vers le *haut*.
- 5 Essuyez chaque côté de la Flow Cell d'un seul mouvement de balayage. Répétez jusqu'à ce qu'elle soit propre, en repliant la lingette d'alcool entre chaque mouvement.
- 6 Séchez à l'aide d'un chiffon sec pour nettoyage de lentilles.
- 7 Protégez la Flow Cell de la poussière jusqu'à ce que vous soyez prêt à la charger dans l'instrument.

Charger la Flow Cell de séquençage

- 1 Placez la Flow Cell sur le portoir de Flow Cell, les ports d'entrée et de sortie orientés **vers le bas** et le code à barres vers la droite. Veillez à ce que la flèche sur le côté gauche de la Flow Cell, qui indique le sens du flux, pointe vers l'instrument.
- 2 Faites glisser doucement la Flow Cell vers les broches de guidage supérieure et de droite jusqu'à ce qu'elle s'enclenche.

Figure 15 Flow Cell positionnée contre les broches de guidage supérieure et de droite



- A Broche de guidage supérieure
- B Broches de guidage de droite

- 3 Retirez votre main de la Flow Cell afin d'éviter que l'alignement ne dévie avec le temps.
- 4 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour engager la décompression et maintenir la Flow Cell.
Lorsque le levier de Flow Cell clignote en vert, la décompression est en cours. Si le voyant du levier n'est pas vert, consultez la section *Problèmes possibles de configuration de l'analyse*, page 76.
- 5 Attendez environ cinq secondes, puis placez lentement le levier de la Flow Cell en position 2.
Lorsque le levier de Flow Cell est vert et ne clignote plus, cela signifie que les collecteurs sont en place et que la Flow Cell est prête à être utilisée.
- 6 Assurez-vous que la case **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) est cochée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Vérifier que le flux est correct

La vérification du flux confirme que la Flow Cell et les joints sont correctement installés et que le collecteur est engagé.

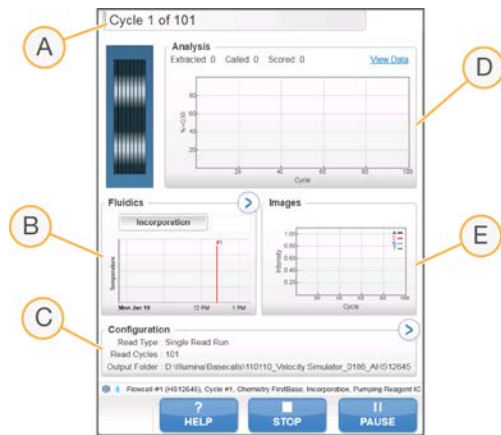
- 1 Sélectionnez la position **5** dans la liste déroulante.
- 2 Vérifiez les valeurs par défaut suivantes :
 - ▶ Volume : **250**
 - ▶ Taux d'aspiration : **250**
 - ▶ Taux de distribution : **2 000**
- 3 Sélectionnez **Pump** (Pompe).
- 4 Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes ou de fuites à proximité des collecteurs.
- 5 Si trop de bulles sont présentes, procédez comme suit :
 - a Vérifiez l'absence d'obstructions au niveau des joints de collecteur.
 - b Répétez le processus en utilisant la position 6 afin d'éviter de vider la position 5.
 - c Diminuez le taux d'aspiration à 100.
 - d Pompez 250 µl supplémentaires vers la Flow Cell.
- 6 Sélectionnez **Next** (Suivant).

- 7 Assurez-vous que le levier de Flow Cell est vert, puis fermez la porte du compartiment de Flow Cell.
- 8 Assurez-vous que les cases à cocher **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) et **Door Closed** (Porte fermée) sont sélectionnées, puis cliquez sur **Next** (Suivant).
- 9 À l'écran Read Barcode (Lire le code à barres), attendez que le balayage soit terminé.
L'identifiant de la Flow Cell est numérisé pour confirmer sa correspondance avec l'identifiant de la Flow Cell saisi à l'écran Flow Cell Setup (Configuration de la Flow Cell). Le balayage prend environ trois minutes, ou sept minutes s'il s'agit d'une analyse à double Flow Cell.
- 10 Sélectionnez **Start** (Démarrer) pour commencer l'analyse de séquençage.

Surveiller l'analyse

- 1 Surveillez les indicateurs de l'analyse à l'écran Run Overview (Aperçu de l'analyse).

Figure 16 Écran Run Overview (Aperçu de l'analyse)



- A **Barre de progression** : surveillance du nombre de cycles terminés.
- B **Graphique de la fluidique** : développement de la section de la fluidique pour surveiller les étapes de la chimie.
- C **Configuration de l'analyse** : vérification des paramètres de l'analyse en cours.
- D **Graphique d'analyse** : contrôle des scores de qualité par cycle.
- E **Graphique d'images** : contrôle des intensités par cycle.

Rapport de la première base

Si vous avez sélectionné l'option de confirmation de la première base au moment de la configuration de l'analyse, la boîte de dialogue de confirmation de la première base s'ouvre automatiquement une fois l'imagerie du premier cycle terminée. L'analyse s'interrompt à cette étape.

- 1 Vérifiez le rapport de la première base dans la boîte de dialogue de confirmation.
- 2 Si les résultats sont satisfaisants, sélectionnez **Continue** (Continuer).

Afficher les indicateurs de l'analyse

Lorsque des indicateurs d'analyse sont disponibles, le Sequencing Analysis Viewer (SAV) s'ouvre automatiquement et les affiche. Les indicateurs apparaissent sous forme de tracés, de graphiques et de tableaux. Pour plus de renseignements, consultez le *Guide de l'utilisateur du logiciel Sequencing Analysis Viewer (document n° 15020619)*.

- 1 Pour afficher les indicateurs mis à jour, sélectionnez **Refresh** (Actualiser) à tout moment pendant l'analyse.

Préparer les réactifs pour la lecture 2

Avant la fin de la lecture 1 et des lectures d'index, préparez les réactifs pour la resynthèse de la lecture 2 et le nouvel ICB pour la lecture 2. Chargez les réactifs lorsque vous y êtes invité par le logiciel de commande.

Préparer les réactifs appariés

Les réactifs appariés sont utilisés lors de l'étape de resynthèse de la lecture 2 d'une analyse de séquençage à lecture appariée.



REMARQUE

Les librairies Nextera nécessitent le HP11, un primer de séquençage fourni dans la boîte de primers de séquençage à index double TruSeq. Toutes les autres librairies nécessitent le HP7.

Décongeler les réactifs appariés

- 1 Retirez les réactifs suivants de leur lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C :
 - ▶ Pour les analyses sans index ou à index simple : AMX2, APM2, AT2, BMX, HP3, HP7 ou HP11, HT2, LMX2 et RMR
 - ▶ Pour les analyses à index double : AMX2, APM2, AT2, BMX, HP3, HP7 ou HP11, HT2 et LMX2
 - ▶ Pour les analyses à lectures appariées : HP3
- 2 Décongelez les réactifs dans un bécher rempli d'eau désionisée à température ambiante pendant environ 20 minutes.
- 3 Réservez le AMX2, le BMX, le LMX2 et le RMR sur de la glace.

Préparer l'AMX2, l'APM2, l'AT2, le BMX, le HP3, le HP7, le HP11, le HT2 et le LMX2

- 1 Retournez chaque tube pour en mélanger le contenu.
- 2 Centrifugez à 1 000 tr/min pendant une minute.
- 3 Réservez l'AMX2, le BMX, et le LMX2 sur de la glace.
- 4 Réservez l'APM2, l'AT2, le HP3, le HP7, le HP11 et le HT2 à température ambiante.

Préparer le HP3 pour les analyses à lectures appariées

- 1 Renversez pour mélanger le contenu, puis passez à la centrifugeuse à impulsions.
- 2 Transférez 2,85 ml de PW1 dans un tube conique vide de 15 ml, puis ajoutez 150 µl de HP3.
- 3 Inversez pour mélanger.
- 4 Centrifugez à 1 000 tr/min pendant une minute.

- 5 Réservez à température ambiante.

Préparer le RMR

- 1 Inversez pour mélanger.
- 2 Centrifugez à 1 000 tr/min pendant une minute. *N'agitez pas les tubes.*
- 3 Réservez sur de la glace.

Préparation de l'Illumina Chromosome Browser (ICB) pour la lecture 2 (sans index ou à index simple)

- 1 Retirez deux tubes de LFN du lieu de stockage maintenu entre -25 °C et -15 °C et faites-les décongeler dans un bécher contenant de l'eau désionisée à température ambiante pendant environ 20 minutes.
- 2 Une fois les deux tubes de LFN décongelés, ajoutez leur contenu au flacon contenant 47 ml d'ICB.
- 3 Rincez chaque tube de LFN avec de l'ICB pour vous assurer que tout le LFN est transféré.
- 4 Ajoutez 1,1 ml d'EDP à la solution d'ICB et de LFN.
- 5 Remplacez l'EDP inutilisé dans son lieu de stockage, entre -25 °C et -15 °C.
- 6 Mettez le bouchon sur le flacon contenant l'EDP, l'ICB et le FLN et renversez le flacon pour mélanger.
- 7 Réservez sur de la glace.

Préparer l'ICB pour la lecture 2 (index double)

Suivez les directives ci-dessous pour calculer et préparer le volume d'ICB nécessaire pour la lecture 2 d'une analyse à index double.

- 1 Mesurez les volumes suivants d'EDP, d'ICB et de LFN pour chaque tranche de 10 cycles de séquençage devant être effectuée à la lecture 2.

| Réactif | Volume pour 10 cycles | Stockage |
|---------|-----------------------|--------------|
| ICB | 4,57 ml | 2 à 8 °C |
| LFN | 0,6 ml | -25 à -15 °C |
| EDP | 0,11 ml | -25 à -15 °C |

Pour obtenir plus de renseignements sur le calcul des volumes, consultez la section *Exemple de calcul*, page 33.

- 2 Transférez le volume d'ICB mesuré dans un flacon de 250 ml.
- 3 Ajoutez le volume de LFN mesuré dans le nouveau flacon d'ICB.
- 4 Rincez chaque tube de LFN avec de l'ICB pour vous assurer que tout le LFN est transféré.
- 5 Ajoutez le volume d'EDP mesuré à la solution d'ICB et de LFN.
- 6 Rincez le tube d'EDP avec la solution d'ICB et de LFN pour vous assurer que tout l'EDP est transféré.
- 7 Mettez le bouchon sur le flacon contenant l'EDP, l'ICB et le FLN et renversez le flacon pour mélanger.
- 8 Réservez sur de la glace.

Charger les réactifs appariés

- 1 Assurez-vous que le support à paires de bases appariées n'est pas utilisé pour la resynthèse pour la lecture 2, la préparation de la lecture d'index 1 (i7) ou la préparation de la lecture d'index 2 (i5) dans la Flow Cell opposée.
- 2 Relevez les dispositifs d'aspiration du support de réactifs appariés, comme suit :
 - a Tirez la poignée vers vous, puis soulevez-la.
 - b Relâchez la poignée dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée soit bien fixée dans la fente.
- 3 Faites glisser le support de réactifs hors du compartiment de réactifs à l'aide de la poignée du support.
- 4 Débouchez tous les tubes des réactifs.
- 5 Placez chaque tube sur le support dans les positions numérotées correspondantes.

Tableau 9 Positions des réactifs appariés

| Position | Réactif | Description |
|----------|-------------|--|
| 10 | RMR | Mélange de resynthèse |
| 11 | LMX2 | Mélange de linéarisation 2 |
| 12 | BMX | Mélange de blocage |
| 13 | AMX2 | Mélange d'amplification 2 |
| 14 | APM2 | Prémélange AMX2 |
| 15 | AT2 | Formamide 100 % |
| 16 | HP7 ou HP11 | Primer de séquençage pour la lecture 2 |
| 18 | HP3 | Solution de dénaturation |
| 19 | HT2 | Tampon de lavage |

- 6 Glissez le support de réactifs dans le compartiment de réactifs. Alignez le support sur le guide surélevé du plancher du compartiment.
- 7 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les tubes de réactifs appariés, comme suit :
 - a Tirez la poignée vers vous, puis abaissez-la.
 - b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois plongés dans les tubes.
 - c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.

Charger l'ICB pour la lecture 2

- 1 Relevez les dispositifs d'aspiration du support de réactifs SBS, comme suit :
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers vous, puis relevez-la.
 - b Relâchez la poignée dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée soit bien fixée dans la fente.
- 2 Faites glisser le support de réactifs hors du compartiment de réactifs.
- 3 Retirez le flacon de réactif ICB de la position 1 et retirez le bouchon verseur.
- 4 Placez le bouchon verseur sur le nouveau flacon d'ICB et chargez le flacon à la position 1. Veillez à ce que l'extrémité conique du flacon repose dans l'encoche située à la base du support.

- 5 Glissez le support de réactifs dans le compartiment de réactifs. Alignez le support sur le guide surélevé du plancher du compartiment.
- 6 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les flacons de réactifs SBS, comme suit :
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers vous, puis abaissez-la.
 - b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois abaissés dans les bouchons verseurs.
 - c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.
- 7 Fermez la porte du compartiment des réactifs.
- 8 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour reprendre l'analyse.

Décharger les réactifs

- 1 Lorsque l'analyse est terminée, ouvrez la porte du compartiment de réactifs.
- 2 Relevez les dispositifs d'aspiration du support apparié et du support SBS correspondants comme suit :
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers l'extérieur.
 - b Soulevez la poignée du dispositif d'aspiration tout en la tirant vers l'extérieur.
 - c Relâchez la poignée du dispositif d'aspiration dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée du dispositif d'aspiration demeure de manière sécurisée dans la fente.
- 3 Faites glisser chaque support de réactifs hors du compartiment de réactifs, à l'aide des poignées des supports.
- 4 Retirez chaque flacon du support de réactifs.



AVERTISSEMENT

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et un sarrau de laboratoire adapté à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html.

Réaliser un lavage à l'eau

Un lavage à l'eau est requis après chaque analyse de séquençage afin de laver le système et de vérifier la fluidique. Le lavage de maintenance est une solution de remplacement facultative au lavage à l'eau après analyse. Pour obtenir des directives, consultez la section *Réaliser un lavage de maintenance*, page 68. Pour obtenir des directives, consultez le Guide du système HiSeq 2500 (document n° 15035786).

Si l'instrument n'a pas été utilisé pendant au moins une journée, lavez-le à l'eau avant de démarrer une nouvelle analyse de séquençage.

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Wash | Water** (Lavage | Eau).
- 2 Sélectionnez **Yes** (Oui) pour laver les positions des réactifs appariés, puis sélectionnez **Next** (Suivant).
- 3 Chargez l'instrument avec de l'eau de laboratoire :

- a Remplissez huit flacons SBS avec 250 ml d'eau de laboratoire.
- b Remplissez 10 tubes appariés avec 12 ml d'eau de laboratoire.



REMARQUE

Les tubes et les flacons de lavage sont généralement remplacés tous les six mois, même si l'eau est remplacée chaque semaine environ.

- 4 Assurez-vous qu'une Flow Cell usagée est chargée. Si nécessaire, chargez une Flow Cell usagée.
- 5 Sélectionnez **Next** (Suivant).
- 6 Effectuez une vérification de la fluidique :
 - a Sélectionnez la solution 2 dans la liste déroulante.
 - b Acceptez les valeurs de pompe par défaut.
 - c Sélectionnez **Pump** (Pompe).
 - d Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
- 7 Retirez les tubes d'évacuation correspondant à la Flow Cell du conteneur à déchets.
- 8 Rassemblez les tubes d'évacuation à l'aide d'un parafilm. Assurez-vous de l'alignement régulier de l'extrémité des tubes.
- 9 Placez les extrémités des tubes groupés dans un flacon de 250 ml.
- 10 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour lancer le lavage à l'eau.

| Positions | Durée approximative de l'analyse |
|---|----------------------------------|
| Huit positions SBS | 20 minutes |
| Huit positions SBS et dix positions à paires de bases appariées | 60 minutes |

- 11 Lorsque le lavage est terminé, mesurez le volume distribué.

| Positions | Volume total distribué | Volume distribué par ligne |
|---|------------------------|----------------------------|
| Huit positions SBS | 32 ml | 4 ml |
| Huit positions SBS et dix positions à paires de bases appariées | 72 ml | 9 ml |

- 12 Détachez les tubes d'évacuation et replacez-les dans le flacon à déchets.

Chapitre 5 Séquençage en mode d'analyse rapide

| | |
|--|----|
| Introduction | 51 |
| Flux de travail de séquençage en mode d'analyse rapide | 52 |
| Préparer les réactifs | 52 |
| Effectuer une vérification de volume | 54 |
| Saisir les paramètres de l'analyse | 54 |
| Charger et amorcer les réactifs | 58 |
| Charger la Flow Cell de séquençage | 62 |
| Surveiller l'analyse | 65 |
| Décharger les réactifs | 66 |
| Réaliser un lavage à l'eau | 66 |

Introduction

Le séquençage en mode d'analyse rapide offre la possibilité de générer les amplifiats sur l'instrument HiSeq 2500 ou le système cBot. Générez les amplifiats sur le système cBot pour séquencer des bibliothèques différentes dans chacune des lignes d'une Flow Cell rapide à deux lignes. Après l'hybridation et la première extension du modèle sur le cBot, le processus de génération des amplifiats se termine sur le HiSeq.

Après la préparation des réactifs, les étapes de configuration de l'analyse comprennent la saisie des paramètres de l'analyse, le chargement et l'amorçage des réactifs, le chargement de la Flow Cell et la vérification de la fluidique. Si la génération des amplifiats est effectuée sur l'instrument HiSeq 2500, l'étape de l'amorçage des réactifs est supprimée.

Pour obtenir des renseignements sur la durée des analyses ainsi que sur d'autres caractéristiques de performance, consultez la page relative aux caractéristiques de l'instrument HiSeq 2500 sur le site Web d'Illumina.

Échelonner des analyses

Vous pouvez démarrer une nouvelle analyse sur la Flow Cell A ou sur la Flow Cell B lorsqu'une analyse est en cours sur la Flow Cell adjacente. Pour de plus amples renseignements, consultez la section [Échelonner les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B](#), page 80.

Types d'analyse pour la chimie HiSeq Rapid v2

Le tableau suivant indique les types d'analyse de séquençage et le nombre de cycles possibles pour chaque lecture lorsque vous utilisez la chimie HiSeq Rapid v2. Utilisez ces renseignements lors de la configuration de l'analyse.

Tableau 10 Trousse SBS HiSeq Rapid v2

| Type d'analyse | Cycles de la lecture 1 | Cycles de lecture de l'index 1 (i7) | Cycles de lecture de l'index 2 (i5) | Cycles de la lecture 2 | Nombre total de cycles |
|------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|--|
| Lecture unique, sans index | ≤ 251 | -- | -- | -- | ≤ 251 |
| Lecture unique, index simple | ≤ 251 | 7 ¹ 8 ² | -- | -- | ≤ 258 ¹ ≤ 259 ² |

| Type d'analyse | Cycles de la lecture 1 | Cycles de lecture de l'index 1 (i7) | Cycles de lecture de l'index 2 (i5) | Cycles de la lecture 2 | Nombre total de cycles |
|--------------------------------|------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|--|
| Lecture unique, index double | ≤ 251 | 8 | 8 | -- | ≤ 267 |
| Lecture appariée, sans index | ≤ 251 | -- | -- | ≤ 251 | ≤ 502 |
| Lecture appariée, index simple | ≤ 251 | 7 ¹ 8 ² | -- | ≤ 251 | ≤ 509 ¹ ≤ 510 ² |
| Lecture appariée, index double | ≤ 251 | 8 | 7 + 8 ³ | ≤ 251 | ≤ 525 |

¹ Nombre de cycles pour les bibliothèques à index simple.

² Nombre de cycles pour les bibliothèques à index double.

³ La lecture de l'index 2 d'une analyse appariée à index double comprend sept cycles supplémentaires uniquement chimiques.

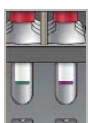
Flux de travail de séquençage en mode d'analyse rapide



Préparez le modèle de bibliothèque et tous les réactifs pour l'analyse. Pour les directives de préparation de bibliothèques, consultez le *Guide de dénaturation et de dilution de bibliothèques des systèmes HiSeq et GAIIx (document n° 15050107)*.



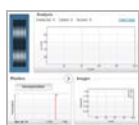
Effectuez une vérification de volume et saisissez les paramètres de l'analyse.



Chargez tous les réactifs pour l'analyse et, si la génération d'amplifiants se fait sur l'instrument, chargez le modèle de bibliothèque préparé.



Vérifiez le flux au moyen d'une Flow Cell usagée. **[Pour la génération d'amplifiants sur le système cBot]** Amorcez les réactifs SBS et mesurez les déchets d'amorçage.



Démarrez l'analyse de séquençage. **[Facultatif]** Après le cycle 1, inspectez le rapport de la première base, puis continuez la lecture 1. L'analyse de séquençage se poursuit avec l'inversion des lectures appariées et la lecture 2 sans que vous ayez à intervenir.



Lorsque l'analyse est terminée, déchargez les réactifs et effectuez un lavage après analyse avec de l'eau.

Préparer les réactifs

Préparez les réactifs SBS et les réactifs de génération d'amplifiants avant de régler les paramètres de l'analyse. Chargez tous les réactifs lorsque vous y êtes invité par le logiciel de commande. Lorsque vous utilisez la chimie rapide, il n'est pas nécessaire de charger de nouveau des réactifs durant l'analyse.



REMARQUE

Le HT1 est utilisé pour diluer les bibliothèques avant le séquençage et ne doit pas être chargé dans l'instrument.

Préparer les réactifs SBS

Suivez les directives ci-dessous pour décongeler les réactifs fournis avec la trousse SBS HiSeq Rapid v2.

Décongeler les réactifs SBS

- 1 Retirez le CRM, l'ITM et l'USM de leur lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C.
- 2 Décongelez-les à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant un maximum de 16 heures. Vous pouvez aussi décongeler l'ITM et l'USM dans de l'eau désionisée à température ambiante pendant environ 90 minutes. Décongelez le CRM dans un bain d'eau *distinct*.



REMARQUE

Changez toujours de gants après avoir manipulé le CRM.

- 3 Inversez pour mélanger les réactifs. Assurez-vous qu'il ne reste pas de précipité dans le flacon d'USM.
- 4 Réservez le CRM, l'ITM et le USM à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.
- 5 Utilisez le CWM, le PW1 et l'USB sortant directement de leur lieu de stockage.

Préparer les réactifs de génération d'amplifiats à lectures appariées

Suivez les directives ci-dessous pour décongeler et préparer les réactifs appariés, les réactifs d'indexage et les réactifs de génération d'amplifiats fournis dans la trousse d'amplifiats à lecture appariée HiSeq Rapid v2.

Décongeler les réactifs

- 1 Retirez les réactifs suivants de leur lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C :
 - ▶ Pour toutes les analyses : AMS, FDR, FLM1, FLM2, FPM, FRM, HP10 et HP11
 - ▶ Pour les analyses indexées : HP14
- 2 Décongelez les réactifs dans un bécher rempli d'eau à température ambiante pendant environ 20 minutes.

Préparer l'AMS, le FDR, le FLM1, le FLM2, le FPM, le FRM, le HP10, le HP11 et le HP14

- 1 Retournez chaque tube pour en mélanger le contenu.
- 2 Placez l'AMS, le FLM1, le FLM2 et le FRM sur de la glace.
- 3 Réservez le FDR, le FPM, le HP10, le HP11 et le HP14 à température ambiante.

Préparer les réactifs de génération d'amplifiats à lecture unique

Suivez les directives ci-dessous pour décongeler et préparer les réactifs d'indexage et de génération d'amplifiats fournis dans la trousse d'amplifiats à lecture unique HiSeq Rapid v2.

Décongeler les réactifs

- 1 Retirez les réactifs suivants de leur lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C :
 - ▶ Pour toutes les analyses : AMS, FDR, FLS, FPM et HP10

- ▶ Pour les analyses à index simple : HP14
 - ▶ Pour les analyses à index double : HP9 et HP14
- 2 Placez les réactifs dans un bécher rempli d'eau à température ambiante pendant environ 20 minutes.

Préparer l'AMS, le FDR, le FLS, le FPM, le HP9, le HP10 et le HP14

- 1 Retournez chaque tube pour en mélanger le contenu.
- 2 Réservez l'AMS et le FLS sur de la glace.
- 3 Réservez le FDR, le FPM, le HP9, le HP10 et le HP14 à température ambiante.

Effectuer une vérification de volume

- 1   l'écran de bienvenue, sélectionnez **Sequence | New Run (Séquence | Nouvelle analyse)**.
- 2 Lorsque vous êtes invité à effectuer une vérification de volume, sélectionnez **Yes** (Oui).
- 3 Placez les tuyaux d'évacuation 1, 2, 3, 6, 7 et 8 de la Flow Cell actuelle dans un flacon d'un litre rempli d'eau désionisée.
Le positionnement des tubes dans de l'eau désionisée permet d'éviter d'endommager les pompes de réactifs.
- 4 Chargez de l'eau de laboratoire dans chacune des huit positions SBS, des 10 positions appariées, et dans la position du modèle de librairie de la Flow Cell.
- 5 Fermez la station de chargement du modèle.
- 6 Cochez la case **Water solution loaded and template loading station closed** (Solution d'eau chargée et station de chargement du modèle fermée), puis sélectionnez **Next** (Suivant).
- 7 Assurez-vous qu'une Flow Cell rapide usagée est chargée dans l'instrument.
- 8 Saisissez l'identifiant de la Flow Cell usagée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).
- 9 Sélectionnez **Pump** (Pompe) pour vérifier le flux.
- 10 Placez les tubes 4 et 5 dans des tubes coniques vides distincts de 15 ml.
- 11 Sélectionnez **Start** (Démarrer) pour lancer la vérification du volume.
Lorsque la vérification du volume est terminée, le volume attendu est de 9,5 ml \pm 10 % pour chaque tube.
- 12 Remplacez tous les tubes dans le flacon à déchets.
- 13 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Saisir les paramètres de l'analyse

Commencez la configuration de l'analyse en saisissant les paramètres de l'analyse dans une série d'écrans sous l'onglet Run Configuration (Configuration de l'analyse). Le logiciel vous guidera à travers les écrans afin de spécifier la connectivité BaseSpace Sequence Hub, de saisir les identifiants des consommables, de sélectionner les options d'indexage et de consigner d'autres paramètres.

Écran Integration (Intégration)

L'écran Integration (Intégration) permet de connecter l'analyse à BaseSpace Sequence Hub.

- 1 **[Facultatif]** Connectez-vous à BaseSpace Sequence Hub ou BaseSpace Onsite Sequence Hub comme suit :
 - a Sélectionnez **BaseSpace** ou **BaseSpace Onsite**.
 - b Si vous avez sélectionné BaseSpace, sélectionnez l'une des options suivantes :
 - ▶ **Storage and Analysis** (Stockage et analyse) : envoie les données de l'analyse à BaseSpace Sequence Hub pour une surveillance à distance et une analyse des données. Cette option requiert une feuille d'échantillons.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Surveillance de l'analyse uniquement) : envoi des fichiers InterOp à BaseSpace Sequence Hub uniquement, ce qui permet de surveiller l'analyse à distance.
 - c Connectez-vous à BaseSpace Sequence Hub ou BaseSpace Onsite Sequence Hub avec l'adresse courriel et le mot de passe de votre compte Myllumina.
- 2 **[Facultatif]** Pour procéder sans vous connecter à BaseSpace Sequence Hub, sélectionnez **None** (Aucun).
- 3 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Storage (Stockage)

- 1 Cochez la case **Save to an output folder** (Enregistrer dans un dossier de sortie), puis sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour accéder à l'emplacement réseau de votre choix.
Si l'analyse est connectée à BaseSpace Sequence Hub pour le stockage et l'analyse, cette étape est facultative.
- 2 Sélectionnez **Zip BCL files** (Compresser les fichiers BCL) pour réduire l'espace de stockage requis.
Si l'analyse est connectée à BaseSpace Sequence Hub, l'option **Zip BCL files** (Compresser les fichiers BCL) est sélectionnée par défaut.



REMARQUE

Le paramètre **Bin Q-Scores** (Éliminer les scores de qualité) est activé par défaut afin de réduire l'espace de stockage requis. Ce paramètre regroupe les scores de qualité sur une plage de valeurs plus étendue sans nuire à la précision ou aux performances.

- 3 Sélectionnez l'une des options Save Auxiliary Files (Enregistrer les fichiers auxiliaires) suivantes :
 - ▶ **Save All Thumbnails** (Enregistrer toutes les miniatures) : enregistre toutes les images miniatures. Une miniature est un échantillon d'images en provenance de nombreuses plaques dans chaque colonne de plaques, ou témoin, combinées en une seule image miniature.
 - ▶ **Save Tile Thumbnails** (Enregistrer les miniatures de plaques) : enregistre les images miniatures des plaques. Les miniatures de plaques représentent une seule plaque au lieu d'un échantillon de plaques dans un témoin.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Flow Cell Setup (Configuration de la Flow Cell)

L'écran Flow Cell Setup (Configuration de la Flow Cell) consigne des renseignements sur la Flow Cell utilisée pour l'analyse.

- 1 Dans le champ Reagent Kit Type (Type de trousse de réactifs), sélectionnez **HiSeq Rapid v2**.
- 2 Numérisez ou saisissez l'identifiant (numéro du code à barres) de la Flow Cell à séquencer.

L'identifiant de la Flow Cell sert à déterminer le type de Flow Cell et la compatibilité des réactifs.

- 3 Confirmez que le type de Flow Cell est **HiSeq Rapid Flow Cell v2**.
- 4 Saisissez un nom d'expérience qui apparaîtra sur chaque écran et permettra l'identification de l'analyse en cours.
- 5 Saisissez un nom d'utilisateur, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Advanced (Paramètres avancés)

- 1 **[Facultatif]** Cochez la case **Confirm First Base** (Confirmer la première base).
Un rapport de la première base est automatiquement généré pour chaque analyse. Si vous cochez cette option, le rapport de la première base s'ouvrira avant que l'analyse puisse poursuivre.
- 2 **[Facultatif]** Décochez la case **Align to PhiX** (Aligner sur PhiX) pour chaque ligne ne contenant pas le contrôle PhiX.
Par défaut, toutes les lignes sont cochées pour que l'alignement soit fait.
Vous pouvez également sélectionner les lignes de l'image de la Flow Cell pour ajouter ou supprimer des lignes en vue d'un alignement PhiX.



REMARQUE

Avec les logiciels HCS v2.2 et RTA v1.18, vous n'avez pas besoin d'une ligne de contrôle dédiée; elle est facultative.

- 3 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Recipe (Formule)

Une formule est générée automatiquement à partir des renseignements saisis à l'écran Recipe (Formule).

- 1 Choisissez parmi les options de type d'index suivantes :
 - ▶ **No Index** (Sans index) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée sans index.
 - ▶ **Single Index** (Index simple) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec une seule lecture d'indexage.
 - ▶ **Dual Index** (Index double) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec deux lectures d'indexage.
 - ▶ **Custom** (Personnalisé) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec un nombre personnalisé de cycles pour les lectures d'index.
- 2 Pour l'option Dual Index (Index double) ou l'option Custom (Personnalisé), sélectionnez un format de Flow Cell, soit **Single Read** (À lecture unique) ou **Paired End** (Appariée).
- 3 Entrez le nombre de cycles pour la lecture 1 et la lecture 2, s'il y a lieu.
Chaque lecture comprend un cycle de plus que le nombre de cycles analysés. Par exemple, pour effectuer 100 cycles pour la lecture 1, entrez 101.
- 4 Pour l'option d'indexage **Custom** (Personnalisé), saisissez le nombre de cycles pour les lectures d'index.



REMARQUE

Les longueurs de lecture peuvent ne pas être identiques.

- 5 Vérifiez les paramètres de chimie suivants, générés automatiquement :
 - a **SBS** : trousse SBS HiSeq Rapid v2

- b Trousse d'amplifiats : trousse d'amplifiats à lecture appariée HiSeq Rapid v2 ou trousse d'amplifiats à lecture unique HiSeq Rapid v2
- 6 **[Facultatif]** Cochez la case **Use Existing Recipe** (Utiliser la formule existante) pour utiliser une formule personnalisée.

Écran Sample Sheet (Feuille d'échantillons)

La feuille d'échantillons est facultative, sauf si vous utilisez BaseSpace Sequence Hub pour l'analyse des données, pour réaliser une analyse indexée ou pour planifier la surveillance d'une performance de démultiplexage avec le visualiseur d'analyse de séquençage (SAV).

- 1 Sélectionnez l'une des options suivantes pour indiquer la méthode de génération d'amplifiats :
 - ▶ **On-Board Cluster Generation** : générer les amplifiats sur l'instrument HiSeq seulement.
 - ▶ **Template Hybridization on cBot** : la génération d'amplifiats commence sur l'instrument cBot 2 ou le cBot.
- 2 Sélectionnez **Next** (Suivant).
- 3 Dans le champ Sample Sheet (Feuille d'échantillons), sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour localiser la feuille d'échantillons.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Reagents (Réactifs)

L'écran Reagents (Réactifs) consigne des renseignements sur les trousse de réactifs utilisées pour l'analyse.

- 1 Numérisez ou saisissez l'identifiant de la trousse de réactifs SBS (numéro du code à barres commençant par RGT).
- 2 Pour les analyses à lectures appariées, numérisez ou saisissez l'identifiant de la trousse de réactifs pour la trousse d'amplifiats.
- 3 Sélectionnez la trousse de réactifs SBS :
 - ▶ Sélectionnez **500 Cycles** pour une trousse de 500 cycles. Le nombre de cycles restants est défini sur 525 par défaut.
 - ▶ Sélectionnez **200 Cycles** pour une trousse de 200 cycles. Le nombre de cycles restants est défini sur 225 par défaut.
 - ▶ Sélectionnez **50 Cycles** pour une trousse de 50 cycles. Le nombre de cycles restants est défini sur 74 par défaut.
 - ▶ Sélectionnez **Custom** (Personnalisé) pour une trousse partielle ou plusieurs trousse de 50 cycles. Dans le champ Cycles Remaining (Cycles restants), entrez le nombre de cycles SBS que doivent couvrir les réactifs.



REMARQUE

Pour les trousse partielles, le logiciel effectue un compte à rebours du nombre de cycles saisi. Lorsqu'il reste peu de cycles, le logiciel vous invite à charger de nouveaux réactifs.

- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Review (Révision)

- 1 Vérifiez les paramètres de l'analyse depuis l'écran Review (Révision).
- 2 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour continuer ou **Back** (Retour) pour modifier les paramètres.

Charger et amorcer les réactifs

Une fois définis les paramètres de l'analyse, chargez les réactifs SBS, les réactifs de génération d'amplifiats et d'indexage ainsi que les réactifs appariés destinés à l'analyse, puis amorcez les réactifs dans le système fluidique. Le logiciel vous guide à travers ces étapes à l'aide d'une série d'écrans sous l'onglet Pre-Run Setup (Configuration avant analyse).



REMARQUE

L'amorçage des réactifs n'est pas nécessaire pour les Flow Cell dont la génération des amplifiats se fait sur l'instrument HiSeq.

Charger les réactifs SBS

- 1 Ouvrez la porte du compartiment de réactifs.
- 2 Relevez les dispositifs d'aspiration du support de réactifs SBS, comme suit :
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers vous, puis relevez-la.
 - b Relâchez la poignée dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée soit bien fixée dans la fente.
- 3 Faites glisser le support de réactifs SBS hors du compartiment de réactifs.
- 4 Remplacez le bouchon de chaque flacon de réactifs par un bouchon verseur.



ATTENTION

Traitez le flacon de CRM en dernier, après avoir chargé tous les autres réactifs, pour éviter la contamination croisée. Changez toujours de gants après avoir manipulé le CRM.

- 5 Placez chaque tube de réactif SBS sur le support, dans les positions numérotées associées. Veillez à ce que l'extrémité conique du flacon repose dans l'encoche située à la base du support.

Tableau 11 Positions des réactifs SBS

| Position | Réactif | Description |
|----------|---------|---|
| 1 | IMT | Mélange principal d'incorporation |
| 2 | PW1 | 25 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire |
| 3 | USM | Mélange de balayage universel |
| 4 | PW1 | 25 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire |
| 5 | USB | Tampon de séquençage universel |
| 6 | USB | Tampon de séquençage universel |
| 7 | CRM | Mélange principal de réactif de clivage |
| 8 | CWM | Mélange de lavage de clivage |

- 6 Glissez le support SBS dans le compartiment de réactifs. Alignez le support sur le guide surélevé du plancher du compartiment.
- 7 Cochez la case **PW1 (25 ml) loaded** (PW1 [25 ml] chargé).
- 8 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les flacons de réactifs SBS, comme suit.
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers vous, puis abaissez-la.

- b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois abaissés dans les bouchons verseurs.
- c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.

Charger les réactifs de génération d'amplifiats

- 1 Relevez les dispositifs d'aspiration du support de réactifs appariés, comme suit :
 - a Tirez la poignée vers vous, puis soulevez-la.
 - b Relâchez la poignée dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée soit bien fixée dans la fente.
- 2 Faites glisser le support de réactifs appariés hors du compartiment de réactifs à l'aide de la poignée du support.
- 3 Débouchez les tubes de réactifs et placez chaque tube sur le support dans la position numérotée qui lui est associée ou selon l'étiquette de couleur correspondante.

Tableau 12 Flow Cell à lecture appariée

| Position | Réactif | Description |
|----------|---------|--|
| 10 | FRM | Mélange de resynthèse rapide |
| 11 | FLM2 | Mélange de linéarisation rapide 2 (lecture 2) |
| 12 | FLM1 | Mélange de linéarisation rapide 1 (lecture 1) |
| 13 | AMS | Mélange d'amplification rapide |
| 14 | FPM | Prémélange rapide |
| 15 | FDR | Réactif de dénaturation rapide (contient du formamide) |
| 16 | HP11 | Primer de lecture 2 |
| 17 | HP14* | Primer d'index i7 |
| 18 | HP10 | Primer de lecture 1 |
| 19 | PW1 | 10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire |

* Le HP14 n'est nécessaire que pour les analyses indexées. Si le HP14 n'est pas utilisé, chargez un tube conique de 15 ml contenant 10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire à la position n° 17.

Tableau 13 Flow Cell à lecture unique

| Position | Réactif | Description |
|----------|---------|--|
| 10 | PW1 | 10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire |
| 11 | PW1 | 10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire |
| 12 | PW1 | 10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire |
| 13 | AMS | Mélange d'amplification rapide |
| 14 | FPM | Prémélange rapide |
| 15 | FDR | Réactif de dénaturation rapide (contient du formamide) |
| 16 | HP9* | Primer d'index i5 |
| 17 | HP14* | Primer d'index i7 |
| 18 | HP10 | Primer de lecture 1 |
| 19 | FLS | Solution de linéarisation rapide |

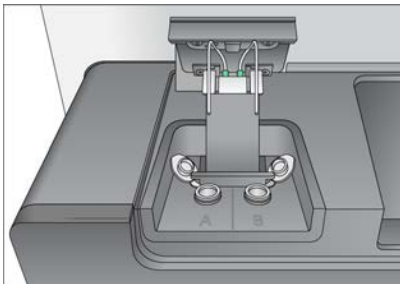
* Le HP9 n'est nécessaire que pour les analyses à index double. Le HP14 est nécessaire pour toutes les options d'indexage. Si le HP9 et le HP14 ne sont pas utilisés, chargez un tube conique de 15 ml contenant 10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire à chacune des positions inutilisées.

- 4 Glissez le support de réactifs appariés dans le compartiment de réactifs. Alignez le support sur le guide surélevé du plancher du compartiment.
- 5 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les tubes de réactifs appariés, comme suit :
 - a Tirez la poignée vers vous, puis abaissez-la.
 - b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois plongés dans les tubes.
 - c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.

Charger le modèle

Chargez le modèle de librairie pour effectuer la génération d'amplifiats sur l'instrument HiSeq. Si les amplifiats de la Flow Cell ont été générés sur le cBot, chargez plutôt deux tubes Eppendorf contenant 1 ml d'eau désionisée.

Figure 17 Station de chargement du modèle



- 1 Chargez le tube Eppendorf contenant 420 µl 2 à 20 pM du modèle de librairie du bon côté de la station de chargement, comme suit :
 - a Soulevez la porte de la station de chargement.
 - b Retirez le tube Eppendorf contenant l'eau et remplacez-le par le tube Eppendorf contenant le modèle.
 - c Sécurisez les couvercles sous la barre derrière les tubes pour éviter toute interférence avec les dispositifs d'aspiration.
 - d Fermez lentement la porte de la station de chargement. Assurez-vous du bon alignement des dispositifs d'aspiration avec les tubes Eppendorf lorsque le couvercle est fermé.
- 2 Cochez la case **Template loaded and template loading station closed** (Modèle chargé et station de chargement du modèle fermée), puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Amorcer les réactifs

Amorcez les réactifs seulement si une trousse d'échantillon cBot double rapide a été utilisée pour effectuer l'hybridation du modèle sur le système cBot. Sinon, ne faites pas l'amorçage des réactifs et passez à la section [Charger la Flow Cell de séquençage](#), page 62.

Les étapes d'amorçage des réactifs comprennent le nettoyage du portoir de Flow Cell, le chargement d'une Flow Cell usagée, la vérification de l'adéquation du flux et le démarrage de l'amorce.

Charger une Flow Cell d'amorçage

- 1 Rincez une Flow Cell *usagée* avec de l'eau de laboratoire. Séchez-la à l'aide d'un chiffon pour nettoyage de lentilles ou d'un tissu non pelucheux.

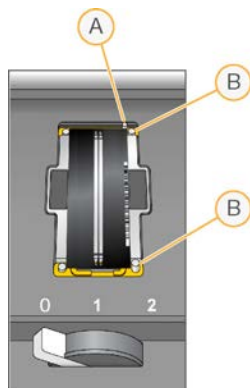


REMARQUE

Amorcez toujours les réactifs avec une Flow Cell usagée. Vous pouvez utiliser la Flow Cell d'une analyse précédente pour l'amorçage des réactifs en vue d'une analyse ultérieure ou d'un lavage après analyse.

- 2 Nettoyez-la à l'aide de lingettes alcoolisées et d'un chiffon pour nettoyage de lentilles.
- 3 Placez la Flow Cell sur le portoir de Flow Cell, les ports d'entrée et de sortie orientés **vers le bas** et le code à barres vers la droite. Veillez à ce que la flèche sur le côté gauche de la Flow Cell, qui indique le sens du flux, pointe vers l'instrument.
- 4 Faites glisser doucement la Flow Cell vers les broches de guidage supérieure et de droite jusqu'à ce qu'elle s'enclenche.

Figure 18 Positionnement de la Flow Cell



- A Broche de guidage supérieure
- B Broches de guidage de droite

- 5 Retirez votre main de la Flow Cell afin d'éviter que l'alignement ne dévie avec le temps.
- 6 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour engager la décompression et maintenir la Flow Cell.
Lorsque le levier de la Flow Cell est vert, la décompression est en cours. Si le voyant du levier n'est pas vert, consultez la section *Problèmes possibles de configuration de l'analyse*, page 76.
- 7 Attendez environ cinq secondes, puis placez lentement le levier de Flow Cell en position 2.
Lorsque le levier de Flow Cell est vert et ne clignote plus, cela signifie que les collecteurs sont en place et que la Flow Cell est prête.
- 8 À l'écran Load Priming Flow Cell (Charger la Flow Cell d'amorçage), saisissez l'identifiant de la Flow Cell.
- 9 Assurez-vous que la case **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) est cochée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Vérifier que le flux est correct

La vérification du flux confirme que la Flow Cell et les joints sont correctement installés et que le collecteur est engagé.

- 1 Sélectionnez la position **2** (eau de laboratoire) dans la liste déroulante.
- 2 Vérifiez les valeurs par défaut suivantes :
 - ▶ Volume : **250**
 - ▶ Taux d'aspiration : **1 500**

► Taux de distribution : **2 000**

- 3 Sélectionnez **Pump** (Pompe).
- 4 Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
- 5 Si trop de bulles sont présentes, procédez comme suit :
 - a Vérifiez l'absence d'obstructions au niveau des joints.
 - b Diminuez le taux d'aspiration à 1 000.
 - c Pompez 250 µl d'eau supplémentaires vers la Flow Cell.
 - d Si le problème persiste, retirez la Flow Cell, répétez les étapes de nettoyage, puis rechargez la Flow Cell.

Positionner les tubes et démarrer l'amorçage

- 1 Desserrez les huit tuyaux d'évacuation correspondant à la Flow Cell et retirez-les du conteneur à déchets.
- 2 Placez les tubes d'évacuation 4 et 5 dans des tubes distincts de 15 ml.
- 3 Placez les tubes d'évacuation 1, 2, 3, 6, 7 et 8 dans un flacon contenant de l'eau de laboratoire.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant), puis sélectionnez **Start Prime** (Démarrer l'amorçage). Surveillez la progression de l'amorçage à l'écran Prime (Amorçage).
- 5 Lorsque l'amorçage est terminé, mesurez les déchets et vérifiez que le volume est de 2,5 ml ± 10 %, c'est-à-dire 500 µl par réactif et par ligne.
- 6 Remplacez les tubes 4 et 5 dans le conteneur à déchets.
- 7 Laissez les tubes 1, 2, 3, 6, 7 et 8 dans le flacon contenant de l'eau de laboratoire.
- 8 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Charger la Flow Cell de séquençage

Les étapes de chargement de la Flow Cell en vue du séquençage comprennent le retrait de la Flow Cell d'amorçage, le nettoyage du portoir, le chargement de la Flow Cell en amplifiats ou d'une nouvelle Flow Cell, et la vérification que le flux est adéquat. Si la génération d'amplifiats a commencé sur le cBot, chargez la Flow Cell en amplifiats. Pour la génération d'amplifiats sur l'instrument, chargez une nouvelle Flow Cell.

Retirer la Flow Cell usagée

- 1 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour libérer les collecteurs.
- 2 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 0 pour désengager le joint de décompression et libérer la Flow Cell.
- 3 Soulevez la Flow Cell utilisée du portoir de Flow Cell.

Nettoyer le portoir de Flow Cell

- 1 Enfilez une nouvelle paire de gants en latex sans talc.
- 2 À l'aide d'un tissu non pelucheux imprégné d'eau de laboratoire, essuyez la surface du portoir de Flow Cell afin de retirer les sels.

- 3 À l'aide d'une lingette alcoolisée ou d'un tissu non pelucheux imprégné d'éthanol ou d'isopropanol, essuyez la surface du portoir de Flow Cell. Veillez à ce que l'alcool ne s'écoule pas dans les trous de décompression ou autour des collecteurs.
- 4 Le cas échéant, séchez la platine à l'aide d'un chiffon de laboratoire peu pelucheux.
- 5 Inspectez le portoir de Flow Cell pour vous assurer qu'il ne contient pas de peluche et que les trous de décompression ne sont pas obstrués.

Figure 19 Inspecter les trous de décompression



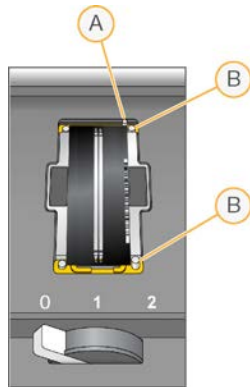
Nettoyer la Flow Cell

- 1 Retirez la Flow Cell en amplifiats de son conteneur en utilisant une paire de plastistats.
- 2 Rincez la Flow Cell avec de l'eau de laboratoire. Séchez à l'aide d'un chiffon pour nettoyage de lentilles.
- 3 Pliez une lingette alcoolisée jusqu'à ce qu'elle fasse la taille de la Flow Cell environ.
- 4 Tenez à deux doigts les bords de la Flow Cell de manière à ce que les ports d'entrée et de sortie soient face vers le **haut**.
- 5 Essuyez chaque côté de la Flow Cell d'un seul mouvement de balayage. Répétez jusqu'à ce qu'elle soit propre, en repliant la lingette d'alcool entre chaque mouvement.
- 6 Séchez à l'aide d'un chiffon sec pour nettoyage de lentilles.
- 7 Protégez la Flow Cell de la poussière jusqu'à ce que vous soyez prêt à la charger dans l'instrument.

Charger la Flow Cell de séquençage

- 1 Placez la Flow Cell sur le portoir de Flow Cell, les ports d'entrée et de sortie orientés **vers le bas** et le code à barres vers la droite. Veillez à ce que la flèche sur le côté gauche de la Flow Cell, qui indique le sens du flux, pointe vers l'instrument.
- 2 Faites glisser doucement la Flow Cell vers les broches de guidage supérieure et de droite jusqu'à ce qu'elle s'enclenche.

Figure 20 Positionnement de la Flow Cell



- A Broche de guidage supérieure
- B Broches de guidage de droite

- 3 Retirez votre main de la Flow Cell afin d'éviter que l'alignement ne dévie avec le temps.
- 4 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour engager la décompression et maintenir la Flow Cell.
Lorsque le levier de la Flow Cell est vert, la décompression est en cours. Si le voyant du levier n'est pas vert, consultez la section *Problèmes possibles de configuration de l'analyse*, page 76.
- 5 Attendez environ cinq secondes, puis placez lentement le levier de Flow Cell en position 2.
Lorsque le levier de Flow Cell est vert et ne clignote plus, cela signifie que les collecteurs sont en place et que la Flow Cell est prête.
- 6 Assurez-vous que la case **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) est cochée.

Vérifier que le flux est correct

La vérification du flux confirme que la Flow Cell et les joints sont correctement installés et que le collecteur est engagé.

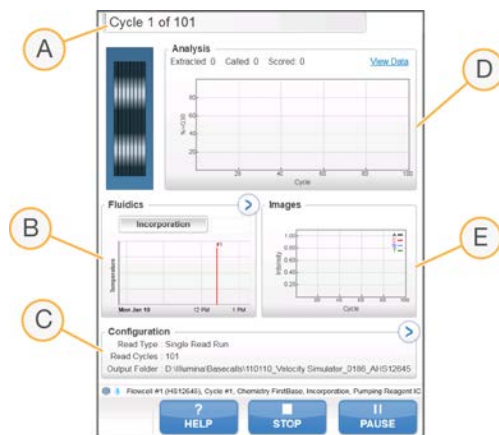
- 1 Sélectionnez la position 5 dans la liste déroulante.
- 2 Vérifiez les valeurs par défaut suivantes :
 - ▶ Volume : 250
 - ▶ Taux d'aspiration : 1 500
 - ▶ Taux de distribution : 2 000
- 3 Assurez-vous du bon positionnement des tubes d'évacuation :
 - ▶ Les tubes d'évacuation 4 et 5 sont dans le conteneur à déchets.
 - ▶ Les tubes 1, 2, 3, 6, 7 et 8 sont dans un flacon contenant de l'eau de laboratoire.
- 4 Sélectionnez **Pump** (Pompe).
- 5 Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
- 6 Si trop de bulles sont présentes, procédez comme suit :
 - a Vérifiez que les joints du collecteur ne sont pas obstrués et recommencez la procédure à l'aide de la position 6 afin d'éviter de vider la position 5.
 - b Diminuez le taux d'aspiration à 1 000.

- c Pompez 250 µl supplémentaires vers la Flow Cell.
- 7 Sélectionnez **Next** (Suivant).
- 8 Assurez-vous que le levier de Flow Cell est vert, puis fermez la porte du compartiment de Flow Cell.
- 9 Assurez-vous que les cases à cocher **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) et **Door Closed** (Porte fermée) sont sélectionnées, puis cliquez sur **Next** (Suivant).
- 10 Sélectionnez **Start** (Démarrer) pour commencer l'analyse de séquençage.

Surveiller l'analyse

- 1 Surveillez les indicateurs de l'analyse à l'écran Run Overview (Aperçu de l'analyse).

Figure 21 Écran Run Overview (Aperçu de l'analyse)



- A **Barre de progression** : surveillance du nombre de cycles terminés.
- B **Graphique de la fluidique** : développement de la section de la fluidique pour surveiller les étapes de la chimie.
- C **Configuration de l'analyse** : vérification des paramètres de l'analyse en cours.
- D **Graphique d'analyse** : contrôle des scores de qualité par cycle.
- E **Graphique d'images** : contrôle des intensités par cycle.

Rapport de la première base

Si vous avez sélectionné l'option de confirmation de la première base au moment de la configuration de l'analyse, la boîte de dialogue de confirmation de la première base s'ouvre automatiquement une fois l'imagerie du premier cycle terminée. L'analyse s'interrompt à cette étape.

- 1 Vérifiez le rapport de la première base dans la boîte de dialogue de confirmation.
- 2 Si les résultats sont satisfaisants, sélectionnez **Continue** (Continuer).

Afficher les indicateurs de l'analyse

Lorsque des indicateurs d'analyse sont disponibles, le Sequencing Analysis Viewer (SAV) s'ouvre automatiquement et les affiche. Les indicateurs apparaissent sous forme de tracés, de graphiques et de tableaux. Pour plus de renseignements, consultez le *Guide de l'utilisateur du logiciel Sequencing Analysis Viewer (document n° 15020619)*.

- 1 Pour afficher les indicateurs mis à jour, sélectionnez **Refresh** (Actualiser) à tout moment pendant l'analyse.

Décharger les réactifs

- 1 Lorsque l'analyse est terminée, ouvrez la porte du compartiment de réactifs.
- 2 Relevez les dispositifs d'aspiration du support apparié et du support SBS correspondants comme suit :
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers l'extérieur.
 - b Soulevez la poignée du dispositif d'aspiration tout en la tirant vers l'extérieur.
 - c Relâchez la poignée du dispositif d'aspiration dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée du dispositif d'aspiration demeure de manière sécurisée dans la fente.
- 3 Faites glisser chaque support de réactifs hors du compartiment de réactifs, à l'aide des poignées des supports.
- 4 Retirez chaque flacon du support de réactifs.



AVERTISSEMENT

Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et un sarrau de laboratoire adapté à l'exposition à ces risques. Traitez les réactifs usagés comme des déchets chimiques et éliminez-les conformément aux lois et règles régionales, nationales et locales en vigueur. Pour obtenir des renseignements supplémentaires sur l'environnement, la santé et la sécurité, consultez la fiche signalétique sur support.illumina.com/sds.html.

- 5 Retirez le tube Eppendorf de la station de chargement du modèle.
Le liquide restant dans le tube après l'analyse est hautement dilué et ne doit pas être réutilisé.

Réaliser un lavage à l'eau

Un lavage à l'eau est requis après chaque analyse rapide afin de laver le système et de vérifier la fluidique. Si l'instrument n'a pas été utilisé pendant au moins une journée, lavez-le à l'eau avant de démarrer une nouvelle analyse de séquençage.

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Wash | Water** (Lavage | Eau).
- 2 Sélectionnez **Yes** (Oui) pour laver les positions des réactifs appariés, puis sélectionnez **Next** (Suivant).
- 3 Chargez l'instrument avec de l'eau de laboratoire comme suit :
 - a Remplissez huit flacons SBS avec 250 ml d'eau de laboratoire.
 - b Remplissez 10 tubes appariés avec 12 ml d'eau de laboratoire.
 - c Versez 1 ml d'eau de laboratoire dans un tube Eppendorf.



REMARQUE

Les tubes et les flacons de lavage sont généralement remplacés tous les six mois, même si l'eau est remplacée chaque semaine environ.

- 4 Assurez-vous qu'une Flow Cell usagée est chargée. Si nécessaire, chargez une Flow Cell usagée.
- 5 Sélectionnez **Next** (Suivant).
- 6 Effectuez une vérification de la fluidique :
 - a Sélectionnez la position **2** dans la liste déroulante.
 - b Acceptez les valeurs de pompe par défaut.
 - c Sélectionnez **Pump** (Pompe).
 - d Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
- 7 Retirez du conteneur à déchets les tubes d'évacuation correspondant à la Flow Cell.
- 8 Placez les extrémités des tubes 4 et 5 dans un récipient vide.
- 9 Placez les extrémités des autres tubes dans un flacon d'eau propre pour éviter que de l'air s'infilte dans les pompes à seringue.
- 10 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour lancer le lavage à l'eau.

| Positions | Durée approximative de l'analyse |
|--|----------------------------------|
| 8 positions SBS | 20 minutes |
| 8 positions SBS et 10 positions appariées | 60 minutes |
| 8 positions SBS, 10 positions appariées, et une position de chargement du modèle | 10 minutes |

- 11 Lorsque le lavage est terminé, mesurez le volume distribué.

| Positions | Volume distribué |
|--|------------------|
| 8 positions SBS, 10 positions appariées, et une position de chargement du modèle | 9,5 ml par ligne |

- 12 Détachez les tubes d'évacuation et remplacez-les dans le flacon à déchets.

Chapitre 6 Maintenance

| | |
|--|----|
| Introduction | 68 |
| Réaliser un lavage de maintenance | 68 |
| Basculer entre les modes de séquençage | 73 |
| Laisser l'instrument inactif | 74 |
| Arrêter l'instrument | 74 |

Introduction

Les procédures de maintenance garantissent des performances continues de l'instrument.

- ▶ En vue des périodes d'inactivité, arrêtez l'instrument ou effectuez les étapes pertinentes de préparation à l'inactivité.
- ▶ En plus du lavage à l'eau effectué à la fin de chaque analyse, faites régulièrement des lavages de maintenance pour passer adéquatement d'un mode de séquençage à l'autre et entretenir le système fluidique.

Les lavages réguliers de l'instrument permettent de conserver le niveau de performance en rinçant le système fluidique et en évitant l'accumulation de sel et la contamination croisée des réactifs et des librairies.

Maintenance préventive

Illumina vous recommande de planifier un service de maintenance préventive chaque année. Si vous n'êtes pas lié par un contrat de services, communiquez avec le gestionnaire de compte commercial de votre zone ou avec l'assistance technique d'Illumina pour organiser un service de maintenance préventive facturable.

Réaliser un lavage de maintenance

Réalisez un lavage de maintenance lorsque vous y êtes invités par le logiciel tous les 10 jours ou lorsque vous passez du mode à débit élevé au mode rapide, et vice versa. Après une analyse à débit élevé, un lavage de maintenance est recommandé au lieu d'un lavage à l'eau. Le lavage de maintenance dure environ 90 minutes et suit l'un des deux flux de travail possibles. Suivez le protocole de lavage de maintenance approprié, selon que vous utilisez ou non une solution de ProClin 300.

- ▶ **Lavage normal au Tween 20 et au ProClin 300** : lavage du système au moyen d'une solution de Tween 20 et de ProClin 300 préparée par l'utilisateur. Consultez la section *Lavage au Tween 20 et au ProClin 300*, page 69.
- ▶ **Méthode de substitution, au Tween 20** : lavage du système au moyen d'une solution de Tween 20 préparée par l'utilisateur. Un lavage à l'eau est requis avant une période d'inactivité de l'instrument. Consultez la section *Lavage au Tween 20*, page 71.

L'écran Load Gasket (Charger le joint) s'ouvre et vous invite à effectuer un lavage de maintenance tous les 10 jours et lorsque vous passez du mode d'analyse rapide à un mode à débit élevé. Remplacez le joint à dix ports dans le collecteur avant et le joint à huit ports dans le collecteur arrière avant de procéder au lavage, même si cet écran ne s'affiche pas.

Lavage de maintenance au Tween 20 et au ProClin 300


Préparer la solution de lavage de maintenance

Préparez cinq litres de solution de lavage de maintenance à utiliser sur un instrument. La solution peut être stockée jusqu'à 30 jours à température ambiante et utilisée jusqu'à trois fois au cours de cette période.

Éliminez la solution de lavage conformément aux normes de sécurité gouvernementales de votre région.

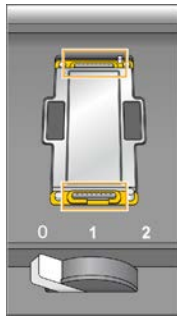
- 1 Combinez les volumes suivants pour diluer le Tween 20, en ajoutant d'abord l'eau :
 - ▶ Eau de laboratoire (225 ml)
 - ▶ Tween 20 (25 ml)Ces volumes permettent d'obtenir une solution de Tween 20 à 10 % environ.
- 2 Placez un barreau d'agitateur dans une bonbonne vide ayant une contenance minimale de six litres.
- 3 Combinez les volumes suivants dans la bonbonne, en ajoutant d'abord l'eau :
 - ▶ Eau de laboratoire (750 ml)
 - ▶ Tween 20 à 10 % (250 ml)
 - ▶ ProClin 300 (1,5 ml)Ces volumes permettent d'obtenir une solution de Tween 20 à 2,5 % et de ProClin 300 à 0,15 % environ.
- 4 Mélangez soigneusement sur une plaque d'agitation.
- 5 Ajoutez quatre litres d'eau de laboratoire.
Ces volumes permettent d'obtenir une solution de Tween 20 à 0,5 % et de ProClin 300 à 0,03 % environ.
- 6 Continuez d'agiter jusqu'à ce que la solution soit bien mélangée.
- 7 Réservez dans un récipient fermé à température ambiante.

Lavage au Tween 20 et au ProClin 300

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Wash | Maintenance** (Lavage | Maintenance).
 - 2 **[Pour les modes à débit élevé]** Si l'analyse comportait une lecture d'indexage ou une rotation de paires de bases appariées, sélectionnez **Yes** (Oui) pour exécuter le lavage des positions des réactifs appariés. Sinon, sélectionnez **No** (Non).
 - 3 Sélectionnez **Next** (Suivant).
 - 4 Si vous utilisez une nouvelle solution de lavage de maintenance, préparez les composants de lavage comme suit :
 - a **[Pour le mode d'analyse rapide]** Dans deux tubes de type Eppendorf, versez 1,6 ml de solution, puis chargez les tubes dans la station de chargement.
 - b Remplissez huit flacons SBS avec 250 ml de solution.
 - c Remplissez dix tubes appariés avec 12 ml de solution.
 - d Attribuez une position du support de réactifs à chaque flacon et à chaque tube. Conservez ces positions pour chaque lavage ultérieur afin d'éviter toute contamination croisée par le réactif présent sur les dispositifs d'aspiration.
 - 5 Si vous avez stocké la solution de lavage de maintenance provenant d'une analyse précédente, préparez les composants de lavage comme suit :
 - a Remplissez les flacons et les tubes de la solution stockée et renversez-les pour la mélanger.
 - b Ne réutilisez la solution stockée que deux fois au maximum après la première utilisation.
 - c Chargez les flacons et les tubes sur l'instrument dans les positions attribuées du support de réactifs.
-  **REMARQUE**
Généralement, le remplacement mensuel des tubes et des flacons de lavage est suffisant.
- 6 Videz le flacon à déchets.

- 7 Cochez la case **Wash solution loaded and template loading station closed** (Solution de lavage chargée et station de chargement du modèle fermée), puis sélectionnez **Next** (Suivant).
- 8 Retirez la Flow Cell de la platine de Flow Cell et mettez-la de côté.
- 9 Enfilez une nouvelle paire de gants en latex sans talc.
- 10 Appliquez une légère pression sur l'un des côtés du joint jusqu'à ce que l'autre côté se soulève. Utilisez des brucelles pour attraper et retirer le joint. Répétez l'opération pour retirer le joint arrière.

Figure 22 Retrait des joints de collecteur usagés



- 11 Placez un nouveau joint à dix ports dans la fente avant du portoir de la Flow Cell et un nouveau joints à huit ports dans la fente arrière. Appuyez légèrement pour les mettre en place.
- 12 Chargez de nouveau la Flow Cell que vous avez retirée pour installer les nouveaux joints.
- 13 Assurez-vous de cocher la case **Vacuum Engaged** (Décompression en cours), puis sélectionnez **Next** (Suivant).
- 14 Effectuez une vérification de la fluidique :
 - a Sélectionnez la solution 2 dans la liste déroulante.
 - b Acceptez les valeurs par défaut de la pompe et sélectionnez **Pump** (Pompe).
 - c Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
 - d Si vous observez un flux continu de bulles, remplacez le joint et répétez l'opération de vérification de la fluidique.
- 15 Retirez du conteneur à déchets les tubes d'évacuation correspondant à la Flow Cell.
- 16 **[Pour les modes à débit élevé]** Rassemblez les huit tubes d'évacuation à l'aide d'un parafilm. Assurez-vous de l'alignement des extrémités des tubes et placez les tubes regroupés dans un flacon de 250 ml.
- 17 **[Pour le mode d'analyse rapide]** Placez les extrémités des tubes 4 et 5 dans un récipient vide. Placez les extrémités des autres tubes dans un flacon d'eau de laboratoire pour éviter l'infiltration d'air dans les pompes à seringue.
- 18 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour lancer le lavage.
- 19 Une fois le lavage terminé, sélectionnez **Return to Start** (Retourner au début).

20 Mesurez le volume distribué.

| Positions | Débit élevé | Rapide |
|------------------------|--------------------|-------------------|
| 8 positions SBS | 82 ml | 29 ml |
| 10 positions appariées | 76 ml | 30 ml |
| 1 position de modèle | -- | 1,2 ml |
| Toutes les positions | 19,75 ml par ligne | 30,1 ml par ligne |



REMARQUE

Tous les flacons et tous les tubes sont remplis au maximum de leur capacité de manière à assurer un rinçage total des dispositifs d'aspiration. Cependant, le volume distribué dans chaque position varie. C'est pourquoi les flacons et les tubes contiennent des volumes différents lorsque le lavage est terminé.

21 Détachez les tubes d'évacuation et replacez-les dans le conteneur à déchets.

Lavage de maintenance au Tween 20

Préparer la solution de lavage de maintenance

Préparez toujours une nouvelle solution de lavage de maintenance au Tween 20. Préparez cinq litres de solution de lavage de maintenance. Ce volume suffit pour laver les deux côtés d'un instrument.

Éliminez la solution de lavage conformément aux normes de sécurité gouvernementales de votre région.

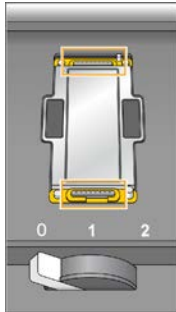
- 1 Combinez les volumes suivants pour diluer le Tween 20, en ajoutant d'abord l'eau :
 - ▶ Eau de laboratoire (225 ml)
 - ▶ Tween 20 (25 ml)
 Ces volumes permettent d'obtenir une solution de Tween 20 à 10 % environ.
- 2 Placez un barreau d'agitateur dans une bonbonne vide ayant une contenance minimale de six litres.
- 3 Combinez les volumes suivants dans la bonbonne, en ajoutant d'abord l'eau :
 - ▶ Eau de laboratoire (750 ml)
 - ▶ Tween 20 à 10 % (250 ml)
 Ces volumes permettent d'obtenir une solution de Tween 20 à 2,5 % environ.
- 4 Mélangez soigneusement sur une plaque d'agitation.
- 5 Ajoutez quatre litres d'eau de laboratoire pour obtenir une solution de Tween 20 à 0,5 % environ.
- 6 Continuez d'agiter jusqu'à ce que la solution soit bien mélangée.
- 7 Procédez immédiatement à la configuration du lavage.

Lavage au Tween 20

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Wash | Maintenance** (Lavage | Maintenance).
- 2 Chargez une nouvelle solution de lavage de maintenance dans l'instrument, comme suit :
 - a Remplissez huit flacons SBS de 250 ml de nouvelle solution de lavage.
 - b Remplissez 10 tubes appariés de 12 ml de nouvelle solution de lavage.
- 3 Videz le flacon à déchets.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).

- 5 Retirez la Flow Cell de la platine de Flow Cell et mettez-la de côté.
- 6 Enfilez une nouvelle paire de gants en latex sans talc.
- 7 Appliquez une légère pression sur l'un des côtés du joint jusqu'à ce que l'autre côté se soulève. Utilisez des brucelles pour attraper et retirer le joint. Répétez l'opération pour retirer le joint arrière.

Figure 23 Retrait des joints de collecteur usagés



- 8 Placez un nouveau joint dans chaque fente située à l'avant et à l'arrière du portoir de Flow Cell. Appuyez légèrement pour les mettre en place.
- 9 Chargez de nouveau la Flow Cell que vous avez retirée pour installer les nouveaux joints.
- 10 Assurez-vous que la case **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) est cochée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).
- 11 Effectuez une vérification de la fluidique à l'aide des valeurs par défaut de la pompe :
 - a Sélectionnez la solution 2 dans la liste déroulante.
 - b Sélectionnez **Pump** (Pompe).
 - c Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
 - d Si vous observez un flux continu de bulles, remplacez le joint et répétez l'opération de vérification de la fluidique.
- 12 Retirez les tubes d'évacuation de la Flow Cell du conteneur à déchets.
- 13 Rassemblez les huit tubes d'évacuation à l'aide d'un parafilm. Assurez-vous de l'alignement régulier des extrémités des tubes.
- 14 Placez les extrémités des tubes groupés dans un flacon de 250 ml.
- 15 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour lancer le lavage.
- 16 Une fois le lavage terminé, sélectionnez **Return to Start** (Retourner au début).
- 17 Mesurez le volume distribué.

| Positions | Volume distribué |
|------------------------|------------------|
| Huit positions SBS | |
| 10 positions appariées | |
| Toutes les positions | |



REMARQUE

Tous les flacons et tous les tubes sont remplis au maximum de leur capacité de manière à assurer un rinçage total des dispositifs d'aspiration. Cependant, le volume distribué dans chaque position varie. C'est pourquoi les flacons et les tubes contiennent des volumes différents lorsque le lavage est terminé.

18 Détachez les tubes d'évacuation et replacez-les dans le conteneur à déchets.

Lavage à l'eau

Effectuez un lavage à l'eau en cas d'inactivité prévue de l'instrument pendant au moins cinq jours après un lavage au Tween 20. Le lavage à l'eau rince le Tween 20 du système fluïdique.

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Wash | Water Wash** (Lavage | Lavage à l'eau).
- 2 Chargez l'instrument avec de l'eau de laboratoire comme suit :
 - a Remplissez huit flacons SBS avec au moins 20 ml d'eau de laboratoire.
 - b Remplissez 10 tubes appariés avec 10 ml d'eau de laboratoire.



ATTENTION

Ne réutilisez pas l'eau, les flacons ou les tubes utilisés pour le lavage au Tween 20. L'eau peut être contaminée par les réactifs présents sur les dispositifs d'aspiration.

- 3 Chargez les flacons et les tubes sur l'instrument dans le support de réactifs adapté.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour lancer le lavage.
- 5 Lorsque le lavage est terminé, mesurez le volume distribué.

| Positions | Volume distribué |
|---|------------------|
| Huit positions SBS | 32 ml |
| Huit positions SBS et dix positions à paires de bases appariées | 72 ml |

- 6 Détachez les tubes d'évacuation et replacez-les dans le conteneur à déchets.

Basculer entre les modes de séquençage

Le passage du mode de séquençage à débit élevé au mode de séquençage rapide nécessite un lavage de maintenance et un changement de joints. Pour obtenir des directives, consultez la section *Réaliser un lavage de maintenance*, page 68.

Seules les analyses avec le même mode peuvent être réalisées simultanément. Ainsi, le changement de mode est appliqué à la fois à la Flow Cell A et à la Flow Cell B. Si l'une des deux Flow Cell est en cours d'utilisation, il est impossible de changer le mode.

- 1 Pour changer le mode de séquençage, sélectionnez **Mode Select** (Sélection du mode) à l'écran de bienvenue.

Passer du mode à débit élevé au mode d'analyse rapide

Le passage du mode HiSeq v4 ou TruSeq v3 au mode d'analyse rapide nécessite un lavage de maintenance pour mode rapide.

| Caractéristique | Lavage de maintenance, mode rapide |
|-------------------------------|---|
| Type de Flow Cell | Flow Cell rapide (deux lignes) |
| Joint de Flow Cell | Joint à dix ports et joint à huit ports |
| Réactifs | Tween 20 et ProClin 300 |
| Volumes attendus (ml) | 60,2 ml |
| Durée approximative du lavage | 60 minutes |

Passer du mode d'analyse rapide au mode à débit élevé

Le passage du mode d'analyse rapide au mode HiSeq v4 ou TruSeq v3 nécessite un lavage de maintenance au mode rapide suivi d'un lavage de maintenance au mode à débit élevé.

| Caractéristique | Lavage de maintenance, mode rapide | Lavage de maintenance, mode à débit élevé |
|------------------------------------|---|---|
| Type de Flow Cell | Flow Cell rapide (deux lignes) | Flow Cell à débit élevé (huit lignes) |
| Joint de Flow Cell | Joint à dix ports et joint à huit ports | Joint à dix ports et joint à huit ports |
| Réactifs | Tween 20 et ProClin 300 | Tween 20 et ProClin 300 |
| Volumes attendus (ml) | 60,2 ml | 158 ml |
| Durée approximative du lavage | 60 minutes | 130 minutes |
| Durée totale du changement de mode | Environ 3 heures | |

Laisser l'instrument inactif

Utilisez les instructions suivantes pour préparer l'instrument à rester à l'état d'inactivité pendant une période pouvant aller jusqu'à 10 jours. Pour une durée supérieure à 10 jours, éteignez plutôt l'instrument.

- 1 Procédez à un lavage de maintenance pour rincer le système.
- 2 Laissez la Flow Cell sur la platine de Flow Cell avec le levier de Flow Cell en position 2. Maintenez les collecteurs en position relevée.
- 3 Chargez 10 ml d'eau de laboratoire dans chacune des positions dans les supports de réactifs, puis abaissez les dispositifs d'aspiration.
- 4 Chargez 1 ml d'eau de laboratoire dans la station de chargement.
- 5 Effectuez un lavage à l'eau avant d'utiliser l'instrument.

Arrêter l'instrument

Utilisez la procédure suivante pour préparer la fluidique en toute sécurité et arrêter le système. N'arrêtez l'instrument que si vous envisagez de ne pas l'utiliser pendant au moins 10 jours. Si vous comptez utiliser l'instrument dans les 10 jours à venir, mettez-le plutôt en veille.

- 1 Procédez à un lavage de maintenance pour rincer le système.
- 2 Retirez la Flow Cell de la platine de Flow Cell.
- 3 À l'aide d'une lingette alcoolisée ou d'un tissu non pelucheux imprégné d'éthanol ou d'isopropanol, essuyez la surface du portoir de Flow Cell.



ATTENTION

Veillez à ce que l'alcool ne s'écoule pas dans les trous de décompression ou autour des collecteurs. Utilisez au besoin un chiffon de laboratoire peu pelucheux pour sécher la platine.

- 4 Chargez 10 ml d'eau de laboratoire dans chacune des positions dans les supports de réactifs, puis abaissez les dispositifs d'aspiration.
- 5 Chargez 1 ml d'eau de laboratoire dans chacune des positions de la station de chargement.
- 6 Mettez l'instrument hors tension.

- 7 Pour redémarrer l'instrument :
 - a Chargez de l'eau dans toutes les positions des réactifs.
 - b Allumez l'instrument.
 - c Réalisez un lavage à l'eau.

Annexe A Dépannage

| | |
|--|----|
| Problèmes possibles de configuration de l'analyse | 76 |
| Réaliser une vérification de la fluidique | 76 |
| BaseSpace n'est pas disponible | 77 |
| Arrêter et reprendre une analyse | 77 |
| Interrompre une analyse | 80 |
| Échelonner les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B | 80 |
| Diviser les troussees SBS | 81 |
| Réhybridation du primer | 82 |

Problèmes possibles de configuration de l'analyse

| Problème | Cause possible | Action |
|---|--|---|
| Le logiciel n'a pas été initialisé. | Le logiciel n'a pas pu initialiser des périphériques internes. | Fermez le message d'erreur, puis relancez le logiciel de l'instrument. Si le problème persiste, redémarrez l'ordinateur de l'instrument. Avant de redémarrer l'ordinateur, éteignez l'instrument pour vous assurer que le lecteur DoNotEject est correctement reconnu. Si le problème persiste après le redémarrage de l'ordinateur de l'instrument, arrêtez l'instrument, attendez au moins 60 secondes, puis redémarrez-le. |
| Le levier de Flow Cell est orange. | La Flow Cell n'est pas bien positionnée. La décompression n'est pas étanche. Les collecteurs ne se lèvent pas. | Retirez la Flow Cell et répétez les opérations de nettoyage. Assurez-vous que les joints sont présents et bien positionnés. Rechargez la Flow Cell. Si les étapes précédentes ne fonctionnent pas, remplacez les joints, puis rechargez la Flow Cell. |
| Un voyant orange clignote sur le levier de Flow Cell. | Une décompression a bien lieu, mais elle est inadéquate. | Retirez la Flow Cell et répétez les opérations de nettoyage. Assurez-vous que les joints sont présents et bien positionnés. Rechargez la Flow Cell. Si les étapes précédentes ne fonctionnent pas, remplacez les joints, puis rechargez la Flow Cell. |
| Un voyant vert clignote sur le levier de Flow Cell. | La pression négative est satisfaisante. | Basculez le levier de Flow Cell en position 2. |
| Mauvaise distribution des liquides. | Bulles potentielles dans le système. | Repositionnez la Flow Cell et confirmez que les trous sont orientés vers le bas . Recherchez la présence de précipité blanc autour des joints. En cas de présence de précipité, remplacez les joints. Remplacez toujours les joints avant un lavage de maintenance de l'instrument. Confirmez que les ensembles de dispositifs d'aspiration sont complètement abaissés et que chaque dispositif d'aspiration est en contact avec les réactifs. |

Réaliser une vérification de la fluidique

Réalisez une vérification de la fluidique lors de l'installation de l'instrument et lors du dépannage des problèmes liés à la fluidique.

- 1 Sélectionnez **Check** (Vérifier) à l'écran de bienvenue.
- 2 Numérisez ou saisissez l'identifiant de lavage de la Flow Cell (numéro du code à barres) de la Flow Cell d'amorçage. Assurez-vous d'utiliser une Flow Cell **usagée** pour cette étape.

- 3 Chargez la Flow Cell usagée sur l'instrument.
- 4 Remplissez huit flacons SBS de solution PW1 ou d'eau de laboratoire, puis chargez-les dans le support de réactifs SBS.
- 5 Sélectionnez la solution 2 dans la liste déroulante.
- 6 Saisissez les valeurs suivantes :
 - ▶ Volume : **250**
 - ▶ **[Pour le mode à débit élevé]** Taux d'aspiration : **250**
 - ▶ **[Pour le mode d'analyse rapide]** Taux d'aspiration : **1 500**
 - ▶ Taux de distribution : **2 000**
- 7 Sélectionnez **Pump** (Pompe).
- 8 Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
- 9 Si trop de bulles sont présentes :
 - a Vérifiez l'absence d'obstructions au niveau des joints de collecteur.
 - b Diminuez le taux d'aspiration à 100.
 - c Pompez 250 µl d'eau supplémentaires vers la Flow Cell.

BaseSpace n'est pas disponible

Si BaseSpace n'est pas disponible, ouvrez les Services Windows pour vérifier que BaseSpace Broker a démarré. Si ce n'est pas le cas, redémarrez-le. Si les services sont en fonction et que BaseSpace n'est toujours pas disponible, contactez l'assistance technique d'Illumina.

Arrêter et reprendre une analyse

L'arrêt de l'analyse peut être nécessaire si celle-ci a été paramétrée de manière incorrecte, si la qualité des données est mauvaise ou en cas d'erreur relative au matériel. Pour être en mesure de reprendre l'analyse, il faut, au moment de l'arrêt, sélectionner la fonction normale d'arrêt appropriée.

| Option d'arrêt | Option Real-Time Analysis (RTA) | Capable de reprendre? |
|--|--|--|
| Normal Stop (End of Lane\Chemistry) (Arrêt normal [Fin de ligne\chimie]) | Keep As Is (Conserver tel quel) | Oui. L'analyse reprend à la commande de chimie ou d'imagerie suivante. |
| | Complete For Run (Terminer pour l'analyse) | Non. L'analyse ne peut pas être reprise. |
| | Complete For Read (Terminer pour la lecture) | Oui. L'analyse reprend au début de la lecture suivante. |
| Normal Stop (End of Cycle) (Arrêt normal [Fin de cycle]) | Keep As Is (Conserver tel quel) | Oui. L'analyse reprend au cycle suivant. |
| | Complete For Run (Terminer pour l'analyse) | Non. L'analyse ne peut pas être reprise. |
| | Complete For Read (Terminer pour la lecture) | Oui. L'analyse reprend au début de la lecture suivante. |
| Immediate Stop (Arrêt immédiat) | Aucune option | Non. |

Arrêter une analyse

- 1 À l'écran Run Overview (Aperçu de l'analyse), sélectionnez **Stop** (Arrêter) pour ouvrir le menu d'interruption.

Figure 24 Menu d'interruption



- 2 Sélectionnez l'une des options d'arrêt suivantes :
 - ▶ **Normal Stop (End of Lane\Chemistry)** (Arrêt normal [Fin de ligne\chimie]) : n'arrête l'analyse qu'une fois la commande actuelle de chimie ou d'imagerie terminée, puis place la Flow Cell en état de sécurité.
 - ▶ **Normal Stop (End of Cycle)** (Arrêt normal [Fin de cycle]) : arrête l'analyse une fois que le cycle en cours est terminé, puis place la Flow Cell en état de sécurité.
 - ▶ **Immediate Stop (Arrêt immédiat)** : arrête l'analyse sans terminer l'opération en cours et ne place *pas* la Flow Cell en état de sécurité. Vous ne pouvez pas reprendre une analyse arrêtée avec cette option.
- 3 Sélectionnez l'une des options de RTA suivantes :
 - ▶ **Keep As Is** (Conserver tel quel) : l'analyse est arrêtée sans aucune modification de RTA. L'analyse peut reprendre au point où elle a été arrêtée.
 - ▶ **Complete For Run** (Terminer pour l'analyse) : l'analyse de RTA est arrêtée. Les renseignements relatifs à l'analyse, les paramètres de l'analyse et les fichiers de formule sont mis à jour pour refléter le nombre total de cycles une fois le dernier cycle terminé. Real-Time Analysis redémarre ensuite et termine la définition des bases pour l'analyse jusqu'à l'endroit où celle-ci a été arrêtée. L'analyse ne peut pas être reprise.

- ▶ **Complete For Read** (Terminer pour la lecture) : l'analyse de RTA est arrêtée. Les renseignements relatifs à l'analyse, les paramètres de l'analyse et les fichiers de formule sont mis à jour pour limiter la longueur de la lecture en cours au dernier cycle terminé. Les lectures ultérieures ne sont pas touchées. L'analyse RTA redémarre par la suite pour terminer l'analyse de la lecture en cours. L'analyse peut reprendre au début de la lecture suivante.
- 4 Une fois l'analyse arrêtée, sélectionnez **Return to Start** (Retour au démarrage) à l'écran Run Overview (Aperçu de l'analyse).
L'écran de bienvenue apparaît.

Reprendre une analyse interrompue

Suivez les étapes ci-dessous pour reprendre une analyse qui a été arrêtée au moyen de la fonction normale d'arrêt avec une fonction de RTA qui permet la reprise de l'analyse.



REMARQUE

Si une génération d'amplifiats ou une chimie appariée est en cours sur l'autre côté de la platine, l'analyse reprendra lorsque ce processus sera terminé.

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Sequence** (Séquencer), puis sélectionnez **Resume Run** (Reprendre l'analyse).
- 2 À l'écran Resume (Reprendre), sélectionnez le bon dossier d'analyse dans la liste déroulante. Le logiciel reprend l'analyse au point où elle a été arrêtée et revient par défaut à la bonne configuration à l'écran Resume (Reprendre).
- 3 Confirmez les paramètres par défaut suivants, ou sélectionnez l'endroit approprié où reprendre l'analyse. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Exemples de paramètres pour la reprise d'une analyse*, page 79.
 - ▶ **Resume At** (Reprendre à) : la lecture ou l'endroit où reprendre l'analyse.
 - ▶ **Start At Cycle** (Reprendre au cycle) : le cycle où reprendre l'analyse.



ATTENTION

Ne sélectionnez pas un endroit où il y a une rotation des lectures appariées, sauf pour la réhybridation du primer de la lecture 2.

- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour continuer.
Le logiciel vous guide tout au long des dernières étapes de configuration de l'analyse.

Exemples de paramètres pour la reprise d'une analyse

Si l'analyse est arrêtée après l'imagerie de la ligne 1 au cycle 23, le logiciel configure automatiquement la reprise de l'analyse à la lecture 1 au cycle 23. L'écran Resume (Reprendre) affiche ces paramètres comme suit :

- ▶ **Resume At** : (Reprendre à :) lecture 1
- ▶ **Start At Cycle** : (Commencer au cycle :) 23

Figure 25 Exemple de reprise au cycle 23

| | | | | |
|-----------------|---------|---|--------------|---|
| Resume At: | Read #1 | ▼ | Image 1 cycl | ▼ |
| Start At Cycle: | 23 | ⌘ | Imaging (no | ▼ |

Puisque dans cet exemple, l'analyse a été arrêtée au cours d'une étape d'imagerie, l'option **Imaging (no chemistry)** (Imagerie [sans chimie]) est sélectionnée automatiquement.

Interrompre une analyse

Interrompez une analyse pour vérifier les composants de cette dernière, comme les volumes de réactifs, lorsque cela s'avère nécessaire. Lors d'un fonctionnement normal, interrompre une analyse n'est pas nécessaire.



ATTENTION

N'interrompez pas une analyse pendant le processus d'imagerie. Utilisez plutôt les fonctionnalités normales d'arrêt, de fin de cycle ou de fin de ligne pour arrêter et reprendre une analyse.

- 1 À l'écran Run Overview (Aperçu de l'analyse), sélectionnez **Pause | Normal Pause** (Interruption | Interruption normale).
- 2 Sélectionnez **Yes** (Oui) pour confirmer la commande.
Le logiciel termine la commande de chimie ou d'imagerie en cours et place la Flow Cell en état de sécurité.
- 3 Sélectionnez **Resume** (Reprendre) pour reprendre l'analyse.

Changer les réactifs en cours d'analyse

Si vous avez commencé l'analyse avec un volume partiel de réactifs, utilisez la fonction Change Reagents (Changer les réactifs) pour interrompre l'analyse et remplir les réactifs.



REMARQUE

L'amorçage n'est pas nécessaire.

- 1 À l'écran Run Overview (Aperçu de l'analyse), sélectionnez **Pause** (Interrompre) pour ouvrir le menu d'interruption.
- 2 Sélectionnez **Change Reagents** (Changer les réactifs).
- 3 Sélectionnez **Yes** (Oui) pour confirmer la commande d'interruption.
Le logiciel termine la commande de chimie ou d'imagerie en cours et met la Flow Cell en état de sécurité, puis ouvre l'écran Reagents (Réactifs).
- 4 Saisissez les paramètres suivants :
 - ▶ L'identifiant de la trousse de réactifs pour les nouveaux réactifs.
 - ▶ Le nombre de cycles correspondant à la durée attendue des réactifs.
- 5 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour passer au chargement des réactifs.

Échelonner les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B

Lorsque vous échelonnez les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B, configurez une nouvelle analyse et le logiciel va s'interrompre automatiquement et reprendre l'analyse sur la Flow Cell adjacente, au besoin. Le système est automatiquement placé en état de sécurité.

- 1 Configurez une nouvelle analyse.



REMARQUE

Si l'analyse adjacente est en train de terminer une étape d'imagerie, le logiciel interrompt la Flow Cell adjacente avant de pouvoir charger et amorcer les réactifs.

- 2 Après le chargement de la Flow Cell de séquençage pour la nouvelle analyse, fermez la porte du compartiment.

- Sélectionnez **Start** (Démarrer) pour lancer la nouvelle analyse de séquençage.

Diviser les troussees SBS

Pour faire une analyse à lectures appariées comportant moins de 125 cycles par lecture, diviser une trousse HiSeq v4 de 250 cycles en deux ensembles de réactifs. Chaque ensemble comprendra des réactifs pour une analyse de 126 cycles avec l'indexage double et un amorçage. Pour une analyse comportant moins de 67 cycles, utilisez la trousse de 50 cycles.

La division d'une trousse TruSeq v3 de 200 cycles fournit assez de réactifs pour effectuer jusqu'à 101 cycles avec un amorçage. Pour une analyse comportant moins de 101 cycles, utilisez la trousse de 50 cycles.

Diviser une trousse de 250 cycles

- Décongelez les réactifs de la trousse SBS HiSeq v4 (250 cycles). Consultez la section *Décongeler les réactifs SBS*, page 14.
- Apposez une étiquette portant le numéro de la position et le nom du réactif sur sept flacons de 250 ml, de la façon suivante.
 - ▶ N°1, IRM
 - ▶ N°3, USM
 - ▶ N°4, SB1
 - ▶ N°5, SB2
 - ▶ N°6, SB2
 - ▶ N°7, CRM
 - ▶ N°8, SB3
- Ajoutez le volume suivant à chaque réactif dans le flacon correspondant de 250 ml pour obtenir un deuxième ensemble de réactifs. Préparez le CRM en dernier et changez de gants.

| Numéro | Nom du réactif | Volume |
|--------|------------------|--------|
| 1 | IRM | 72 ml |
| 3 | USM | 82 ml |
| 4 | SB1 | 100 ml |
| 5 | SB2 (position 5) | 62 ml |
| 6 | SB2 (position 6) | 62 ml |
| 7 | CRM | 72 ml |
| 8 | SB3 | 110 ml |

- Utilisez les deux ensembles de réactifs pour deux analyses en cours ou conservez-en un aux températures suivantes :
 - ▶ Conservez l'IRM, l'USM et le CRM entre -25 °C et -15 °C.
 - ▶ Conservez le SB1, le SB2 et le SB3 entre 15°C et 30°C.

Diviser une trousse de 200 cycles

- Décongelez les réactifs de la trousse SBS TruSeq v3 (200 cycles). Consultez la section *Décongeler les réactifs SBS*, page 32.
- Apposez une étiquette portant le numéro de la position et le nom du réactif sur sept flacons de 250 ml, de la façon suivante.
 - ▶ N°1, ICB

- ▶ N°3, SRE
- ▶ N°4, SB1
- ▶ N°5, SB2
- ▶ N°6, SB2
- ▶ N°7, CMR
- ▶ N°8, SB3

3 Ajoutez le volume suivant de chaque réactif dans le flacon approprié de 250 ml pour obtenir un deuxième ensemble de réactifs. Préparez le CMR en dernier et changez de gants.

| Numéro | Nom du réactif | Volume |
|--------|------------------|--------|
| 1 | ICB | 47 ml |
| 3 | SRE | 107 ml |
| 4 | SB1 | 100 ml |
| 5 | SB2 (position 5) | 62 ml |
| 6 | SB2 (position 6) | 62 ml |
| 7 | CMR | 107 ml |
| 8 | SB3 | 110 ml |

- 4 Utilisez les deux ensembles de réactifs pour deux analyses en cours ou conservez-en un aux températures suivantes :
- ▶ Conservez le CMR, le SRE et l'EDP entre -25 °C et -15 °C.
 - ▶ Conservez l'ICB, le SB1, le SB2 et le SB3 entre 2 °C et 8 °C.

Préparer l'ICB

- 1 Ajoutez le contenu de deux tubes de LFN à un flacon d'ICB.
- 2 Rincez chaque tube de LFN avec de l'ICB pour vous assurer que tout le LFN est transféré.
- 3 Ajoutez 1,1 ml d'EDP à la solution d'ICB et de LFN.
- 4 Remplacez l'EDP inutilisé dans son lieu de stockage, entre -25 °C et -15 °C.
- 5 Mettez le bouchon sur le flacon contenant l'EDP, l'ICB et le FLN et renversez le flacon pour mélanger.
- 6 Réservez sur de la glace.

Réhybridation du primer

Une analyse de réhybridation répète l'étape d'hybridation du primer de séquençage. Si les mesures d'analyse montrent un faible nombre d'amplifiats, une faible intensité des amplifiats ou tout autre problème, effectuez une réhybridation du primer pour préserver la Flow Cell. La réhybridation des primers n'endommage pas les amplifiats.

Flow Cell HiSeq v4

Toutes les étapes de réhybridation sont effectuées sur l'instrument HiSeq 2500. La trousse contient des primers pour la lecture 1, la lecture d'index 1, la lecture d'index 2 pour les Flow Cell à lecture unique et la lecture 2.

| Nom de la trousse de réhybridation | Directives sur le flux de travail |
|---|---|
| Trousse de réhybridation multiprimers HiSeq v4 N° de référence GD-403-4001 | <i>Guide de réhybridation du primer à débit élevé HiSeq (référence n° 15050105)</i> |

Flow Cell TruSeq v3

La réhybridation du primer de lecture 1 est effectuée sur le cBot. La trousse de réhybridation comprend une plaque de réactifs cBot contenant le primer de séquençage HP6 pour la lecture 1. Pour les bibliothèques Nextera, utilisez le HP10 de la boîte de primer de séquençage à index double TruSeq.

| Nom de la trousse de réhybridation | Directives sur le flux de travail |
|---|---|
| Trousse de réhybridation multiprimers cBot TruSeq v2 N° de référence GD-304-2001 | <i>Réhybridation du primer de lecture 1 sur une Flow Cell TruSeq v3 ou TruSeq v2 (Référence n°15018149)</i> |

Flow Cell rapide

Toutes les étapes de réhybridation sont effectuées sur l'instrument HiSeq 2500. La trousse contient des primers pour la lecture 1, la lecture d'index 1, la lecture d'index 2 pour les Flow Cell à lecture unique et la lecture 2.

| Nom de la trousse de réhybridation | Directives sur le flux de travail |
|---|--|
| Trousse de réhybridation HiSeq Rapid N° de référence GD-404-1001 | <i>Réhybridation du primer d'analyse rapide HiSeq (référence 15059379)</i> |

Annexe B Real-Time Analysis

| | |
|---|----|
| Présentation de Real-Time Analysis | 84 |
| Flux de travail de Real-Time Analysis | 85 |
| Surveiller les indicateurs de l'analyse | 88 |

Présentation de Real-Time Analysis

Le logiciel Real-Time Analysis (RTA) fonctionne sur l'ordinateur de l'instrument, effectuant la définition des bases et attribuant un score de qualité pour chacune des définitions des bases.

Le logiciel suit l'état de chaque plaque et détermine le moment où celle-ci passe à l'étape suivante du processus. Lorsque RTA fait progresser une plaque, il produit un fichier pour l'étape terminée et commence l'étape suivante. Le logiciel peut ainsi déterminer l'état de chaque plaque en fonction des fichiers existants. Si RTA est arrêté, il enregistre les données d'analyse et peut reprendre le traitement.

Fichiers d'entrée

Le logiciel RTA requiert les fichiers d'entrée suivants :

- ▶ Les fichiers d'intensité des amplifiats, qui contiennent les résultats de l'analyse d'images.
- ▶ Le fichier RunInfo.xml, généré automatiquement par le logiciel de commande au début de l'analyse. À partir de ce fichier, le logiciel RTA lit le nom de l'analyse, le nombre de cycles, vérifie si une lecture est indexée et lit le nombre de plaques sur la Flow Cell.
- ▶ HiSeq.Configuration.xml, qui est un fichier de configuration de l'instrument au format XML.
- ▶ RTA.exe.config, qui est un fichier de configuration logicielle au format XML.

Le logiciel RTA utilise les paramètres d'analyse spécifiés pendant la configuration de l'analyse et reçoit des ordres du logiciel de commande comprenant des renseignements concernant le moment du lancement et l'emplacement du fichier RunInfo.xml.

Fichiers de sortie

Les plaques sont de petites zones d'imagerie sur la Flow Cell qui constituent une unité de vision pour la caméra. Pour chaque plaque analysée, RTA produit un ensemble de fichiers de définition des bases dont la qualité est notée et des fichiers de filtrage en tant que sorties primaires. Les autres fichiers prennent en charge la génération de fichiers de sortie primaires.

- ▶ **Fichiers de définition des bases** : pour chaque plaque analysée, un fichier de définition des bases compressé (*.bcl) est généré pour chaque plaque par cycle. Le fichier de définition des bases contient la définition des bases et le score de qualité qui lui est associé.
- ▶ **Fichiers de filtrage** : chaque plaque génère des renseignements sur le filtre inclus dans un fichier de filtrage (*.filter) pour chaque plaque au cours de la totalité de l'analyse. Le fichier de filtrage précise si les amplifiats ont franchi le filtre.
- ▶ **Fichiers d'emplacement des amplifiats** : un fichier d'emplacement des amplifiats (*.locs) contient les coordonnées X et Y de chaque amplifiat sur la Flow Cell.
- ▶ **Fichiers de statistiques** : pour chaque cycle, un fichier de statistiques (*.stats) est produit. Le fichier de statistiques contient des statistiques agrégées relatives au cycle.

Les fichiers de sortie primaires sont utilisés pour l'analyse des données ultérieure. Utilisez le logiciel bcl2fastq pour le démultiplexage et la conversion des fichiers .bcl en fichiers FASTQ, qui peuvent être utilisés comme entrée pour l'alignement. Pour convertir des données à partir du système HiSeq, utilisez bcl2fastq 1.8.4 ou une version supérieure.

Le logiciel RTA fournit des indicateurs en temps réel sur la qualité de l'analyse, stockés dans des fichiers InterOp. Les fichiers InterOp sont des fichiers binaires contenant des indicateurs relatifs aux plaques, aux cycles et au niveau de lecture, et sont nécessaires pour afficher les indicateurs dans le visualiseur d'analyse de séquençage (SAV). Pour afficher les indicateurs générés par RTA, utilisez le logiciel SAV v1.8.20 ou une version supérieure.

Pour obtenir des détails sur chaque fichier de sortie, consultez la section *Fichiers de sortie de séquençage*, page 90.

Gestion des erreurs

Le logiciel RTA stocke les fichiers journaux dans le dossier RTALogs. Si une erreur se produit, RTA crée un fichier journal d'erreur nommé *Error.txt et consigne l'erreur.

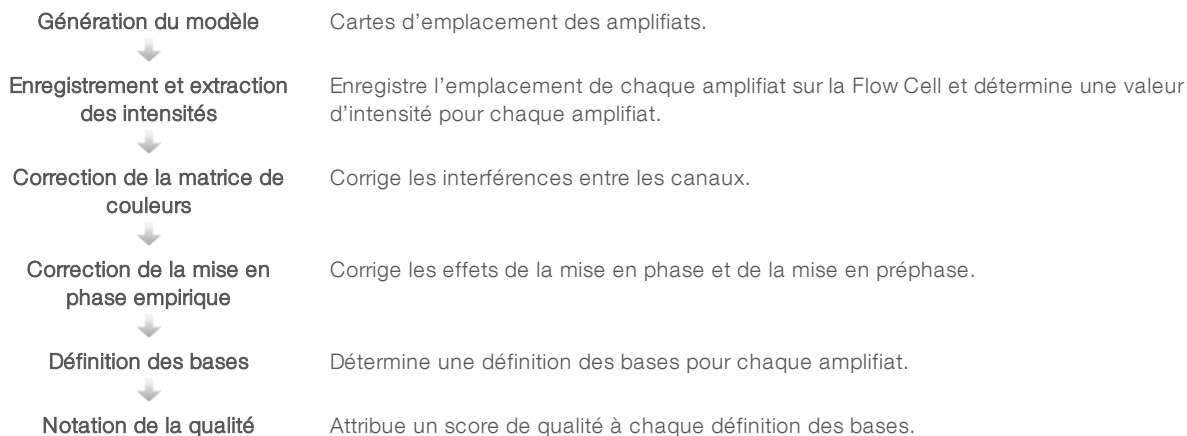
Transfert des données

Tout au long de l'analyse, le logiciel Real-Time Analysis (RTA) copie automatiquement les données générées à partir des fichiers d'images brutes vers le dossier de sortie. Si les analyses d'images sont lentes, RTA s'arrête et met la Flow Cell en état de sécurité. L'analyse reprend quand des données d'images sont disponibles.

Si le logiciel RTA s'interrompt, l'analyse reprend automatiquement au bon endroit de la Flow Cell au cours du cycle suivant. Ne redémarrez pas RTA manuellement.

Le transfert de données est terminé lorsqu'un fichier de marqueurs nommé Basecalling_Netcopy_complete.txt est généré. Un de ces fichiers est généré pour chaque lecture et un autre est généré pour l'ensemble de l'analyse.

Flux de travail de Real-Time Analysis



Génération du modèle

La génération du modèle établit et définit la position de chaque amplifiat dans une plaque à l'aide des coordonnées X et Y. Le modèle est utilisé comme référence pour l'étape suivante d'enregistrement et l'extraction des intensités.

En raison du réseau aléatoire d'amplifiats sur la Flow Cell, la génération du modèle nécessite des données d'images provenant des cinq premiers cycles de l'analyse. Une fois l'imagerie du dernier cycle de modèle d'une plaque réalisée, le modèle est généré.

Les positions des amplifiats s'inscrivent dans un même fichier d'emplacement des amplifiats (*.locs) ou dans un fichier d'emplacement des amplifiats compressé (*.clocs) pour chaque plaque. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Fichiers de sortie de séquençage*, page 90.

Enregistrement et extraction des intensités

L'enregistrement et l'extraction d'intensités commencent après la génération du modèle des positions de l'amplifiat.

- ▶ L'enregistrement aligne les images produites à chaque cycle en réponse à la génération du modèle en fonction du modèle.
- ▶ L'extraction d'intensités détermine une valeur d'intensité pour chaque amplifiat du modèle pour une image donnée.

S'il y a échec d'enregistrement de l'image d'un cycle, quelle qu'elle soit, aucune définition des bases ne sera générée pour cette plaque dans ce cycle. Utilisez le logiciel SAV pour examiner les images miniatures et trouver les images dont l'enregistrement a échoué.

Correction de la matrice de couleurs

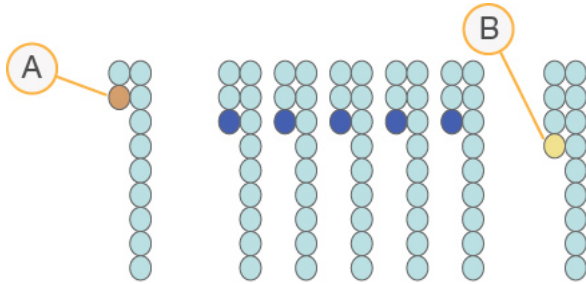
Après l'enregistrement et l'extraction de l'intensité, le logiciel RTA corrige les interférences entre les canaux. Les interférences se produisent par exemple lorsqu'un amplifiat a une intensité dans le canal C, mais également dans le canal A. À l'aide d'une matrice de couleurs 4 x 4, le logiciel RTA génère des intensités corrigées par matrice avec interférences inexistantes ou faibles, puis équilibre les différences générales d'intensité entre les canaux de couleur.

Correction de la mise en phase empirique

Lors de la réaction de séquençage, chaque brin d'ADN dans un amplifiat s'étend d'une base par cycle. La mise en phase et la mise en préphase ont lieu lorsqu'un brin est déphasé par rapport au cycle d'incorporation en cours.

- ▶ La mise en phase se produit lorsqu'un brin a un retard d'une base.
- ▶ La mise en préphase se produit lorsqu'un brin a une avance d'une base.

Figure 26 Mise en phase et en préphase



- A Lecture avec une base présentant une mise en phase
- B Lecture avec une base présentant une mise en préphase

Le logiciel d'analyse en temps réel (RTA) corrige les effets de la mise en phase et de la mise en préphase à l'aide de l'algorithme de correction empirique de la mise en phase, qui optimise la qualité des données à chaque cycle tout au long de l'analyse.

Définition des bases

Après la correction des intensités brutes en termes d'interférence, de mise en phase et de mise en préphase, le canal dont l'intensité est la plus forte correspond à la définition pour cet amplifiat dans ce cycle. La définition des bases sur le système HiSeq 2500 à l'aide de RTA commence après le cycle 12.

La définition des bases détermine une base (A, C, G ou T) pour chaque amplifiat d'une plaque donnée d'un cycle spécifique. Les définitions des bases sont enregistrées dans des fichiers de définition des bases (*.bcl). Il s'agit de fichiers binaires comportant un octet par définition et par score de qualité. Chaque fichier de définition des bases contient la définition des bases et le score de qualité qui lui est associé. Pour qu'une base puisse être définie pour un amplifiat, celui-ci doit d'abord franchir le filtre de pureté. Les amplifiats qui ne passent pas le filtre ou qui ne peuvent pas être définis car ils sont en dehors de l'image ou parce que l'enregistrement de l'image a échoué sont des « no-calls » (sans définition). On représente un « no-call » par la mention « (N) ».

Amplifiats passant le filtre

Pendant les 25 premiers cycles de la lecture 1, le filtre de pureté supprime les amplifiats les moins fiables des résultats d'analyse. Les amplifiats passent le filtre si deux définitions des bases ou moins présentent une valeur de pureté inférieure à 0,6 dans les 25 premiers cycles. La pureté est le rapport de l'intensité de base la plus forte divisée par la somme de l'intensité de base la plus forte et de celle la suivant immédiatement. Les rapports d'analyse désignent le pourcentage d'amplifiats passant le filtre par %PF.

Les amplifiats de faible qualité sont supprimés du compte d'amplifiats bruts pendant la génération du modèle, ce qui produit un pourcentage relativement élevé d'amplifiats passant le filtre.

Notation de la qualité

Un score de qualité, ou Q-score, permet de prédire la probabilité d'une erreur dans la définition des bases. Un score de qualité plus élevé implique qu'une définition des bases est de plus haute qualité et plus susceptible d'être correcte.

Le score de qualité est un moyen simple d'indiquer la probabilité de petites erreurs. $Q(X)$ représente les scores de qualité, où X est le score. Le tableau suivant montre la relation entre le score de qualité et la probabilité d'une erreur.

| Score de qualité $Q(X)$ | Probabilité d'une erreur |
|-------------------------|--------------------------|
| Q40 | 0,0001 (1 sur 10 000) |
| Q30 | 0,001 (1 sur 1 000) |
| Q20 | 0,01 (1 sur 100) |
| Q10 | 0,1 (1 sur 10) |



REMARQUE

La notation de la qualité s'appuie sur une version modifiée de l'algorithme Phred.

La notation de la qualité calcule un ensemble d'indicateurs prévisionnels pour chaque définition des bases, puis utilise ces valeurs pour rechercher un score de qualité dans un tableau de qualité. Les tableaux de qualité servent à fournir des indicateurs de qualité extrêmement précis pour des analyses générées par une configuration spécifique de plateforme de séquençage et de version de chimie.

Une fois le score de qualité établi, les résultats sont enregistrés dans les fichiers de définition des bases.

Compartimentage par score de qualité

Le logiciel RTA regroupe les scores de qualité selon des plages ou compartiments spécifiques et attribue une valeur à chaque plage. Le compartimentage par score de qualité réduit considérablement les besoins en espace de stockage, sans affecter la précision ou le fonctionnement des applications en aval.

Le compartimentage par score de qualité contribue à l'efficacité du traitement des analyses et du transfert de données associés au débit élevé du système HiSeq 2500. Le fichier *.bcl qui en résulte est plus petit en raison des algorithmes de compression, qui parviennent à mieux compresser le fichier. La quantité de données écrites sur l'ordinateur de l'instrument est réduite. Les données sont transférées à un emplacement réseau, ce qui permet de copier le fichier plus vite.

Surveiller les indicateurs de l'analyse

Le logiciel RTA génère automatiquement des indicateurs de qualité lorsque l'analyse des images commence. Les indicateurs ne sont toutefois pas tous disponibles aux premiers cycles, car certains processus nécessitent plusieurs cycles pour générer des données.

| Données | Cycle |
|-------------------------------------|--|
| Analyse des images | Après le cycle 5. Pendant les cinq premiers cycles de l'analyse, le logiciel RTA génère un modèle d'emplacements des ampliats. |
| Définition des bases | Après le cycle 12. La définition des bases commence une fois la matrice de couleurs établie, au cycle 12. |
| Estimations de mise en phase | Après le cycle 25. Les corrections de mise en phase pour les 25 premiers cycles déterminent l'estimation de mise en phase. |
| Scores de qualité | Après le cycle 25. Un score de qualité est généré pour les lectures qui réussissent le filtrage de qualité. Puisque les scores de qualité nécessitent les intensités corrigées de futurs cycles, l'évaluation de la qualité vient toujours après la définition des bases. |
| Taux d'erreur | Après le cycle 25. Les taux d'erreurs ne seront générés qu'en présence d'ampliats PhiX, si vous avez sélectionné l'option Align to PhiX (Aligner sur PhiX) au moment de configurer l'analyse. |
| Contrôles en ligne | Au cycle 52 de chaque lecture ou à la fin de l'analyse pour les analyses de moins de 52 cycles. Les contrôles en ligne sont générés uniquement pour les méthodes de préparation de bibliothèques TruSeq.* |
| Nombre d'index | Une fois les lectures d'index terminées. Le nombre d'index par ligne est généré uniquement lorsqu'une feuille d'échantillons est fournie. |

* Le visualiseur d'analyse de séquençage (SAV) v1.8.44 et ses versions ultérieures ne comportent plus l'onglet TruSeq Controls (Commandes TruSeq), où SAV indiquait les résultats de l'analyse des contrôles en ligne.

Annexe C Fichiers et dossiers de sortie

| | |
|--|----|
| Fichiers de sortie de séquençage | 90 |
| Structure du dossier de sortie | 91 |
| Numérotation des plaques | 92 |
| Images miniatures | 92 |

Fichiers de sortie de séquençage

| Type de fichier | Description, emplacement et nom des fichiers |
|--|--|
| Fichiers de définition des bases | Chaque plaque analysée est incluse dans un fichier de définition des bases qui contient la définition des bases ainsi que le score de qualité encodé. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : pour chaque ligne, les fichiers sont enregistrés dans des dossiers par cycle. s_[Ligne]_[Plaque].bcl.gz : « Ligne » représente le numéro à un chiffre de la ligne et « Plaque » le numéro à quatre chiffres de la plaque. Les fichiers de définition des bases sont compressés selon la méthode gzip. |
| Fichiers d'emplacement des amplifiats | Pour chaque plaque, un fichier d'emplacement des amplifiats contient les coordonnées XY de chaque amplifiat. Les fichiers d'emplacement des amplifiats sont le résultat de la génération du modèle. Data\Intensities |
| Fichiers de filtrage | Les fichiers de filtrage spécifient si les amplifiats ont franchi les filtres. Les fichiers de filtrage sont générés au cycle 26 et portent sur 25 cycles de données. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : les fichiers sont enregistrés dans un dossier pour chaque ligne et chaque plaque. s_[ligne]_[plaque].filter |
| Fichiers InterOp | Les fichiers binaires sont utilisés pour le logiciel Sequencing Analysis Viewer. Les fichiers InterOp sont mis à jour tout au long de l'analyse. Dossier InterOp |
| Fichiers journaux | Ils enregistrent les événements et sont mis à jour tout au long de l'analyse. Data\RTALogs |
| Fichiers de décalages | Deux fichiers de décalages sont créés pour chaque analyse : <ul style="list-style-type: none">• offsets.txt : contient les décalages de plaques pour chaque cycle et chaque canal par rapport au modèle.• SubTileOffsets.txt : contient la dérive mesurée pour chaque quadrant de chaque image par rapport au cadre de référence. Data\Intensities\Offsets |
| Fichiers de mise en phase | Ils contiennent les renseignements empiriques de mise en phase, par plaque. Les fichiers de mise en phase sont créés pendant le premier cycle de définition des bases et mis à jour après chaque cycle de définition des bases. Data\Intensities\BaseCalls\Phasing EmpiricalPhasing_[lane]_[read]_[tile].txt : la plaque est représentée par un nombre à quatre chiffres qui indique la surface, le témoin et la plaque. |
| Fichier de configuration de Real-Time Analysis | Créé au début de l'analyse, le fichier de configuration de Real-Time Analysis indique les paramètres de l'analyse. Data\Intensities RTAConfiguration.xml |
| Fichiers de statistiques | Statistiques créées lors de la définition des bases pour chaque cycle. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]\C[X.1] : les fichiers sont enregistrés dans un dossier pour chaque ligne et dans un sous-dossier pour chaque cycle. |

| Type de fichier | Description, emplacement et nom des fichiers |
|---|---|
| Fichier de renseignements sur l'analyse | Indique le nom de l'analyse, le nombre de cycles à chaque lecture, si la lecture est une lecture indexée et le nombre de témoins et de plaques sur la Flow Cell. Le fichier de renseignements sur l'analyse est créé au début de l'analyse. [Dossier racine] RunInfo.xml |
| Fichiers des miniatures | Image miniature pour chaque canal et plaque dans chaque témoin à chaque cycle pendant l'imagerie. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1] : les fichiers sont stockés dans un dossier pour chaque ligne et dans un sous-dossier pour chaque cycle. s_[ligne]_[plaque]_[canal].jpg : la plaque est représentée par un nombre à quatre chiffres qui indique la surface, le témoin et la plaque. Consultez la section <i>Numérotation des plaques</i> , page 92. |

Structure du dossier de sortie

 **Config** : paramètres de configuration de l'analyse.

 **Data**

 **Intensities**

 **BaseCalls**

 **L00[X]** : fichiers de définition des bases de chaque ligne, rassemblés dans un fichier par cycle.

 **Phasing** : fichiers de mise en phase empirique, un fichier par plaque à chaque cycle.

 **L00[X]** : fichiers d'emplacements cumulés des amplifiats pour chaque ligne.

 **Offsets** : deux fichiers contenant les décalages de l'analyse.

 RTAConfiguration.xml

 **Images**

 **Focus**


 **L00[X]** : images de mise au point pour chaque ligne.

 **InterOp** : fichiers binaires utilisés par le logiciel Sequencing Analysis Viewer.

 **Logs** : fichiers journaux décrivant les événements de fonctionnement.

 **Recipe** : fichier de formule propre à l'analyse portant l'identifiant de la cartouche de réactifs.

 **RTALogs** : fichiers journaux décrivant les événements de RTA.

 **Thumbnail_Images** : images miniatures des neuf emplacements de chaque plaque, générées pour chaque cycle et pour chaque base.

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

Nom et chemin d'accès des dossiers de l'analyse

Le dossier de l'analyse est le dossier racine réceptionnant les données de sortie d'une analyse de séquençage. Lors de la configuration de l'analyse, le logiciel vous invite à saisir le chemin d'accès au dossier de l'analyse. Par défaut, le dossier est nommé selon le format suivant :

AAMMJJ_<Nom de l'ordinateur>_<Numéro de l'analyse>_<Côté de la Flow Cell><Identifiant de la Flow Cell>

Exemple : 110114_SN106_0716_A90095ACXX

La numérotation de l'analyse augmente par incréments de un à chaque fois que l'instrument effectue une analyse de séquençage. Le côté de la Flow Cell (A ou B) et l'identifiant de la Flow Cell saisis au cours des étapes de configuration de l'analyse sont ajoutés au nom de fichier de l'analyse.

Le dossier de l'analyse est enregistré suivant le chemin de sortie indiqué lors de la configuration de l'analyse. Le dossier temporaire de l'analyse pour la Flow Cell A est écrit sur le lecteur D: et le dossier temporaire de l'analyse pour la Flow Cell B est écrit sur le lecteur E:.

Numérotation des plaques

La Flow Cell à débit élevé HiSeq est imagée en 96 plaques sur chaque ligne, en haut et en bas, pour chaque cycle. Chaque ligne comporte trois témoins et chaque témoin comporte 16 plaques. La Flow Cell rapide HiSeq est imagée en 64 plaques. Chaque ligne comporte deux témoins, et chaque témoin comporte 16 plaques.



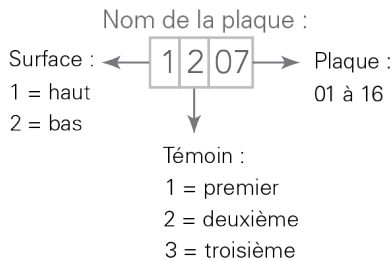
REMARQUE

Un témoin est une colonne de plaques dans une ligne de Flow Cell.

Le nom de la plaque est un nombre à quatre chiffres qui représente la position sur la Flow Cell.

- ▶ Le premier chiffre représente la surface :
 - ▶ 1 indique le haut
 - ▶ 2 indique le bas
- ▶ Le second chiffre représente le témoin :
 - ▶ 1 indique le premier témoin
 - ▶ 2 indique le deuxième témoin
 - ▶ 3 indique le troisième témoin (s'il y a lieu)
- ▶ Les deux derniers chiffres, de 01 à 16, représentent la plaque. Le numérotage des plaques commence à 01 à l'extrémité de sortie de la Flow Cell et va jusqu'à 16 à l'extrémité d'entrée.

Figure 27 Numérotation des plaques



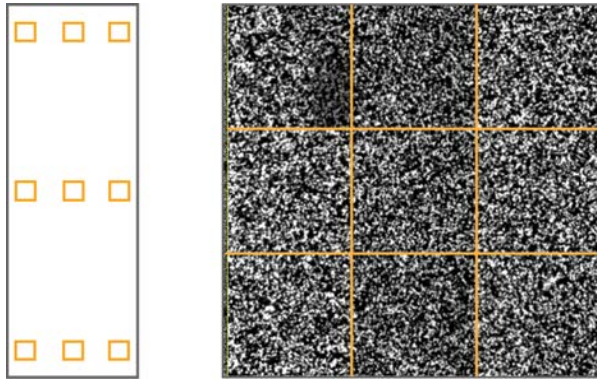
Cet exemple montre une plaque depuis la surface supérieure d'une Flow Cell, le deuxième témoin et la septième plaque.

Images miniatures

Vous pouvez configurer le logiciel de commande pour qu'il génère des images miniatures au format de fichier *.jpg. Des images miniatures sont générées pour chaque cycle et chaque base.

Le logiciel de commande recueille les images des neuf sections d'une plaque. Ces neuf images sont fusionnées en une seule image miniature, qui peut être utilisée pour résoudre des problèmes liés à une analyse. Les images miniatures ne conviennent pas aux analyses d'images, mais peuvent être utilisées pour le dépannage.

Figure 28 Image miniature



Index

%

%PF 87

A

aide

- dénaturation et dilution des librairies 1, 52
- documentation sur l'instrument HiSeq 1
- génération d'amplifiats
 - directives 13, 31
- réhybridation du primer 82
- SAV 27, 46, 66

aide, technique 100

alertes

- descriptions 5
- résolution 5

algorithme Phred 87

alignement des images 86

aligner sur PhiX 17, 36, 56

allumage de l'instrument 8

analyse rapide, options de génération

- d'amplifiats 51, 57

analyses simultanées 80

applications, installées 4

arrêt normal et arrêt immédiat 78

assistance clientèle 100

assistance en ligne 1

assistance technique 100

attribution d'un nom

- analyses 17, 36, 56
- dossiers d'analyse 9, 91
- plaques 92

B

barre d'état, couleurs 3

BaseSpace

- connecter une analyse 55
- connexion d'une analyse 16, 35
- dépannage 77
- feuilles d'échantillons 57

BaseSpace Onsite

- connecter une analyse 55
- connexion d'une analyse 16, 35

BaseSpace Onsite Sequence Hub

- intégration 1

BaseSpace Sequence Hub

- feuilles d'échantillons 18, 37

intégration 1

bcl2fastq, version 84

boîte de primers de séquençage à index double

TruSeq

réactifs requis 14

utilisation 7

bouchons verseurs 19

branchement des câbles USB 8

broches de guidage 21, 24, 40, 43, 61, 63

bulles 22, 25, 41, 44, 62, 64

C

câbles USB, branchement 8

calcul du volume d'ICB 33, 47

calcul du volumes d'ICB 33

capacité de stockage 6

optimisation 16, 35, 55, 88

capteurs 5

caractéristiques de performance 12, 29, 51

cBot

documentation 13, 31

réhybridation de la lecture 1 83

trousse d'échantillon cBot double rapide 60

trousses d'amplifiats 6

changement de mode 73

changer en cours d'analyse 80

changer les réactifs en cours d'analyse 80

compartiments 2

consommables

fournis par l'utilisateur 10

Illumina 6

contamination croisée, prévention 69

côté de la Flow Cell 3, 91

couleurs de la barre d'état 3

cycles par défaut 18, 37, 57

cycles possibles

chimie HiSeq v4 12

chimie rapide 51

chimie TruSeq v3 29

cycles restants

analyse rapide 57

HiSeq v4

nombre de cycles

par défaut 18

TruSeq v3 37

D

- déchets d'amorçage 23, 42, 62
- dénaturation et dilution de bibliothèques 52
- dilution des bibliothèques 53
- division de l'ICB 31
- documentation 100
- documentation supplémentaire, HiSeq 1
- données
 - compression 88
 - envoi à Illumina 9
 - Illumina Proactive 9
 - par cycle 88
- données de stockage 6
- dossiers de l'analyse, temporaires 92
- dossiers de sortie
 - emplacements 9
 - structure 91
- dossiers temporaires 92

E

- échelonnage des analyses 80
- écran Run Overview (Aperçu de l'analyse) 26, 45, 65
- emplacement des amplifiats 86, 89
- emplacement des dossiers 9, 91-92
- emplacement des dossiers de l'analyse 91
- emplacement des dossiers par défaut 9
- emplacement des fichiers 90-91
- enregistrement des identifiants de Flow Cell 16, 55
- enregistrement des identifiants de la trousse de réactifs 18, 37, 57
- enregistrement des images miniatures 16, 36, 55
- enregistrement, dépannage 86
- erreurs 85, 89
 - probabilité 87
- étapes de chimie, surveillance 26, 45, 65
- étapes de séquençage, vue d'ensemble
 - mode d'analyse rapide 52
 - mode HiSeq v4 13
 - mode TruSeq v3 30
 - RTA 85

F

- faible intensité des amplifiats, dépannage 82
- faible nombre d'amplifiats, dépannage 82
- feuille d'échantillons 89

- feuilles d'échantillons, exigences 18, 37, 57
- fichier de configuration 90
- fichier de renseignements sur l'analyse 90
- fichiers de définition des bases 87, 89
- fichiers de marqueurs 85
- fichiers InterOp 85, 90
- fichiers journaux 90
- filtre de pureté 87
- Flow Cell
 - amorçage 21, 40, 60
 - emplacement des amplifiats 86
 - imagerie 92
 - inspection 22, 25, 41, 44, 62, 64
 - positionnement 3, 21, 24, 40, 43, 61, 63
- Flow Cell d'amorçage 21, 40, 60
- fluidique
 - maintenance 27, 49
- fonctionnalités du matériel 1
- formules, personnaliser 17, 37, 57
- fuites 22, 25, 41, 44, 62, 64

G

- génération d'amplifiats
 - cBot et HiSeq 51
 - Flow Cell rapide 60

H

- HCS 4
 - ouverture 8
- HP7 et HP11 46
- HP8 et HP14 33
- HP9 et HP14 14
- HP9 et RMR 33
- HT1 53

I

- ICB
 - calcul des volumes 33, 47
 - division 31
 - exemple de préparation 33
- icônes 5
- identifiant de la Flow Cell, enregistrement 16, 55
- identifiant de la trousse de réactifs,
 - enregistrement 18, 37, 57
- images, enregistrement 16, 36, 55
- incorporation de la première base 26, 45, 65

- indexage 33
 - nombre de cycles 12, 29, 51
 - réactifs requis 14
- indicateurs de l'analyse
 - disponibilité par cycle 88
 - visualisation 26, 45, 65
- initialisation du logiciel 8
- initialisation du logiciel, dépannage 76
- installation, vérification de la fluidique 76
- intensités, surveillance 26, 45, 65
- interférences 86

J

- joints 6, 68, 73
- joints, dépannage 76
- journaux d'erreurs 85

L

- lavage après analyse 27, 49
- lavages
 - avantages 68
 - eau et maintenance 68
 - exigences du système 27, 49
 - exigences système 68
 - solution de lavage de maintenance 68, 71
- lavages à l'eau
 - durée et fréquence 27, 49
 - volumes distribués 28, 50, 67
- lavages de maintenance 68-69
 - durée 73-74
 - fréquence 68
 - réutilisation de la solution 68-69, 71
 - volumes distribués 71-74
- levier de Flow Cell 3
 - clignotant 76
 - orange 76
- levier de Flow Cell clignotant 76
- levier de Flow Cell orange 76
- librairies
 - chargement sur l'instrument 60
 - préparation 52
- librairies Nextera, primers 7, 46
- librairies Nextera, primers de réhybridation 83
- lignes de contrôle 17, 36, 56
- LIMS
 - paramètres 9
 - serveur 9
- localisation des amplifiats 86, 89

- logiciels
 - applications installées 4
 - dépannage 76
 - fonctionnalités 1

M

- maintenance préventive 68
- miniatures 90, 92
 - enregistrement 16, 36, 55
- mise en phase 86, 89
- mise en préphase 86
- mode, changement 73
- module optique 2

N

- no-call (N) 87
- nom de l'expérience 17, 36, 56
- nombre de cycles
 - calcul des volumes de l'ICB 33
 - chimie HiSeq v4 12
 - chimie rapide 51
 - chimie TruSeq v3 29
 - diviser les trousse de réactifs 81
 - effectués et entrés 17, 37, 56
 - par défaut 37, 57
- numéros de référence
 - consommables fournis par l'utilisateur 10
 - trousse de réactifs Illumina 6
 - trousse de réhybridation d'Illumina 82

O

- onglet TruSeq Controls 89
- options d'arrêt 77
- options d'interruption 80
- options de génération d'amplifiats, analyse
 - rapide 51, 57
- options de reprise 77

P

- paramètres
 - reprise d'une analyse 79
- paramètres de l'analyse, révision 18, 38, 57
- paramètres de la chimie 17, 37, 56
- paramètres, reprise d'analyses 79
- performance, caractéristiques 12, 29, 51
- personnalisation des formules 17, 37, 57

Phix, alignement 17, 36, 56
 plaques 84, 92
 positionnement des Flow Cell 21, 24, 40, 43, 61, 63
 positions des réactifs
 support des réactifs appariés 20, 39, 48, 59
 support SBS 19, 38, 58
 positions des réactifs appariés 20, 48
 positions des réactifs d'indexage 20, 39
 positions des réactifs de génération d'amplifiats 59
 positions des réactifs SBS 19, 38, 58
 positions, réactifs
 appariés 20, 48
 génération d'amplifiats 59
 indexage 20, 39
 SBS 19, 38, 58
 préparation à l'inactivité, durée acceptable 74
 préparation de HP3, SI ou DI 34
 préparation de l'amorçage 23, 42, 62
 préparation des réactifs, flux de travail TruSeq v3 31

Q

qualité des amplifiats 87

R

rapport de la première base 17, 36, 56
 rapports, incorporation de la première base 26, 45, 65
 réactifs 80
 analyses courtes 81
 manipulation après analyse 27, 49, 66
 réactifs d'indexage
 HiSeq v4 14
 TruSeq v3 33
 réactifs requis 33
 réactifs, SBS
 créer deux ensembles 81
 flux de travail TruSeq v3 31
 réactifs, stockage des troussees divisées 81-82
 réactifs, supports 3
 redémarrage de l'instrument 75
 réfrigérant pour réactifs, température 4
 réhybridation 82
 reprise d'analyses, paramètres 79
 réutilisation de la solution de lavage de maintenance 69

RTA 4, 84
 analyses arrêtées 77, 85
 fichiers d'entrée 84
 options d'arrêt 78
 reprise 79

S

SAV 4
 documentation 27, 46, 66
 fichiers InterOp 90
 version 85
 schéma d'indexage 18, 37, 57
 scores de qualité 87, 89
 surveillance 26, 45, 65
 service de surveillance Illumina Proactive 10
 solution de lavage de maintenance 68, 71
 station de chargement 60
 stockage de la solution de lavage de maintenance 68, 71
 stockage des données 16, 35, 55
 stockage des troussees de réactifs divisées 81-82
 structure des dossiers 91
 supports des réactifs 3
 surveillance à distance 16, 35, 55
 système de décompression 3
 système fluidique 3
 accès 3
 dépannage 76
 entretien 68

T

tableaux de qualité 87
 taille du dossier d'analyse 6
 témoins 16, 36, 55, 92
 température, réfrigérant pour réactifs 4
 trousse d'échantillon cBot double rapide 60
 troussees de réactifs 6
 troussees de réactifs Illumina, numéros de référence 6
 troussees de réactifs, rapide 7
 tube d'évacuation 23, 42, 54, 62, 70, 72

V

valeurs d'intensité 86
 vérification du volume 54
 volumes attendus
 amorçage 23, 42, 62

lavages à l'eau 28, 50, 67

lavages de maintenance 71-74

vérification du volume 54

volumes de réactif, diviser les troussees SBS 81-82

volumes distribués

amorçage 23, 42, 62

lavages à l'eau 28, 50, 67

lavages de maintenance 71-74

vérification du volume 54

volumes, diviser les troussees SBS 81-82

Assistance technique

Pour obtenir une assistance technique, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.

Site Web : www.illumina.com
 Courriel : techsupport@illumina.com

Numéros de téléphone de l'assistance clientèle d'Illumina

| Région | Sans frais | Numéro régional |
|------------------|-----------------|-----------------|
| Amérique du Nord | +1 800 809-4566 | |
| Allemagne | +49 8001014940 | +49 8938035677 |
| Australie | +1 800 775 688 | |
| Autriche | +43 800006249 | +43 19286540 |
| Belgique | +32 80077160 | +32 34002973 |
| Chine | 400 066 5835 | |
| Danemark | +45 80820183 | +45 89871156 |
| Espagne | +34 911899417 | +34 800300143 |
| Finlande | +358 800918363 | +358 974790110 |
| France | +33 805102193 | +33 170770446 |
| Hong Kong | 800960230 | |
| Irlande | +353 1800936608 | +353 016950506 |
| Italie | +39 800985513 | +39 236003759 |
| Japon | 0800 111 5011 | |
| Norvège | +47 800 16836 | +47 21939693 |
| Nouvelle-Zélande | 0 800 451 650 | |
| Pays-Bas | +31 8000222493 | +31 207132960 |
| Royaume-Uni | +44 8000126019 | +44 2073057197 |
| Singapour | +1 800 579 2745 | |
| Suède | +46 850619671 | +46 200883979 |
| Suisse | +41 565800000 | +41 800200442 |
| Taiïwan | 00806651752 | |
| Autres pays | +44 1799 534000 | |

Fiches signalétiques (SDS) : disponibles sur le site Web d'Illumina à l'adresse support.illumina.com/sds.html.

Documentation produit : disponible en téléchargement au format PDF sur le site Web d'Illumina. Rendez-vous sur support.illumina.com, sélectionnez un produit, puis cliquez sur **Documentation & Literature** (Documentation).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Californie 92122 États-Unis

+(1) 800 809-ILMN (4566)

+(1) 858 202-4566 (en dehors de l'Amérique du Nord)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Destiné à la recherche uniquement. Ne pas utiliser dans le cadre d'examens diagnostiques.

© 2018 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

illumina®