

NextSeq 550Dx, mode recherche

Guide de référence de l'instrument



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
Document n° 1000000041922 v01	Mars 2018	Ajout de renseignements sur le service de surveillance Illumina Proactive à la section Customize System Settings (Personnaliser les paramètres du système).
Document n° 1000000041922 v00	Novembre 2017	Publication originale.

Table des matières

Chapitre 1 Vue d'ensemble	1
À propos de ce guide	1
Introduction	1
Ressources supplémentaires	2
Composants de l'instrument	3
Présentation des consommables pour le séquençage	6
Chapitre 2 Pour commencer	11
Démarrage de l'instrument	11
Personnaliser les paramètres du système	12
Consommables et équipement fournis par l'utilisateur	13
Chapitre 3 Séquençage	15
Introduction	15
Flux de travail de séquençage	16
Préparer la cartouche de réactifs	16
Préparer la Flow Cell	17
Préparer des bibliothèques pour le séquençage	17
Configurer une analyse de séquençage	18
Surveiller la progression de l'analyse	25
Lavage automatique après analyse	27
Chapitre 4 Balayage	29
Introduction	29
Flux de travail de balayage	30
Télécharger le dossier DMAP	30
Charger la puce BeadChip dans l'adaptateur	31
Configurer un balayage	32
Surveiller la progression du balayage	34
Chapitre 5 Maintenance	37
Introduction	37
Effectuer un lavage manuel	37
Remplacer le filtre à air	40
Mises à jour logicielles	41
Options de redémarrage et d'arrêt	43
Annexe A Dépannage	45
Introduction	45
Fichiers de dépannage	45
Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques	46
Réservoir à réactifs usagés plein	48
Flux de travail de réhybridation	49

Erreurs de puce BeadChip et de balayage	51
Formules personnalisées et dossiers de formules	52
Message d'erreur RAID	53
Configurer les paramètres du système	53
Annexe B Real-Time Analysis	57
Présentation de Real-Time Analysis	57
Flux de travail de Real-Time Analysis	58
Annexe C Fichiers et dossiers de sortie	63
Fichiers de sortie de séquençage	63
Structure des dossiers de sortie de séquençage	66
Fichiers de sortie du balayage	67
Structure du dossier de sortie de balayage	67
Index	69
Assistance technique	73

Chapitre 1 Vue d'ensemble

À propos de ce guide	1
Introduction	1
Ressources supplémentaires	2
Composants de l'instrument	3
Présentation des consommables pour le séquençage	6

À propos de ce guide

Ce guide de référence présente les instructions d'utilisation de l'instrument NextSeq 550Dx en mode recherche.

Introduction

L'instrument NextSeq^{MC} 550Dx d'Illumina^{MD} est une solution unique qui permet une transition fluide entre le séquençage à débit élevé et le balayage de puce à ADN.

Fonctionnalités du séquençage

- ▶ **Séquençage à débit élevé** : l'instrument NextSeq^{MC} 550 permet le séquençage des exomes, du génome entier et des transcriptomes. Il prend en charge les bibliothèques TruSeq^{MC} et Nextera^{MC}.
- ▶ **Types de Flow Cell** : les Flow Cells sont disponibles dans des configurations pour débit moyen et débit élevé. Chaque type de Flow Cell est doté d'une cartouche de réactifs compatible préremplie.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** : ce logiciel d'analyse intégré exécute l'analyse des données sur instrument, ce qui comprend l'analyse d'images et la définition des bases. Le système NextSeq 550Dx utilise une version de RTA appelée RTA v2, qui comporte d'importants changements en matière d'architecture et de fonctionnalités. Pour plus de renseignements, consultez la section *Real-Time Analysis*, page 57.
- ▶ **Intégration de BaseSpace^{MD}** : le flux de travail de séquençage est intégré à BaseSpace, l'environnement informatique consacré à la génomique d'Illumina pour l'analyse des données, leur stockage et leur partage. Pour les instruments configurés pour BaseSpace, les renseignements sur les bibliothèques et les paramètres d'analyse sont précisés dans l'onglet Prep (Préparation) de BaseSpace. Les analyses configurées dans BaseSpace s'affichent dans l'interface de l'instrument pendant la configuration de l'analyse. Au cours de l'analyse, les fichiers de sortie sont transférés en temps réel vers BaseSpace ou BaseSpace Onsite.

Fonctionnalités du balayage de la puce à ADN

- ▶ **Balayage de la puce à ADN intégré au logiciel de commande** : le NextSeq 550Dx vous permet de passer du balayage de puce à ADN au séquençage à débit élevé sur le même instrument et à l'aide du même logiciel de commande.
- ▶ **Capacité d'imagerie étendue** : le système d'imagerie de l'instrument NextSeq 550Dx comprend des modifications logicielles et de platine qui permettent de réaliser l'imagerie d'une surface plus importante et, par conséquent, le balayage de puces BeadChip.
- ▶ **Types de puce BeadChip** : parmi les types de puce BeadChip compatibles figurent CytoSNP-12, CytoSNP-850K et Karyomap-12.
- ▶ **Adaptateur de puce BeadChip** : un adaptateur de puce BeadChip réutilisable permet de charger facilement une puce BeadChip sur l'instrument.
- ▶ **Analyse des données** : utilisez le logiciel BlueFuse^{MD} Multi pour analyser les données de la puce à ADN.

Ressources supplémentaires

La documentation suivante est disponible en téléchargement sur le site Web d'Illumina.

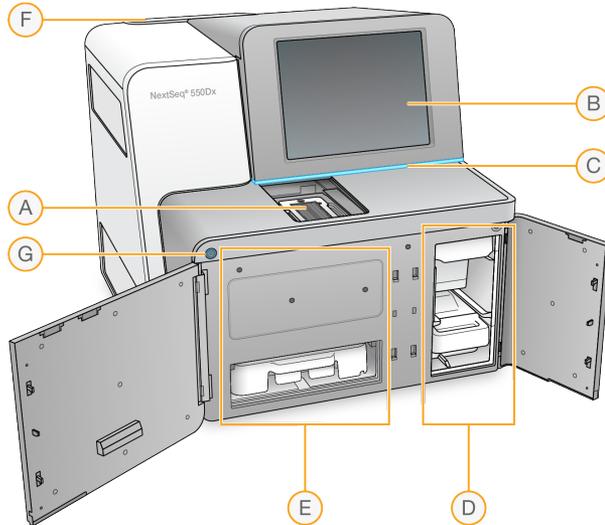
Ressource	Description
<i>Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)</i>	Donne les instructions d'utilisation de l'instrument et les procédures de dépannage en mode diagnostic.
<i>Guide de préparation du site de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009869)</i>	Fournit les spécifications relatives à l'espace du laboratoire, les exigences électriques et les considérations environnementales.
<i>Guide de sécurité et de conformité de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009868)</i>	Fournit des renseignements concernant les questions de sécurité, les déclarations de conformité et l'étiquetage de l'instrument.
<i>Guide de conformité du lecteur RFID (document n° 1000000030332)</i>	Fournit des renseignements sur le lecteur RFID de l'instrument, les certificats de conformité et les questions de sécurité.
<i>Dénaturation et dilution de librairies pour le système NextSeq (document n° 15048776)</i>	Fournit des instructions pour la dénaturation et la dilution de librairies préparées en vue d'une analyse de séquençage, et pour la préparation d'un contrôle PhiX facultatif. Cette étape s'applique à la plupart des types de librairie.
<i>Guide des primers personnalisés NextSeq (document n° 15057456)</i>	Fournit des renseignements sur l'utilisation de primers de séquençage personnalisés à la place des primers de séquençage d'Illumina.
<i>Aide de BaseSpace (help.basespace.illumina.com)</i>	Fournit des renseignements concernant l'utilisation de BaseSpace ^{MD} et les options d'analyse disponibles.

Consultez la [page d'assistance de l'instrument NextSeq 550Dx](#) 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

L'instrument NextSeq 550Dx comprend un moniteur tactile, une barre d'état et quatre compartiments.

Figure 1 Composants de l'instrument



- A **Compartiment d'imagerie** : contient la Flow Cell pour le séquençage ou l'adaptateur de puce BeadChip pour le balayage.
- B **Moniteur tactile** : permet la configuration et le paramétrage sur l'instrument à l'aide de l'interface du logiciel de commande.
- C **Barre d'état** : indique si l'instrument est en cours de traitement (bleu), s'il nécessite une attention particulière (orange) ou s'il est prêt pour le séquençage (vert).
- D **Compartiment du tampon** : contient la cartouche de tampon et le réservoir de réactifs usagés.
- E **Compartiment de réactifs** : contient la cartouche de réactifs.
- F **Compartiment du filtre à air** : contient le filtre à air. Le filtre est accessible par l'arrière de l'instrument.
- G **Bouton d'alimentation** : sert à mettre sous tension l'instrument et l'ordinateur de l'instrument et à les fermer.

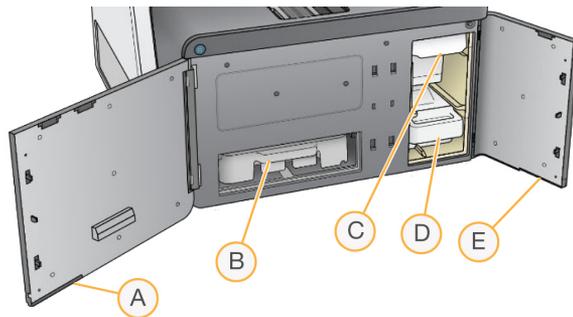
Compartiment d'imagerie

Le compartiment d'imagerie contient la platine, qui comprend trois broches d'alignement pour le positionnement de la Flow Cell pour un séquençage ou de l'adaptateur de puce BeadChip pour un balayage. Après le chargement de la Flow Cell ou de l'adaptateur de puce BeadChip, la porte du compartiment d'imagerie se ferme automatiquement et positionne les composants correctement.

Compartiments des réactifs et du tampon

Pour paramétrer une analyse de séquençage sur l'instrument NextSeq 550Dx, vous devez accéder au compartiment des réactifs et au compartiment du tampon pour charger les consommables de l'analyse et vider le réservoir à réactifs usagés.

Figure 2 Compartiments des réactifs et du tampon



- A **Porte du compartiment de réactifs** : elle ferme le compartiment des réactifs à l'aide d'un verrou qui se trouve sous la section inférieure droite de la porte. Le compartiment des réactifs contient la cartouche de réactifs.
- B **Cartouche de réactifs** : la cartouche de réactifs est un consommable à usage unique prérempli.
- C **Cartouche du tampon** : la cartouche du tampon est un consommable à usage unique prérempli.
- D **Réservoir à réactifs usagés** : les réactifs usagés sont recueillis pour leur mise au rebut après chaque analyse.
- E **Porte du compartiment du tampon** : elle ferme le compartiment du tampon à l'aide d'un verrou qui se trouve sous le coin inférieur gauche de la porte.

Compartiment du filtre à air

Le compartiment du filtre à air contient le filtre à air et est situé à l'arrière de l'instrument. Remplacez le filtre à air tous les 90 jours. Pour obtenir de l'information sur le remplacement du filtre, consultez la section [Remplacer le filtre à air, page 40](#).

Logiciels de l'instrument NextSeq 550Dx

Les logiciels de l'instrument comprennent des applications intégrées qui effectuent des analyses de séquençage ou des balayages de puce à ADN.

- ▶ **NextSeq Control Software (NCS)** : le logiciel de commande vous accompagne à chaque étape de configuration d'une analyse de séquençage ou d'un balayage de puce à ADN.
- ▶ **Real-Time Analysis (RTA)** : pour les analyses de séquençage, RTA effectue l'analyse des images et la définition des bases lors de l'analyse. L'instrument NextSeq 550Dx utilise RTA v2, qui diffère grandement des versions antérieures en matière de fonctionnalités et d'architecture. Pour plus de renseignements, consultez la section [Real-Time Analysis, page 57](#).

Icônes d'état

Une icône d'état située dans le coin supérieur droit de l'écran du logiciel de commande signale tout changement de situation au cours de la configuration de l'analyse ou au cours de l'analyse.

Icône d'état	Nom de l'état	Description
	État OK	Le système est normal.
	Traitement	Le système est en cours de traitement.

Icône d'état	Nom de l'état	Description
	Avertissement	Un avertissement a eu lieu. Les avertissements n'interrompent pas l'analyse et ne nécessitent pas d'intervention pour la poursuite de l'analyse.
	Erreur	Une erreur a eu lieu. Les erreurs nécessitent une intervention avant la poursuite de l'analyse.
	Action requise	Un avis a été généré et nécessite une attention. Reportez-vous au message pour avoir des renseignements supplémentaires.

Lorsqu'un changement de situation se produit, l'icône clignote afin de vous alerter. Sélectionnez l'icône pour afficher une description de la situation. Sélectionnez **Acknowledge** (Accuser réception) pour accepter le message et **Close** (Fermer) pour fermer la boîte de dialogue.



REMARQUE

Lorsque vous acceptez un message, l'icône est réinitialisée et le message est grisé. Le message est toujours visible par l'utilisateur s'il clique sur l'icône, mais disparaît après le redémarrage du logiciel de commande (NCS).

Bouton d'alimentation

Le bouton d'alimentation situé sur la partie avant de l'instrument NextSeq 550Dx met sous tension l'instrument et l'ordinateur de l'instrument. Il réalise les actions suivantes en fonction de l'état de l'alimentation de l'instrument. Par défaut, l'instrument NextSeq 550Dx démarre en mode diagnostic.

Pour obtenir de l'information sur l'arrêt de l'instrument, consultez la section [Arrêter l'instrument, page 43](#).

État de l'alimentation	Action
Instrument hors tension	Appuyez brièvement sur le bouton pour mettre l'instrument sous tension.
Instrument sous tension	Appuyez brièvement sur le bouton pour mettre l'instrument hors tension. Une boîte de dialogue s'affiche à l'écran pour confirmer que l'instrument s'est arrêté normalement.
Instrument sous tension	Appuyez et maintenez le bouton d'alimentation enfoncé pendant 10 secondes pour provoquer un arrêt forcé de l'instrument et de l'ordinateur de l'instrument. Utilisez cette méthode pour mettre l'instrument hors tension uniquement si l'instrument ne répond pas.



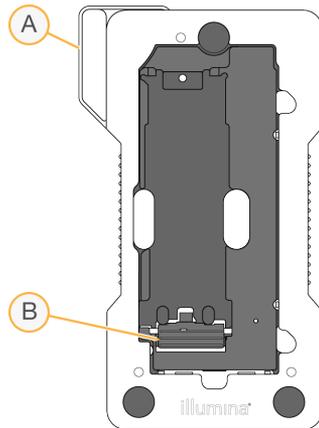
REMARQUE

Mettre l'instrument hors tension au cours d'une analyse de séquençage arrête immédiatement celle-ci. L'arrêt d'une analyse est définitif. Les consommables de l'analyse ne peuvent pas être réutilisés et les données de séquençage de l'analyse ne sont pas enregistrées.

Présentation de l'adaptateur de puce BeadChip réutilisable

L'adaptateur de puce BeadChip contient la puce BeadChip pendant le balayage. La puce BeadChip est fixée dans l'étagère encastrée de l'adaptateur grâce à la pince de maintien. L'adaptateur de puce BeadChip est ensuite chargé sur la platine, dans le compartiment d'imagerie.

Figure 3 Adaptateur de puce BeadChip réutilisable



- A Adaptateur de puce BeadChip
- B Pince de maintien

Présentation des consommables pour le séquençage

Pour faire une analyse de séquençage en mode recherche sur l'instrument NextSeq 550Dx, il faut une trousse NextSeq 500/550 à usage unique ou une trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé. Chaque trousse comporte une Flow Cell ainsi que les réactifs nécessaires à une analyse de séquençage.

La Flow Cell, la cartouche de réactifs et la cartouche de tampon utilisent une identification par radiofréquence (RFID) pour un suivi précis des consommables et pour des questions de compatibilité.

REMARQUE

Conservez les consommables de séquençage dans leur boîte jusqu'à leur utilisation.

Si vous utilisez une trousse de réactifs NextSeq 550Dx à débit élevé pour une analyse en mode recherche, toutes les composantes doivent provenir du même lot de trousse. La trousse NextSeq 500/550 ne doit pas être utilisée pour une analyse en mode diagnostic.

Étiquetage de compatibilité de la trousse

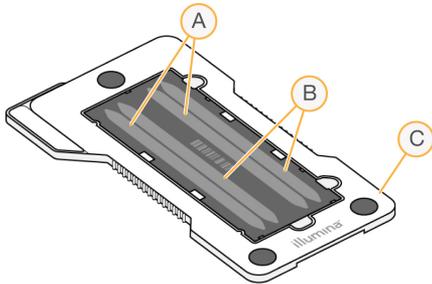
Des codes de couleurs figurent sur les composants de la trousse, afin d'indiquer la compatibilité des Flow Cell avec les cartouches de réactifs. Utilisez toujours une cartouche de réactifs et une Flow Cell compatibles. La cartouche de tampon est universelle.

Toutes les Flow Cell et toutes les cartouches de réactifs sont étiquetées **High** (Élevé) ou **Mid** (Moyen). Vérifiez toujours l'étiquette lorsque vous préparez les consommables pour une analyse.

Type de trousse	Marquage sur l'étiquette
Composants de la trousse de débit élevé	
Composants de la trousse de débit moyen	

Présentation de la Flow Cell

Figure 4 Cartouche de Flow Cell



- A Paire de lignes A : lignes 1 et 3
- B Paire de lignes B : lignes 2 et 4
- C Châssis de la cartouche de Flow Cell

La Flow Cell est un substrat de verre qui sert de support à la génération des amplifiats et à la réaction de séquençage. La Flow Cell est enchâssée dans une cartouche de Flow Cell.

La Flow Cell contient quatre lignes qui sont imagées par paires.

- ▶ Les lignes 1 et 3 (paire de lignes A) sont imagées simultanément.
- ▶ Les lignes 2 et 4 (paire de lignes B) sont imagées lorsque l'imagerie de la paire de lignes A est terminée.

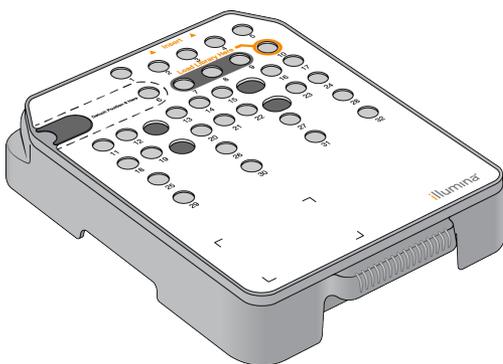
Bien que la Flow Cell contienne quatre lignes, une seule librairie ou un seul ensemble de librairies uniquement est séquençé sur la Flow Cell. Les librairies sont chargées sur la cartouche de réactifs dans un réservoir unique et transférées automatiquement sur les quatre lignes de la Flow Cell.

Chaque ligne est imagée par petites zones d'imagerie appelées plaques. Pour plus de renseignements, consultez la section *Plaques de la Flow Cell*, page 63.

Présentation de la cartouche de réactifs

La cartouche de réactifs est un consommable à usage unique avec suivi RFID, doté de réservoirs recouverts d'un opercule en aluminium qui sont préremplis de réactifs d'amplification et de séquençage.

Figure 5 Cartouche de réactifs



La cartouche de réactifs contient un réservoir prévu pour le chargement des librairies préparées. Après le lancement de l'analyse, les librairies sont transférées automatiquement du réservoir à la Flow Cell.

Plusieurs réservoirs sont réservés pour le lavage après analyse automatique. La solution de lavage est pompée de la cartouche de tampon jusqu'aux réservoirs réservés, à travers le système, puis jusqu'au réservoir de réactifs usagés.

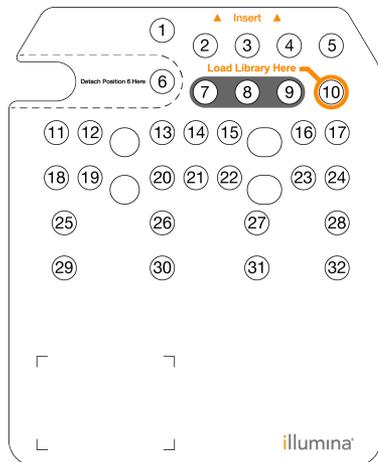


AVERTISSEMENT

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 une blouse de laboratoire adaptée 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.

Réservoirs réservés

Figure 6 Réservoirs numérotés



Position	Description
7, 8 et 9	Réservées aux primers personnalisés facultatifs
10	Charger les librairies

Pour plus de renseignements sur les primers personnalisés, consultez le *Guide des primers personnalisés NextSeq (document n° 15057456)*.

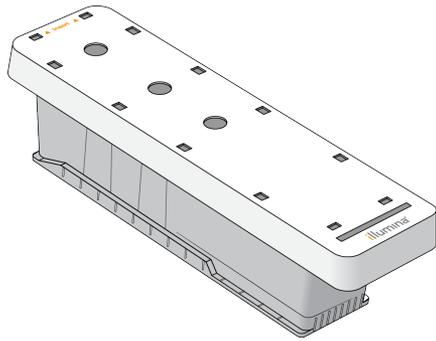
Réservoir amovible en position n° 6

La cartouche de réactifs préremplie comprend un réactif de dénaturation en position n° 6 qui contient du formamide. Pour faciliter l'élimination sûre de tout réactif non utilisé après l'analyse de séquençage, le réservoir en position n° 6 est amovible. Pour plus de renseignements, consultez la section *Retirer le réservoir usagé de la position n° 6, page 22*.

Présentation de la cartouche de tampon

La cartouche de tampon est un consommable à usage unique contenant trois réservoirs préremplis de solutions tampons et d'une solution de lavage. Le contenu de la cartouche de tampon suffit au séquençage d'une Flow Cell.

Figure 7 Cartouche de tampon



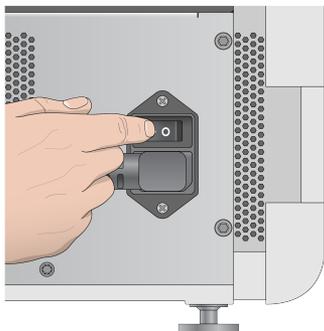
Chapitre 2 Pour commencer

Démarrage de l'instrument	11
Personnaliser les paramètres du système	12
Consommables et équipement fournis par l'utilisateur	13

Démarrage de l'instrument

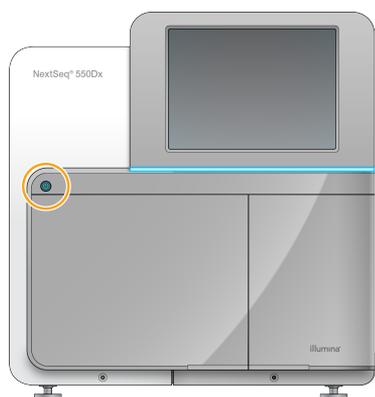
Mettez l'interrupteur principal en position I (Marche).

Figure 8 Interrupteur d'alimentation situé à l'arrière de l'instrument



- 1 Appuyez sur le bouton d'alimentation situé au-dessus du compartiment de réactifs. Le bouton d'alimentation active l'alimentation de l'instrument et démarre l'ordinateur et les logiciels intégrés à l'instrument.
Par défaut, l'instrument démarre en mode diagnostic.

Figure 9 Bouton d'alimentation situé à l'avant de l'instrument



- 2 Attendez le chargement complet du système d'exploitation.
Le logiciel d'exploitation de NextSeq 550Dx (NOS) démarre et initialise automatiquement le système. À la fin de l'étape d'initialisation, l'écran d'accueil s'ouvre.
- 3 Entrez votre nom d'utilisateur et votre mot de passe de Local Run Manager.
Pour obtenir des renseignements sur les mots de passe de Local Run Manager, consultez le *Guide de référence de l'instrument NextSeq 550Dx (document n° 1000000009513)*.
- 4 Cliquez sur **Login** (Ouvrir une session).
La page d'accueil s'ouvre et comporte les icônes Sequence (Séquence), Local Run Manager, Manage Instrument (Gérer l'instrument) et Perform Wash (Procéder au lavage).

- 5 Utilisez la commande Reboot to RUO (Redémarrer en mode recherche uniquement) du logiciel d'exploitation pour arrêter l'instrument de façon sécuritaire et le redémarrer en mode recherche.
 - ▶ Sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
 - ▶ Sélectionnez **Reboot/Shut Down** (Redémarrer/Arrêter).
 - ▶ Sélectionnez **Reboot to RUO** (Redémarrer en mode recherche uniquement).
- 6 Attendez le chargement complet du système d'exploitation.
Le logiciel de commande (NCS) démarre et initialise le système automatiquement. À la fin de l'étape d'initialisation, l'écran d'accueil s'ouvre.
- 7 Si votre système a été configuré pour demander des identifiants, connectez-vous à Windows en utilisant le nom d'utilisateur et le mot de passe de votre site.



REMARQUE

Si vous ne savez pas dans quel mode se trouve l'instrument, consultez la section *Indicateurs de mode de l'instrument*.

Indicateurs de mode de l'instrument

Le tableau ci-dessous présente les indicateurs de mode de l'instrument affichés à l'écran de NCS ou de NOS. Pour savoir comment passer du mode recherche au mode diagnostic, consultez la section *Options de redémarrage et d'arrêt*, page 43.

Mode	Écran d'accueil	Barre de couleur	Orientation de l'icône d'état
Diagnostic Mode (Mode diagnostic)	Welcome to NextSeqDx (Bienvenue dans NextSeqDx)	Bleu	Horizontal
Research Mode (Mode recherche)	Welcome to NextSeq (Bienvenue dans NextSeq)	Orange	Vertical

Personnaliser les paramètres du système

Le logiciel de commande comprend des paramètres de système personnalisables :

- ▶ Préférences d'entrée
- ▶ Paramètres audio
- ▶ Nom de l'instrument
- ▶ Préférences de configuration de l'analyse
- ▶ Élimination des réactifs inutilisés

Personnaliser l'avatar et le surnom de l'instrument

- 1 Depuis l'écran Manage Instrument (Gérer l'instrument), sélectionnez **System Customization** (Personnalisation du système).
- 2 Pour attribuer l'avatar de votre choix à l'instrument, sélectionnez **Browse** (Parcourir) et localisez l'image.
- 3 Saisissez le nom d'instrument de votre choix dans le champ Nick Name (Surnom).
- 4 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour enregistrer les paramètres et quitter l'écran.
L'image et le nom apparaissent dans le coin supérieur gauche de chaque écran.

Configurer l'option de clavier et l'indicateur sonore

- 1 Depuis l'écran Manage Instrument (Gérer l'instrument), sélectionnez **System Customization** (Personnalisation du système).
- 2 Cochez la case **Use on-screen keyboard** (Utiliser le clavier à l'écran) afin d'activer le clavier à l'écran pour saisir des renseignements à communiquer à l'instrument.
- 3 Cochez la case **Play audio** (Lire les sons) pour activer les indicateurs audio pour les événements suivants.
 - ▶ Lors de l'initialisation de l'instrument
 - ▶ Au démarrage d'une analyse
 - ▶ Lors de certaines erreurs
 - ▶ Lorsqu'une interaction avec l'utilisateur est nécessaire
 - ▶ À la fin d'une analyse
- 4 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour enregistrer les paramètres et quitter l'écran.

Configurer les options de configuration de l'analyse

- 1 Depuis l'écran Manage Instrument (Gérer l'instrument), sélectionnez **System Customization** (Personnalisation du système).
- 2 Cochez la case **Use Advanced Load Consumables** (Utiliser les consommables de chargement avancé) pour activer l'option permettant le chargement de tous les consommables de l'analyse à partir d'un écran unique.
- 3 Cochez la case **Skip Pre-Run Check Confirmation** (Ignorer la confirmation de la vérification avant analyse) pour démarrer automatiquement le séquençage ou le balayage une fois la vérification automatique correctement effectuée.
- 4 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour enregistrer les paramètres et quitter l'écran.

Configurer l'option d'élimination automatique

- 1 Depuis l'écran Manage Instrument (Gérer l'instrument), sélectionnez **System Customization** (Personnalisation du système).
- 2 Cochez la case **Purge Consumables at End of Run** (Éliminer les consommables à la fin de l'analyse) pour éliminer automatiquement les réactifs inutilisés de la cartouche de réactifs vers le réservoir des réactifs usagés après chaque analyse.



REMARQUE

L'élimination automatique des consommables allonge la durée du flux de travail.

- 3 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour enregistrer les paramètres et quitter l'écran.

Consommables et équipement fournis par l'utilisateur

Les consommables et l'équipement suivants sont utilisés pour la préparation des consommables, le séquençage et la maintenance de l'instrument.

Consommables fournis par l'utilisateur pour les analyses de séquençage

Consommable	Fournisseur	Utilisation
1 N NaOH (hydroxyde de sodium)	Fournisseur de laboratoire général	Dénaturation des librairies, dilution à 0,2 N
Tris-HCl 200 mM, pH7	Fournisseur de laboratoire général	Dénaturation de librairie
Lingettes imbibées d'alcool isopropylique à 70 % ou Éthanol à 70 %	VWR, n° de référence 95041-714 (ou équivalent) Fournisseur de laboratoire général	Nettoyage de la Flow Cell et usage général
Tissu de laboratoire non pelucheux	VWR, n° de référence 21905-026 (ou équivalent)	Nettoyage de la Flow Cell et usage général

Consommables fournis par l'utilisateur pour la maintenance de l'instrument

Consommable	Fournisseur	Utilisation
NaOCl, 5 % (hypochlorite de sodium)	Sigma-Aldrich, n° de référence 239305 (ou produit de catégorie laboratoire équivalent)	Lavage de l'instrument à l'aide de la fonction de lavage manuel après analyse; dilution à 0,12 %
Tween 20	Sigma-Aldrich, n° de référence P7949	Lavage de l'instrument à l'aide des options de lavage manuel, dilution à 0,05 %
Eau de laboratoire	Fournisseur de laboratoire général	Lavage de l'instrument (lavage manuel)
Filtre à air	Illumina, n° de référence 20022240	Nettoyage de l'air utilisé par l'instrument pour le refroidissement

Recommandations à propos de l'eau de laboratoire

Utilisez toujours de l'eau de laboratoire ou de l'eau désionisée pour réaliser des procédures sur l'instrument. N'utilisez jamais d'eau courante. Utilisez exclusivement les eaux qui suivent ou des eaux de qualité équivalente :

- ▶ Eau désionisée
- ▶ PW1 d'Illumina
- ▶ Eau 18 mégohms (MΩ)
- ▶ Eau Milli-Q
- ▶ Eau Super-Q
- ▶ Eau de qualité biologie moléculaire

Équipement fourni par l'utilisateur

Élément	Source
Congélateur, de -15 à -25 °C, sans givre	Fournisseur de laboratoire général
Réfrigérateur, de 2 à 8 °C	Fournisseur de laboratoire général

Chapitre 3 Séquençage

Introduction	15
Flux de travail de séquençage	16
Préparer la cartouche de réactifs	16
Préparer la Flow Cell	17
Préparer des bibliothèques pour le séquençage	17
Configurer une analyse de séquençage	18
Surveiller la progression de l'analyse	25
Lavage automatique après analyse	27

Introduction

Pour effectuer une analyse de séquençage sur l'instrument NextSeq 550Dx, préparez une cartouche de réactifs et une Flow Cell, puis suivez les indications du logiciel afin de configurer et de démarrer l'analyse. La génération d'amplifiats et le séquençage sont effectués sur instrument. Après l'analyse, le lavage de l'instrument commence automatiquement à l'aide des composants déjà chargés dans l'instrument.

Génération d'amplifiats

Lors de la génération d'amplifiats, les molécules d'ADN uniques sont liées à la surface de la Flow Cell, puis subissent une amplification de façon à former des amplifiats.

Séquençage

L'imagerie des amplifiats est réalisée par chimie de séquençage à deux canaux et combinaison de filtres propres à chacun des nucléotides marqués par fluorescence. Lorsque l'imagerie d'une plaque sur la Flow Cell est terminée, le système passe à la plaque suivante. Ce processus se répète pour chaque cycle de séquençage. Après l'analyse des images, le logiciel définit les bases, les filtre et leur attribue un score de qualité.

Surveillez la progression et les statistiques de l'analyse à partir de l'interface du logiciel de commande, de l'onglet Run (Analyse) dans BaseSpace ou d'un ordinateur en réseau utilisant le logiciel SAV (visualiseur d'analyse de séquençage). Consultez la section [Logiciel SAV \(Visualiseur d'analyse de séquençage\)](#), page 27.

Analyse

Pendant la progression de l'analyse, le logiciel de commande transfère automatiquement les fichiers de définition des bases (BCL) vers BaseSpace ou l'emplacement de sortie indiqué pour l'analyse secondaire.

Plusieurs méthodes d'analyse sont disponibles en fonction de votre application. Pour plus de renseignements, consultez *l'aide de BaseSpace* (help.basespace.illumina.com).

Durée de l'analyse de séquençage

La durée de l'analyse de séquençage dépend du nombre de cycles réalisés. La longueur d'analyse maximale correspond à une analyse à lecture appariée de 150 cycles par lecture (2 x 150), auxquels s'ajoutent jusqu'à huit cycles pour chacune des deux lectures d'index.

Nombre de cycles d'une lecture

Au cours d'une analyse de séquençage, une lecture comprend un cycle de plus que le nombre de cycles analysés. Par exemple, une analyse de 150 cycles à lecture appariée effectuée des lectures de 151 cycles (2×151), pour un total de 302 cycles. À la fin de l'analyse, 2×150 cycles sont analysés. Le cycle supplémentaire est requis pour les calculs de mise en phase et en préphase.

Flux de travail de séquençage



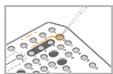
Pour les configurations en environnement BaseSpace d'Illumina ou BaseSpace Onsite : configurez l'analyse dans l'onglet Prep (Préparation) de BaseSpace. Consultez l'*aide de BaseSpace* (help.basespace.illumina.com).



Préparez une nouvelle cartouche de réactifs : décongelez et inspectez.
Préparez une nouvelle Flow Cell : amenez à température ambiante, déballez et inspectez.



Dénaturez et diluez les bibliothèques (ne s'applique pas à tous les types de bibliothèques). Consultez *Dénaturation et dilution de bibliothèques pour le système NextSeq* (document n° 15048776).



Chargez la dilution de la bibliothèque sur la cartouche de réactifs dans le réservoir n° 10.



À partir de l'interface logicielle, sélectionnez **Sequence** (Séquence) pour lancer les étapes de configuration de l'analyse.



Chargez la Flow Cell.



Videz et rechargez le réservoir de réactifs usagés.
Chargez la cartouche de tampon et la nouvelle cartouche de réactifs.



Examinez les paramètres de l'analyse et les résultats de la vérification automatique. Sélectionnez **Start** (Démarrer).



Surveillez votre analyse à partir de l'interface du logiciel de commande, de l'onglet Run (Analyse) sur BaseSpace ou depuis un ordinateur en réseau utilisant le visualiseur d'analyse de séquençage.



Un lavage de l'instrument démarre automatiquement lorsque le séquençage est terminé.

Préparer la cartouche de réactifs

Assurez-vous de suivre attentivement les directives applicables à la cartouche de réactifs pour un séquençage réussi.

- 1 Retirez la cartouche de réactifs de son lieu de stockage maintenu entre -25 et -15 °C.

- 2 Choisissez l'une des méthodes suivantes pour décongeler les réactifs. N'immergez pas la cartouche. Après la décongélation de la cartouche, asséchez-la avant de passer à l'étape suivante.

Température	Durée de décongélation	Limite de stabilité
Bain d'eau entre 15 et 30 °C	60 minutes	Ne pas dépasser 6 heures
2 à 8 °C	7 heures	Ne pas dépasser 5 jours



REMARQUE

Si plus d'une cartouche est décongelée dans le même bain d'eau, prolongez le temps de décongélation.

- 3 Retournez la cartouche cinq fois pour mélanger.
- 4 Inspectez le dessous de la cartouche afin de vous assurer que les réactifs sont décongelés et ne contiennent pas de précipités. Confirmez que les positions 29, 30, 31 et 32 sont décongelées, car elles sont les plus grosses et prendront plus de temps à décongeler.
- 5 Tapotez doucement sur la paillasse pour réduire les bulles d'air. Pour obtenir de meilleurs résultats, chargez directement l'échantillon et configurez l'analyse.



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.

Préparer la Flow Cell

- 1 Sortez un nouvel emballage de Flow Cell du lieu de stockage réfrigéré à une température maintenue entre 2 °C et 8 °C.
- 2 Laissez l'emballage ouvert de la Flow Cell à température ambiante pendant 30 minutes.



REMARQUE

Si l'emballage en papier aluminium est intact, la Flow Cell peut rester à température ambiante durant 12 heures. Évitez les modifications de température répétées de la Flow Cell.

Préparer des bibliothèques pour le séquençage

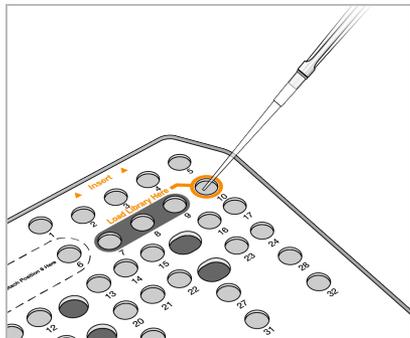
Dénaturer et diluer des bibliothèques

Dénaturez et diluez les bibliothèques à un volume de chargement de 1,3 ml et une concentration de chargement de 1,8 pmol. En pratique, la concentration de chargement peut varier selon les méthodes de préparation et de quantification des bibliothèques. Pour connaître les instructions, consultez le *Guide de dénaturation et de dilution des bibliothèques pour le système NextSeq (document n° 15048776)*.

Chargement des bibliothèques sur la cartouche de réactifs

- 1 Nettoyez l'opercule en aluminium recouvrant le réservoir n° 10 étiqueté **Load Library Here** (Charger la bibliothèque ici) à l'aide d'un tissu non pelucheux.
- 2 Percez l'opercule avec une pointe de pipette propre de 1 ml.
- 3 Chargez 1,3 ml de bibliothèque préparée à 1,8 pmol dans le réservoir n° 10 étiqueté **Load Library Here** (Charger la bibliothèque ici). Évitez de toucher l'opercule en aluminium pendant le transfert du produit.

Figure 10 Charger les bibliothèques



Configurer une analyse de séquençage

- 1 Sur l'écran d'accueil, cliquez sur **Experiment** (Expérience), puis sélectionnez **Sequence** (Séquence). La commande Sequence (Séquence) ouvre la porte du compartiment d'imagerie, libère les consommables utilisés lors d'une analyse précédente et ouvre une série d'écrans de configuration de l'analyse. Un court délai est normal.

Si l'instrument est configuré pour BaseSpace, vous êtes invité à vous connecter à BaseSpace.

Si l'instrument est configuré en mode autonome, l'étape suivante est le chargement de la Flow Cell.

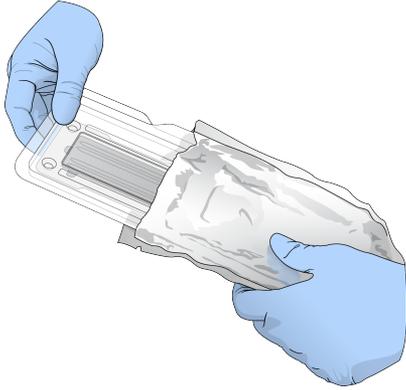
Se connecter à BaseSpace

- 1 Saisissez votre nom d'utilisateur et votre mot de passe BaseSpace.
- 2 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Charger la Flow Cell

- 1 Retirez la Flow Cell de l'analyse précédente.
- 2 Sortez la Flow Cell de son emballage en aluminium.

Figure 11 Retirer de l'emballage en aluminium



- 3 Ouvrez l'emballage double coque en plastique transparent et sortez la Flow Cell.

Figure 12 Retirer de l'emballage double coque



- 4 Nettoyez la surface en verre de la Flow Cell à l'aide d'une lingette alcoolisée non pelucheuse. Séchez le verre à l'aide d'un chiffon de laboratoire peu pelucheux.

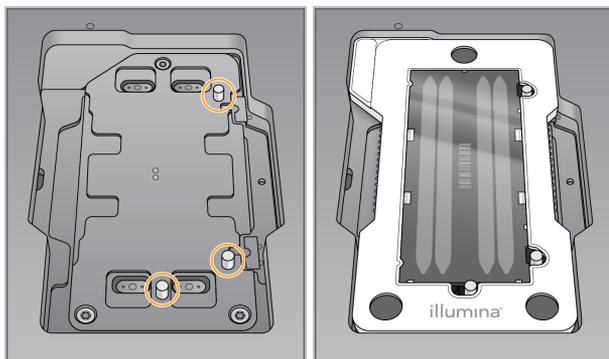


REMARQUE

Assurez-vous que la surface de verre de la Flow Cell est propre. Au besoin, répétez les étapes de nettoyage.

- 5 Alignez la Flow Cell sur les broches d'alignement et placez-la sur la platine.

Figure 13 Charger la Flow Cell



- 6 Sélectionnez **Load** (Charger).
La porte se ferme automatiquement, l'identifiant de la Flow Cell s'affiche à l'écran et les capteurs sont activés.



REMARQUE

Éloignez vos mains de la porte de la Flow Cell pendant sa fermeture pour éviter de vous faire pincer les doigts.

- 7 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Vider le réservoir à réactifs usagés

- 1 Ouvrez la porte du compartiment de tampon à l'aide du verrou qui se trouve sous le coin inférieur gauche de la porte.
- 2 Retirez le réservoir à réactifs usagés et jetez son contenu conformément aux normes en vigueur.

Figure 14 Retirer le réservoir à réactifs usagés



REMARQUE

Placez votre autre main sous le contenant lorsque vous le retirez afin de le soutenir.

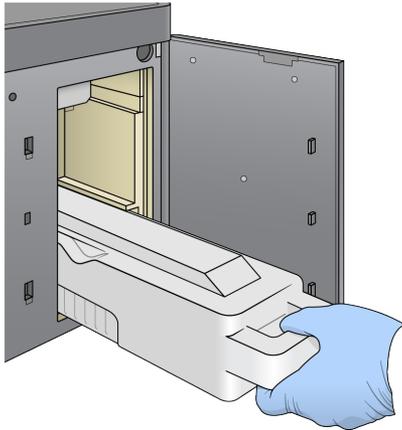


AVERTISSEMENT

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 une blouse de laboratoire adaptée 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.

- 3 Faites glisser le réservoir à réactifs usagés vide dans le compartiment de tampon jusqu'à la butée. Un déclic indique que le contenant est en place.

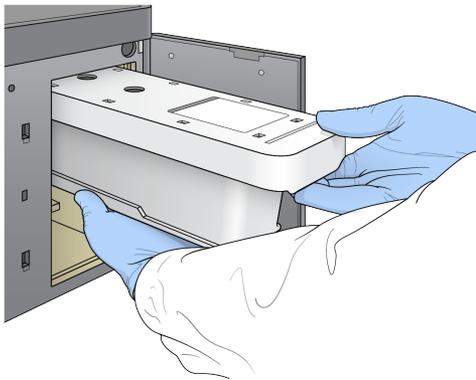
Figure 15 Charger le réservoir à réactifs usagés vide



Charger la cartouche de tampon

- 1 Retirez la cartouche de tampon usagée du compartiment supérieur.
Une certaine force est nécessaire pour soulever et retirer la cartouche de tampon.
- 2 Glissez une nouvelle cartouche de tampon dans le compartiment de tampon jusqu'à la butée.
Un déclic indique que la cartouche est en position, l'identifiant de la cartouche de tampon s'affiche à l'écran et le capteur est activé.

Figure 16 Charger la cartouche de tampon



- 3 Fermez la porte du compartiment de tampon et sélectionnez **Next** (Suivant).

Charger la cartouche de réactifs

- 1 Ouvrez la porte du compartiment des réactifs à l'aide du verrou qui se trouve sous le coin inférieur droit de la porte.
- 2 Retirez la cartouche de réactifs usagée du compartiment de réactifs. Mettez des contenus inutilisés au rebut conformément aux normes en vigueur.



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.

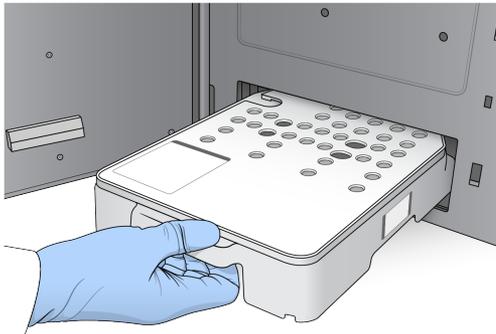


REMARQUE

Le réservoir à la position 6 est amovible pour faciliter la mise au rebut en toute sécurité des réactifs inutilisés. Pour plus de renseignements, consultez la section *Retirer le réservoir usagé de la position n°6*, page 22.

- 3 Faites glisser la cartouche de réactifs dans le compartiment de réactifs jusqu'à ce qu'elle s'arrête, puis refermez la porte du compartiment de réactifs.

Figure 17 Charger la cartouche de réactifs

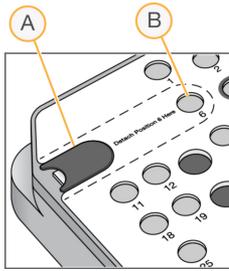


- 4 Sélectionnez **Load** (Charger).
Le logiciel positionne automatiquement la cartouche (environ 30 secondes), l'identifiant de la cartouche de réactifs s'affiche à l'écran et les capteurs sont activés.
- 5 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Retirer le réservoir usagé de la position n° 6

- 1 Après avoir retiré la cartouche de réactifs **usagés** de l'instrument, retirez le couvercle de protection en caoutchouc recouvrant la fente à côté de la position n° 6.

Figure 18 Position n° 6 amovible



- A Couverture de protection en caoutchouc
- B Position n° 6

- 2 Appuyez sur l'onglet en plastique transparent, puis poussez vers la gauche pour éjecter le réservoir.
- 3 Mettez le réservoir au rebut conformément aux normes de sécurité.

Indiquer les paramètres de l'analyse

Les étapes figurant sur l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse) diffèrent selon la configuration du système :

- ▶ **BaseSpace ou BaseSpace Onsite** : l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse) indique les analyses configurées avec l'onglet Prep (Préparation) de BaseSpace. Si l'analyse prévue n'apparaît pas sur l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse), vérifiez qu'elle est marquée pour séquençage dans BaseSpace.
- ▶ **Autonome** : l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse) comporte des champs permettant de définir les paramètres de l'analyse.

Sélectionner une analyse disponible (Configuration BaseSpace)

- 1 Sélectionnez le nom d'une analyse dans la liste des analyses disponibles.
Utilisez les flèches haut et bas pour faire défiler la liste ou saisissez le nom d'une analyse dans le champ de recherche.
- 2 Sélectionnez **Next** (Suivant).
- 3 Confirmez les paramètres de l'analyse.
 - ▶ **Run Name** (Nom de l'analyse) : le nom de l'analyse tel qu'attribué dans BaseSpace.
 - ▶ **Library ID** (ID de librairie) : le nom des bibliothèques groupées tel qu'attribué dans BaseSpace.
 - ▶ **Recipe** (Formule) : le nom de la formule, **NextSeq High** ou **NextSeq Mid**, en fonction de la cartouche de réactifs utilisée pour l'analyse.
 - ▶ **Read Type** (Type de lecture) : lecture unique ou appariée.
 - ▶ **Read Length** (Longueur de la lecture) : le nombre de cycles par lecture.
 - ▶ **[Facultatif]** Primers personnalisés, le cas échéant.
- 4 **[Facultatif]** Sélectionnez le bouton **Edit** (Modifier) pour modifier les paramètres de l'analyse. Lorsque vous avez terminé, sélectionnez **Save** (Enregistrer).
 - ▶ **Run parameters** (Paramètres d'analyse) : modifier le nombre de lectures ou le nombre de cycles par lecture.
 - ▶ **Custom primers** (Primers personnalisés) : modifier les réglages des primers personnalisés. Pour plus de renseignements, consultez le *Guide des primers personnalisés NextSeq (document n° 15057456)*.

- ▶ **Purge consommables for this run** (Éliminer les consommables pour cette analyse) : modifier ce réglage pour que les consommables soient automatiquement éliminés après l'analyse en cours.

5 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Entrer les paramètres d'analyse (configuration autonome)

1 Saisissez un nom d'analyse de votre choix.

2 **[Facultatif]** Saisissez l'identifiant de librairie de votre choix.

3 Sélectionnez un type de lecture, soit **Single Read** (Lecture unique), soit **Paired End** (Lecture appariée).

4 Indiquez le nombre de cycles pour chaque lecture de l'analyse de séquençage.

- ▶ **Read 1** (Lecture 1) : saisissez une valeur dans la limite de 151 cycles.
- ▶ **Index 1** : saisissez le nombre de cycles nécessaire pour le primer d'index 1 (i7).
- ▶ **Index 2** : saisissez le nombre de cycles nécessaire pour le primer d'index 2 (i5).
- ▶ **Read 2** (Lecture 2) : saisissez une valeur dans la limite de 151 cycles. Cette valeur est généralement identique au nombre de cycles de la lecture 1.

Le logiciel de commande confirme vos saisies à l'aide des critères suivants :

- ▶ Le nombre total de cycles ne dépasse pas le nombre total de cycles permis.
- ▶ Les cycles de la lecture 1 sont supérieurs aux cinq cycles utilisés pour la génération du modèle.
- ▶ Les cycles de lecture d'index ne dépassent pas les cycles de lecture 1 et de lecture 2.

5 **[Facultatif]** Si vous utilisez des primers personnalisés, cochez la case correspondant aux primers utilisés. Pour plus de renseignements, consultez le *Guide des primers personnalisés NextSeq (document n° 15057456)*.

- ▶ **Read 1** (Lecture 1) : primer personnalisé pour la lecture 1.
- ▶ **Index 1** : primer personnalisé pour l'index 1.
- ▶ **Index 2** : primer personnalisé pour l'index 2.
- ▶ **Read 2** (Lecture 2) : primer personnalisé pour la lecture 2.

6 **[Facultatif]** Sélectionnez le bouton **Advanced Settings**  (Paramètres avancés) pour modifier les paramètres de l'analyse.

- ▶ Sélectionnez une formule dans la liste déroulante **Recipe** (Formule). Seules les formules compatibles sont répertoriées.
- ▶ **Output folder location** (Emplacement du dossier de sortie) : changer l'emplacement du dossier de sortie pour l'analyse en cours. Sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour atteindre un emplacement réseau.
- ▶ **Included file** (Fichier inclus) : sélectionner les fichiers à inclure dans le dossier de sortie, au cas où ils seraient requis pour une analyse plus poussée. Par exemple, les fichiers de manifeste et les listes d'échantillons.
- ▶ **Purge consommables for this run** (Éliminer les consommables pour cette analyse) : modifier ce réglage pour que les consommables soient automatiquement éliminés après l'analyse en cours.
- ▶ **Use run monitoring for this run** (Utiliser la surveillance de l'analyse pour cette analyse) : modifier les réglages pour utiliser la surveillance de l'analyse dans BaseSpace.

7 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Vérification avant analyse

Le logiciel effectue une vérification automatisée du système avant l'analyse. Pendant la vérification, les indicateurs suivants apparaissent à l'écran :

- ▶ **Crochet gris** : la vérification n'a pas encore été effectuée.
- ▶ **Icône de progression**  : la vérification est en cours.
- ▶ **Crochet vert** : la vérification a réussi.
- ▶ **Croix rouge** : la vérification a échoué. Pour tous les éléments qui n'ont pas réussi la vérification, une action est nécessaire avant que vous puissiez continuer. Consultez la section *Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques*, page 46.

Pour interrompre une vérification automatisée en cours, sélectionnez le bouton **Cancel** (Annuler).
 Pour redémarrer la vérification, sélectionnez le bouton **Retry** (Réessayer). La vérification reprend à la première vérification incomplète ou non conforme.

Pour afficher les résultats de chaque vérification d'une catégorie donnée, cliquez sur l'onglet Category (Catégorie).

Démarrer l'analyse

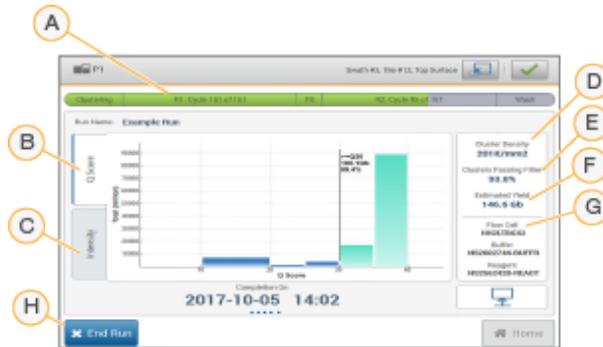
Une fois que la vérification automatique avant analyse est terminée, sélectionnez **Start** (Démarrer). L'analyse de séquençage commence.

Pour configurer le système afin de démarrer automatiquement l'analyse après une vérification réussie, consultez la section *Configurer les options de configuration de l'analyse*, page 13.

Surveiller la progression de l'analyse

- 1 Surveillez la progression de l'analyse, les intensités et les scores de qualité grâce à l'affichage des indicateurs sur l'écran.

Figure 19 Progression et indicateurs de l'analyse de séquençage



- A **Progression de l'analyse** : indique l'étape en cours et le nombre de cycles réalisés pour chaque lecture. La barre de progression n'est pas proportionnelle à la durée d'analyse de chaque étape. La date et l'heure estimées de la fin de l'analyse sont affichées dans le bas.
- B **Q-Score** : indique la répartition des scores de qualité (Q-scores). Consultez la section *Notation de la qualité*, page 61.
- C **Intensity** (Intensité) : indique la valeur des intensités d'amplifiats du 90^e percentile pour chaque plaque. Les couleurs du diagramme indiquent chaque base : le rouge représente A, le vert représente C, le bleu représente G et le noir représente T.
- D **Cluster Density (K/mm²)** (Densité des amplifiats [K/mm²]) : indique le nombre d'amplifiats détectés pour l'analyse.
- E **Clusters Passing Filter (%)** (Amplifiats passant le filtre [%]) : indique le pourcentage d'amplifiats franchissant le filtre. Consultez la section *Amplifiats passant le filtre*, page 60.

- F **Estimated Yield (Gb)** (Estimation de rendement [Gb]) : indique le nombre de bases prévues pour l'analyse.
- G **Lot Information** (Renseignements sur le lot) : affiche le numéro de lot des consommables de séquençage. Pour la Flow Cell, il affiche le numéro de série.
- H **End Run** (Arrêter l'analyse) : arrête l'analyse de séquençage en cours. Les consommables ne peuvent pas être réutilisés.



REMARQUE

Après avoir sélectionné Home (Accueil), il est impossible de revenir en arrière pour afficher les indicateurs de l'analyse. Toutefois, les indicateurs de l'analyse sont accessibles sur BaseSpace ou consultables depuis un ordinateur autonome à l'aide du visualiseur d'analyse de séquençage (SAV).

Cycles des indicateurs de l'analyse

Les indicateurs de l'analyse apparaissent à différents moments au cours de l'analyse.

- ▶ Aucun indicateur ne s'affiche au cours des étapes de génération d'amplifiats.
- ▶ Les cinq premiers cycles sont réservés à la génération du modèle.
- ▶ Les indicateurs de l'analyse apparaissent après le cycle 25, notamment la densité des amplifiats, les amplifiats passant le filtre (PF), le rendement et les scores de qualité.

Transfert des données

État	Nuage BaseSpace	BaseSpace Onsite	Instrument autonome
Connecté			
Connecté, transfert de données en cours			
Déconnecté			
Désactivé			

Selon la configuration d'analyse sélectionnée, une icône apparaît sur l'écran pendant l'analyse pour indiquer l'état du transfert des données.

Si le transfert de données est interrompu en cours d'analyse, les données sont stockées temporairement sur l'ordinateur de l'instrument. Une fois la connexion rétablie, le transfert de données reprend automatiquement. Si la connexion n'est pas rétablie avant la fin de l'analyse, supprimez manuellement les données de l'ordinateur de l'instrument avant le lancement d'une nouvelle analyse.

Service de copie de l'analyse

La suite logicielle du système NextSeq 550Dx comporte un service de copie d'analyse. RTA v2 demande au service de copier des fichiers situés à un emplacement source vers un emplacement de destination et le service traite les demandes de copie dans l'ordre d'arrivée. Si une exception survient, le fichier est remis en file d'attente de copie en fonction du nombre de fichiers présents dans la file d'attente.

Logiciel SAV (Visualiseur d'analyse de séquençage)

Le logiciel Sequencing Analysis Viewer affiche des indicateurs de séquençage générés au cours de l'analyse de séquençage. Les indicateurs s'affichent sous forme de diagrammes, de graphiques et de tableaux qui s'appuient sur des données générées par le logiciel RTA et écrits sur des fichiers InterOp. Les indicateurs sont mis à jour pendant la progression de l'analyse. Sélectionnez **Refresh** (Rafraîchir) à tout moment au cours de l'analyse pour afficher les indicateurs mis à jour. Pour plus de renseignements, consultez le *Guide de l'utilisateur du logiciel SAV (n° 15020619)*.

Le visualiseur d'analyse de séquençage fait partie des logiciels installés sur l'ordinateur de l'instrument. Vous pouvez aussi installer le Sequencing Analysis Viewer sur un autre ordinateur associé au même réseau que l'instrument pour surveiller les indicateurs d'analyse à distance.

Lavage automatique après analyse

Une fois l'analyse de séquençage terminée, le logiciel lance un lavage automatique après analyse à l'aide de la solution de lavage contenue dans la cartouche de tampon et de l'hypochlorite de sodium (NaOCl) contenu dans la cartouche de réactifs. Si l'option d'élimination des consommables de l'analyse est activée, ces derniers sont éliminés avant le lavage automatique après analyse.

Le lavage automatique après analyse dure 90 minutes environ. Une fois le lavage terminé, le bouton Home (Accueil) redevient actif. Les résultats du séquençage restent visibles à l'écran pendant le lavage.

Après le lavage

Après le lavage, laissez les dispositifs d'aspiration en position basse afin d'empêcher l'air d'entrer dans le système. Laissez les cartouches en place jusqu'à l'analyse suivante.

Chapitre 4 Balayage

Introduction	29
Flux de travail de balayage	30
Télécharger le dossier DMAP	30
Charger la puce BeadChip dans l'adaptateur	31
Configurer un balayage	32
Surveiller la progression du balayage	34

Introduction

Pour effectuer un balayage sur l'instrument NextSeq 550Dx, les composants d'analyse suivants sont nécessaires :

- ▶ Une puce BeadChip hybridée et marquée
- ▶ L'adaptateur de puce BeadChip réutilisable
- ▶ Des fichiers de carte de décodage (DMAP) correspondant à la puce BeadChip que vous utilisez
- ▶ Un fichier de manifeste correspondant au type de puce BeadChip que vous utilisez
- ▶ Un fichier de groupement correspondant au type de puce BeadChip que vous utilisez

Les fichiers de sortie sont générés lors du balayage puis mis en file d'attente pour un transfert vers le dossier de sortie spécifié.

Effectuez l'analyse à l'aide du logiciel BlueFuse Multi, qui nécessite que les données de balayage soient disponibles au format de fichier de typage génotypique (GTC). Par défaut, l'instrument NextSeq 550Dx génère des données normalisées et les définitions de génotype qui y sont associées dans un fichier au format GTC. Si vous le souhaitez, vous pouvez configurer l'instrument afin de générer des fichiers de données d'intensité (IDAT) supplémentaires. Pour plus de renseignements, consultez la section *Configuration des balayages de la puce BeadChip*, page 55.

Decode File Client

Le dossier DMAP contient des renseignements permettant d'identifier l'emplacement des billes sur la puce BeadChip et de quantifier le signal associé à chaque bille. Un dossier DMAP unique existe pour chaque code à barres de puce BeadChip.

L'utilitaire Decode File Client vous permet de télécharger des dossiers DMAP directement depuis les serveurs d'Illumina à l'aide d'un protocole HTTP standard.

Pour accéder à Decode File Client, consultez la [page d'aide Decode File Client](https://support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html) sur le site Web d'Illumina (support.illumina.com/array/array_software/decode_file_client/downloads.html). Installez le Decode File Client sur un ordinateur ayant accès à l'emplacement réseau du dossier DMAP.

Pour plus de renseignements, consultez la section *Télécharger le dossier DMAP*, page 30.

Fichiers de manifeste et fichiers de groupement

Pour chaque puce BeadChip, le logiciel requiert un accès à un fichier de manifeste et à un fichier de groupement. Chaque fichier de manifeste et de groupement est unique au type de puce BeadChip. Vérifiez que vous utilisez les fichiers de groupement dont le nom de fichier contient NS550. Ces fichiers sont compatibles avec le système NextSeq 550Dx.

- ▶ **Fichier de manifeste** : les fichiers de manifeste décrivent le SNP ou le contenu de la sonde sur une puce BeadChip. Les fichiers de manifeste utilisent le format de fichier *.bpm.

- ▶ **Fichiers de groupement** : les fichiers de groupement décrivent les positions des amplifiats pour la puce à ADN de génotypage d'Illumina et sont utilisés lors de l'analyse de données pour effectuer le typage génotypique. Les fichiers de groupement utilisent le format de fichier *.egt.

L'emplacement des fichiers est défini dans l'écran BeadChip Scan Configuration (Configuration des balayages de la puce BeadChip). Depuis l'écran d'accueil NCS, sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument), **System Configuration** (Configuration du système), puis **BeadChip Scan Configuration** (Configuration des balayages de la puce BeadChip).

Lorsque l'instrument NextSeq 550Dx est installé, le représentant d'Illumina télécharge ces fichiers et indique le chemin dans le logiciel de commande. Il n'est pas nécessaire de modifier ces fichiers, sauf en cas de perte ou de disponibilité d'une mise à jour. Pour obtenir plus de renseignements, consultez [Remplacer les fichiers de manifeste et les fichiers de groupement, page 52](#).

Flux de travail de balayage

DMAP

Téléchargez les renseignements DMAP et enregistrez-les dans l'emplacement spécifié de dossier DMAP.



Chargez la puce BeadChip dans l'adaptateur de puce BeadChip.



Chargez l'adaptateur de puce BeadChip dans l'instrument.



Indiquez les paramètres de balayage : emplacement du dossier DMAP et emplacement de sortie.



Examinez les résultats de la vérification automatique. Sélectionnez **Start** (Démarrer).



Surveillez le balayage à partir de l'interface du logiciel de commande.

Télécharger le dossier DMAP

Le dossier DMAP est accessible à l'aide du Decode File Client par compte ou puce BeadChip (affichage par défaut).

Accéder au dossier DMAP par compte

- 1 Depuis l'onglet principal du Decode File Client, sélectionnez une option de téléchargement :
 - ▶ AutoPilot (Pilote automatique)
 - ▶ All BeadChips not yet downloaded (Toutes les puces BeadChip non encore téléchargées)
 - ▶ All BeadChips (Toutes les puces BeadChip)
 - ▶ BeadChips by Purchase Order (Puces BeadChip par bon de commande)

- ▶ BeadChips by barcode (Puces BeadChip par code à barres)
- 2 Saisissez les renseignements requis.
 - 3 Localisez le dossier DMAP que vous souhaitez télécharger.
 - 4 Vérifiez que vous disposez d'assez d'espace libre dans l'emplacement de téléchargement.
 - 5 Lancez le téléchargement. Consultez l'état du téléchargement sur l'onglet Download Status and Log (État et journal de téléchargement).
 - 6 Enregistrez le dossier DMAP vers l'emplacement du dossier DMAP spécifié.

Accéder au dossier DMAP par puce BeadChip

- 1 Identifiez les puces BeadChip à l'aide de deux des options suivantes :
 - ▶ BeadChip barcode (Code à barres de la puce BeadChip)
 - ▶ BeadChips box ID (Identifiant de boîte de la puce BeadChip)
 - ▶ Purchase order number (Numéro de bon de commande - vente)
 - ▶ Sales order number (Numéro de bon de commande - achat)
- 2 Localisez le dossier DMAP que vous souhaitez télécharger.
- 3 Vérifiez que vous disposez d'assez d'espace libre dans l'emplacement de téléchargement.
- 4 Lancez le téléchargement. Consultez l'état du téléchargement sur l'onglet Download Status and Log (État et journal de téléchargement).
- 5 Enregistrez le dossier DMAP vers l'emplacement du dossier DMAP spécifié.

Charger la puce BeadChip dans l'adaptateur

- 1 Appuyez sur la pince de maintien de l'adaptateur. La pince s'incline légèrement vers l'arrière et s'ouvre.
- 2 En tenant la puce BeadChip par les bords, positionnez-la avec le code à barres près de la pince de maintien et placez-la dans l'étagère encastrée de l'adaptateur.

Figure 20 Chargez la puce BeadChip dans l'adaptateur



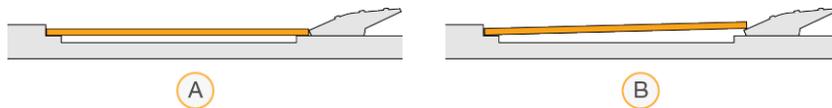
- 3 En utilisant l'une des ouvertures présentes sur les côtés de la puce BeadChip, assurez-vous que celle-ci est fixée dans l'étagère encastrée de l'adaptateur.

Figure 21 Positionnez et fixez la puce BeadChip



- 4 Relâchez doucement la pince de maintien pour fixer la puce BeadChip.
- 5 Inspectez la puce BeadChip en l'observant de côté pour vous assurer qu'elle est à plat sur l'adaptateur. Repositionnez la puce BeadChip si nécessaire.

Figure 22 Inspectez la position de la puce BeadChip



- A Bon positionnement : la puce BeadChip est à plat sur l'adaptateur lorsque vous relâchez la pince.
B Mauvais positionnement : la puce BeadChip n'est pas à plat lorsque vous relâchez la pince.

Configurer un balayage

- 1 Sur l'écran d'accueil, cliquez sur **Experiment** (Expérience), puis sélectionnez **Scan** (Balayage). La commande Scan (Balayage) ouvre la porte du compartiment d'imagerie, libère les consommables utilisés lors d'une analyse précédente s'ils sont présents, et ouvre une série d'écrans de configuration du balayage. Un court délai est normal.

Décharger les consommables de séquençage

Si des consommables de séquençage usagés sont présents lorsque vous configurez un balayage, le logiciel vous invite à décharger la cartouche de réactifs et la cartouche de tampon avant de passer à l'étape suivante.

- 1 Si vous y êtes invité, retirez les consommables de séquençage usagés provenant d'une analyse de séquençage précédente.
 - a Retirez la cartouche de réactifs du compartiment de réactifs. Mettez des contenus inutilisés au rebut conformément aux normes en vigueur.
 - b Retirez la cartouche de tampon usagée du compartiment de tampon.



AVERTISSEMENT

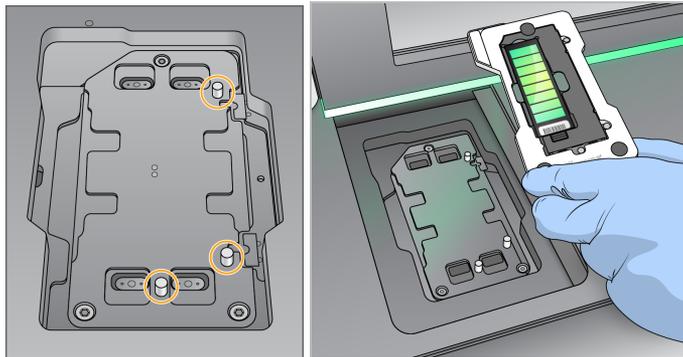
Ce groupe de réactifs contient des produits chimiques potentiellement dangereux. Des risques de lésions corporelles peuvent survenir par inhalation, ingestion, contact avec la peau et contact avec les yeux. Portez un équipement de protection, y compris des lunettes, des gants et une blouse de laboratoire adaptée 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.

- 2 Sortez la Flow Cell du compartiment d'imagerie.
- 3 Fermez les portes du compartiment de réactifs et du compartiment de tampon.

Charger l'adaptateur de puce BeadChip

- 1 Positionnez l'adaptateur de puce BeadChip sur la platine à l'aide des broches d'alignement.

Figure 23 Charger l'adaptateur de puce BeadChip



- 2 Sélectionnez **Load** (Charger).
La porte se ferme automatiquement, l'identifiant de la puce BeadChip s'affiche à l'écran et les capteurs sont activés. Un court délai est normal. Si le code à barres de la puce BeadChip ne peut pas être lu, une boîte de dialogue s'affiche. Elle vous permet d'entrer manuellement le code à barres. Consultez la section *Le logiciel ne peut pas lire le code à barres de la puce BeadChip*, page 51.
- 3 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Configuration du balayage

- 1 Sur l'écran Scan Setup (Configuration du balayage), confirmez les informations suivantes :
 - ▶ **Barcode** (Code à barres) : le logiciel lit le code à barres de la puce BeadChip lorsque celle-ci est chargée. Si le code à barres est saisi manuellement, le bouton Edit (Modifier) apparaît afin de permettre des modifications.
 - ▶ **Type** : le champ du type de puce BeadChip est généré automatiquement en fonction du code à barres de la puce BeadChip.
 - ▶ **DMAP Location** (Emplacement DMAP) : l'emplacement du dossier DMAP est défini à l'écran BeadChip Scan Configuration (Configuration des balayages de la puce BeadChip). Pour changer l'emplacement du balayage actuel uniquement, sélectionnez **Browse** (Parcourir), puis rendez-vous à l'emplacement correct.
 - ▶ **Output Location** (Emplacement de sortie) : l'emplacement de sortie est défini à l'écran BeadChip Scan Configuration (Configuration des balayages de la puce BeadChip). Pour changer l'emplacement du balayage actuel uniquement, sélectionnez **Browse** (Parcourir), puis rendez-vous à l'emplacement souhaité.
- 2 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Vérification avant analyse

Le logiciel effectue une vérification automatisée du système avant l'analyse. Pendant la vérification, les indicateurs suivants apparaissent à l'écran :

- ▶ **Crochet gris** : la vérification n'a pas encore été effectuée.

- ▶ **Icône de progression**  : la vérification est en cours.
- ▶ **Crochet vert** : la vérification a réussi.
- ▶ **Croix rouge** : la vérification a échoué. Pour tous les éléments qui n'ont pas réussi la vérification, une action est nécessaire avant que vous puissiez continuer. Consultez la section *Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques*, page 46.

Pour interrompre une vérification automatisée en cours, sélectionnez le bouton **Cancel** (Annuler).

Pour redémarrer la vérification, sélectionnez le bouton **Retry** (Réessayer). La vérification reprend à la première vérification incomplète ou non conforme.

Pour afficher les résultats de chaque vérification d'une catégorie donnée, cliquez sur l'onglet Category (Catégorie).

Démarrer le balayage

Une fois la vérification automatique terminée, sélectionnez **Start** (Démarrer). Le balayage commence.

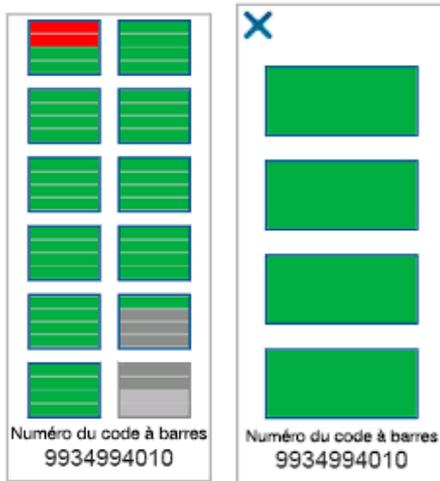
Pour configurer le système afin de démarrer automatiquement le balayage après une vérification réussie, consultez la section *Configurer les options de configuration de l'analyse*, page 13.

Surveiller la progression du balayage

- 1 Surveillez la progression du balayage grâce à l'image générée par la puce BeadChip. Chaque couleur qui se trouve sur l'image indique l'état du balayage.
 - ▶ **Gris clair** : balayage non effectué.
 - ▶ **Gris foncé** : balayage effectué, mais non enregistré.
 - ▶ **Vert** : balayage effectué et enregistré avec succès.
 - ▶ **Rouge** : échec du balayage et de l'enregistrement.

En cas d'échec de l'enregistrement, vous pouvez balayer à nouveau les échantillons comprenant des sections dont le balayage a échoué. Consultez la section *Échec du balayage de la puce BeadChip*, page 51.
- 2 Sélectionnez l'image de la puce BeadChip pour basculer entre la vue complète et la vue détaillée d'un échantillon sélectionné.
 - ▶ La vue complète affiche les échantillons sur la puce BeadChip et les sections au sein de chaque échantillon.
 - ▶ La vue détaillée affiche chaque section au sein de l'échantillon sélectionné.

Figure 24 Image de la puce BeadChip : vue complète et vue détaillée



REMARQUE

L'arrêt d'un balayage est définitif. Si vous mettez fin au balayage avant qu'il ne soit terminé, les données de balayage ne sont *pas* enregistrées.

Transfert de données

Les données sont mises en file d'attente pour un transfert vers le dossier de sortie de balayage une fois le balayage terminé. Les données sont temporairement écrites vers l'ordinateur de l'instrument. Le dossier temporaire est automatiquement supprimé de l'ordinateur de l'instrument lorsqu'un balayage ultérieur est lancé.

La durée nécessaire au transfert des données dépend de votre connexion réseau. Avant de lancer un balayage ultérieur, vérifiez que les données ont été écrites vers le dossier de sortie. Pour ce faire, vérifiez que des fichiers GTC sont présents dans le dossier du code à barres. Pour plus de renseignements, consultez la section *Structure du dossier de sortie de balayage*, page 67.

Si la connexion est interrompue, le transfert de données reprend automatiquement lorsqu'elle reprend. Chaque fichier dispose d'un minuteur d'une heure après sa mise en file d'attente pour un transfert vers le dossier de sortie. Si le minuteur expire ou si l'instrument est redémarré avant la fin du transfert, les données ne sont pas écrites dans le dossier de sortie.

Chapitre 5 Maintenance

Introduction	37
Effectuer un lavage manuel	37
Remplacer le filtre à air	40
Mises à jour logicielles	41
Options de redémarrage et d'arrêt	43

Introduction

Les procédures d'entretien comprennent des lavages manuels de l'instrument ainsi que les éventuelles mises à jour des logiciels du système.

- ▶ **Lavages de l'instrument** : un lavage automatique après chaque analyse de séquençage permet d'optimiser les performances de l'instrument. Toutefois, il est nécessaire d'effectuer régulièrement un lavage manuel dans certaines conditions. Consultez la section *Effectuer un lavage manuel*, page 37.
- ▶ **Mises à jour logicielles** : quand une version mise à jour du logiciel du système est disponible, vous pouvez l'installer automatiquement en vous connectant à BaseSpace ou manuellement en téléchargeant le programme d'installation sur le site Web d'Illumina. Consultez la section *Mises à jour logicielles*, page 41.
- ▶ **Remplacement du filtre à air** : Le remplacement régulier du filtre à air assure une bonne circulation de l'air dans l'instrument.

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.

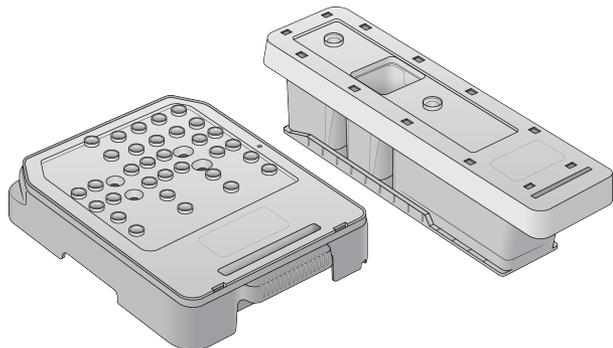
Effectuer un lavage manuel

Les lavages manuels sont initiés depuis l'écran d'accueil. Les options de lavage comprennent Quick Wash (Lavage rapide) et Manual Post-Run Wash (Lavage manuel après analyse).

Types de lavage	Description
Quick Wash (Lavage rapide) Durée : 20 minutes	Rince le système avec une solution de lavage fournie par l'utilisateur composée d'eau de laboratoire et de Tween 20 (cartouche de lavage du tampon). <ul style="list-style-type: none">• Nécessaire pour chaque période de 14 jours d'inactivité de l'instrument avec une cartouche de réactifs et une cartouche de tampon en place.• Doit être effectué tous les sept jours lorsque l'instrument est sec (cartouche de réactifs et cartouche de tampon retirées).• Nécessaire après un arrêt.
Manual Post-Run Wash (Lavage manuel après analyse) Durée : 90 minutes	Rince le système avec une solution de lavage fournie par l'utilisateur composée d'eau de laboratoire, de Tween 20 (cartouche de lavage du tampon) et d'hypochlorite de sodium à 0,12 % (cartouche de lavage des réactifs). Nécessaire lorsque le lavage automatique après analyse n'a pas été effectué.

Un lavage manuel nécessite l'utilisation de la cartouche de lavage des réactifs et de la cartouche de lavage du tampon qui sont fournies avec l'instrument, ainsi que d'une Flow Cell usagée. Une Flow Cell usagée peut être utilisée jusqu'à 20 fois pour des lavages de l'instrument.

Figure 25 Cartouche de lavage des réactifs et cartouche de lavage du tampon



Préparer un lavage manuel après analyse

Vous devez choisir entre la préparation d'un lavage manuel après analyse, comme il est décrit ci-dessous, ou la préparation d'un lavage rapide (section suivante). Si vous prévoyez faire un lavage manuel après analyse, passez la section sur le lavage rapide et allez à la section *Charger une Flow Cell usagée et les cartouches de lavage*, page 39.

Consommables fournis par l'utilisateur	Volume et description
NaOCl	1 ml, dilution à 0,12 % Chargé dans la cartouche de lavage de réactifs (position n° 28)
Tween 20 à 100 % Eau de qualité laboratoire	Utilisée pour préparer une solution de lavage Tween 20 à 0,05 % de 125 ml Chargée dans la cartouche de lavage du tampon (réservoir central)

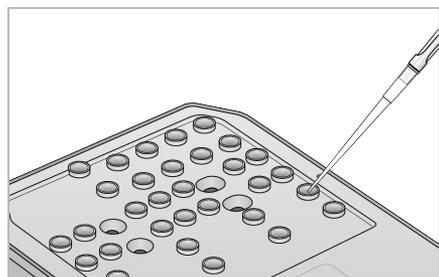


REMARQUE

Utilisez toujours une nouvelle dilution de NaOCl préparée au cours des **24 dernières heures**. Si vous préparez un volume supérieur à 1 ml, stockez la dilution restante entre 2 et 8 °C pour une utilisation dans les 24 heures suivantes. Sinon, jetez la dilution de NaOCl restante.

- Mélangez les volumes suivants dans un microtube à centrifuger pour obtenir une solution de 1 ml de NaOCl à 0,12 % :
 - ▶ NaOCl à 5 % (24 µl)
 - ▶ Eau de laboratoire (976 µl)
- Retournez le tube pour mélanger.
- Ajoutez 1 ml de NaOCl à 0,12 % à la cartouche de lavage des réactifs. Le réservoir approprié est équivalent à la position n° 28 de la cartouche préremplie.

Figure 26 Charger le NaOCl



- 4 Combinez les volumes suivants afin d'obtenir une solution de lavage de Tween 20 à 0,05 % :
 - ▶ Tween 20 à 100 % (62 µl)
 - ▶ Eau de laboratoire (125 ml)
- 5 Ajoutez 125 ml de solution de lavage dans le réservoir central de la cartouche de lavage du tampon.
- 6 Sélectionnez **Perform Wash** (Procéder au lavage), puis sélectionnez **Manual Post-Run Wash** (Lavage manuel après analyse).

Préparer un lavage rapide

Vous pouvez préparer un lavage rapide, comme il est décrit ci-dessous, comme une option de rechange à la [Préparer un lavage manuel après analyse, page 38](#).

Consommables fournis par l'utilisateur	Volume et description
Tween 20 à 100 %	Utilisée pour préparer une solution de lavage Tween 20 à 0,05 % de 40 ml
Eau de qualité laboratoire	Chargée dans la cartouche de lavage du tampon (réservoir central)

- 1 Combinez les volumes suivants afin d'obtenir une solution de lavage de Tween 20 à 0,05 % :
 - ▶ Tween 20 à 100 % (20 µl)
 - ▶ Eau de laboratoire (40 ml)
- 2 Ajoutez 40 ml de solution de lavage dans le réservoir central de la cartouche de lavage du tampon.
- 3 Sélectionnez **Perform Wash** (Procéder au lavage), puis sélectionnez **Quick Wash** (Lavage rapide).

Charger une Flow Cell usagée et les cartouches de lavage

- 1 En l'absence de Flow Cell usagée, chargez une Flow Cell usagée. Sélectionnez **Load** (Charger), puis **Next** (Suivant).
- 2 Retirez le réservoir à réactifs usagés et jetez son contenu conformément aux normes en vigueur.



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.

- 3 Faites glisser le réservoir à réactifs usagés vide dans le compartiment de tampon jusqu'à la butée.
- 4 Retirez la cartouche de tampon usagée de la précédente analyse, le cas échéant.
- 5 Chargez la cartouche de lavage du tampon contenant la solution de lavage.
- 6 Retirez la cartouche de réactifs usagée de la précédente analyse, le cas échéant.
- 7 Chargez la cartouche de lavage des réactifs.
- 8 Sélectionnez **Next** (Suivant). La vérification avant lavage démarre automatiquement.

Démarrer le lavage

- 1 Sélectionnez **Start** (Démarrer).
- 2 Une fois le lavage terminé, sélectionnez **Home** (Accueil).

Après le lavage

Après le lavage, laissez les dispositifs d'aspiration en position basse afin d'empêcher l'air d'entrer dans le système. Laissez les cartouches en place jusqu'à l'analyse suivante.

Remplacer le filtre à air

Le filtre à air assure la circulation de l'air dans l'instrument. En mode diagnostic, le logiciel de commande de l'instrument NextSeq 550Dx affiche un message demandant de changer le filtre à air tous les 90 jours. Lorsqu'on vous le demande, sélectionnez **Remind in 1 day** (Rappeler dans 1 jour) ou suivez la procédure suivante et sélectionnez **Filter Changed** (Filtre changé). Le compte à rebours de 90 jours recommence après la sélection de l'option **Filter Changed** (Filtre changé).

- 1 Retirez le nouveau filtre à air de l'emballage et inscrivez la date de son installation sur le cadre du filtre.
- 2 À l'arrière de l'instrument, appuyez sur le dessus du plateau du filtre pour libérer le plateau.
- 3 Saisissez le haut du plateau du filtre et tirez vers le haut pour soulever complètement le plateau hors de l'instrument.
- 4 Retirez l'ancien filtre à air et mettez-le au rebut.
- 5 Insérez le nouveau filtre à air dans le plateau.

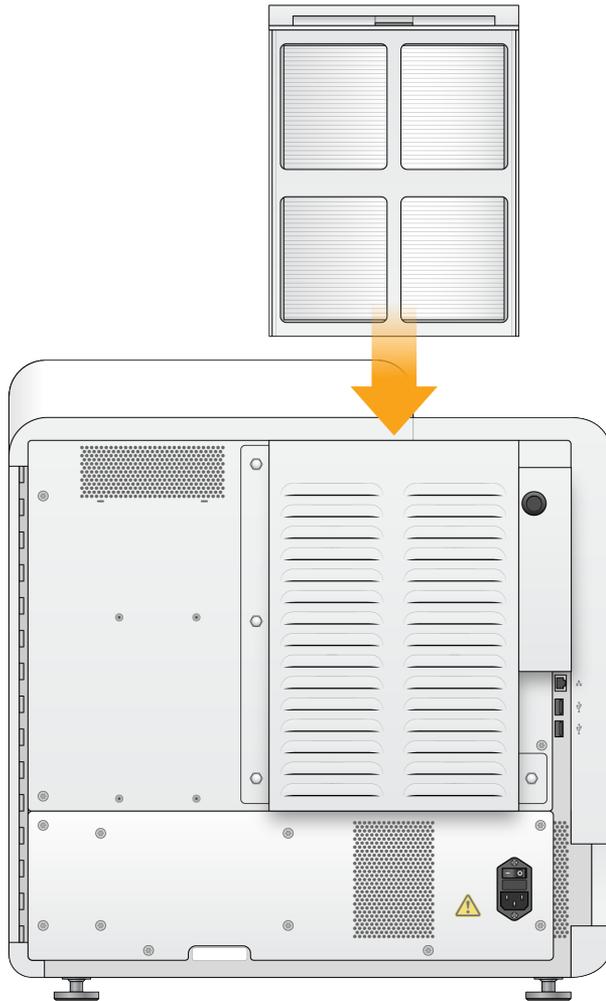


REMARQUE

Le filtre à air ne fonctionnera pas correctement s'il est à l'envers. Assurez-vous d'insérer le filtre à air dans le plateau de façon à voir la flèche verte indiquant « Up » (Haut) et à ne plus voir l'étiquette de mise en garde. La flèche doit pointer vers la poignée du plateau du filtre.

- 6 Glissez le plateau du filtre à air dans l'instrument. Appuyez sur le dessus du filtre jusqu'à ce qu'il s'enclenche dans la bonne position.

Figure 27 Insertion du filtre à air



Mises à jour logicielles

Les mises à jour logicielles font partie d'une suite logicielle appelée System Suite, qui comprend les logiciels suivants :

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

Vous pouvez installer des mises à jour logicielles automatiquement si vous disposez d'une connexion Internet ou manuellement à partir d'un emplacement réseau ou USB.

- ▶ **Mises à jour automatiques** : si l'instrument est connecté à un réseau doté d'un accès à Internet, une icône d'alerte  s'affiche sur le bouton Manage Instrument (Gérer l'instrument) situé à l'écran d'accueil lorsqu'une mise à jour est disponible.
- ▶ **Mises à jour manuelles** : téléchargez le programme d'installation System Suite à la [page d'assistance de l'instrument NextSeq 550Dx](#), sur le site Web d'Illumina.

Mise à jour automatique des logiciels

- 1 Sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **Software Update** (Mise à jour du logiciel).
- 3 Sélectionnez **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Installer la mise à jour déjà téléchargée à partir de BaseSpace).
- 4 Sélectionnez **Update** (Mise à jour) pour commencer la mise à jour. Une boîte de dialogue apparaît pour la confirmation de la commande.
- 5 Suivez les invites de l'assistant d'installation :
 - a Acceptez l'accord de licence.
 - b Lisez les notes de mise à jour.
 - c Consultez la liste des logiciels inclus dans la mise à jour.

Le logiciel de commande redémarre automatiquement une fois la mise à jour logicielle effectuée.



REMARQUE

Un redémarrage automatique du système est nécessaire après toute mise à jour du micrologiciel.

Mise à jour manuelle des logiciels

- 1 Téléchargez le programme d'installation System Suite sur le site Web d'Illumina et enregistrez-le dans un emplacement réseau. Vous pouvez également copier le fichier d'installation des logiciels sur une clé USB.
- 2 Sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 3 Sélectionnez **Software Update** (Mise à jour du logiciel).
- 4 Sélectionnez **Manually install the update from the following location** (Installer manuellement la mise à jour à partir de l'emplacement suivant).
- 5 Sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour accéder à l'emplacement du fichier d'installation du logiciel, puis sélectionnez **Update** (Mettre à jour).
- 6 Suivez les invites de l'assistant d'installation :
 - a Acceptez l'accord de licence.
 - b Lisez les notes de mise à jour.
 - c Consultez la liste des logiciels inclus dans la mise à jour.

Le logiciel de commande redémarre automatiquement une fois la mise à jour logicielle effectuée.



REMARQUE

Un redémarrage automatique du système est nécessaire après toute mise à jour du micrologiciel.

Options de redémarrage et d'arrêt

Accédez aux fonctions suivantes en cliquant sur le bouton Shut Down Options (Options d'arrêt) :

- ▶ Restart (Redémarrer) : l'instrument s'ouvre en mode diagnostic (Dx).
- ▶ Shutdown (Arrêt) : l'instrument s'ouvre en mode diagnostic (Dx).
- ▶ Exit to Windows (Quitter et retourner vers Windows) : selon les autorisations, vous pouvez fermer NCS et voir Windows.

Redémarrer en mode diagnostic

Utilisez la commande Restart (Redémarrer) pour arrêter l'instrument et le redémarrer en mode diagnostic. Le mode diagnostic est le mode de redémarrage par défaut.

- 1 Sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **Shutdown Options** (Options d'arrêt).
- 3 Sélectionnez **Restart** (Redémarrer).

Arrêter l'instrument

- 1 Sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **Shutdown Options** (Options d'arrêt).
- 3 Sélectionnez **Shut Down** (Arrêter).

La commande d'arrêt ferme le logiciel de manière sûre et coupe l'alimentation de l'instrument. Attendez au moins 60 secondes avant de mettre à nouveau en marche l'instrument.



REMARQUE

Par défaut, l'instrument démarre en mode diagnostic lors de sa mise sous tension.



ATTENTION

Ne déplacez pas l'instrument. Un déplacement inapproprié de l'instrument peut avoir un impact sur l'alignement optique et compromettre l'intégrité des données. Si vous devez déplacer l'instrument, communiquez avec votre représentant Illumina.

Quitter et retourner vers Windows

La commande Exit to Windows (Quitter et retourner vers Windows) donne accès au système d'exploitation de l'instrument et à tout dossier de l'ordinateur de l'instrument. La commande ferme le logiciel de manière sécuritaire et retourne à Windows.

- 1 Sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
- 2 Sélectionnez **Shutdown Options** (Options d'arrêt).
- 3 Sélectionnez **Exit to Windows** (Quitter et retourner vers Windows).

Annexe A Dépannage

Introduction	45
Fichiers de dépannage	45
Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques	46
Réservoir à réactifs usagés plein	48
Flux de travail de réhybridation	49
Erreurs de puce BeadChip et de balayage	51
Formules personnalisées et dossiers de formules	52
Message d'erreur RAID	53
Configurer les paramètres du système	53

Introduction

En cas de questions techniques, consultez les pages d'assistance de l'instrument NextSeq 550Dx sur le site Web d'Illumina. Les pages d'assistance fournissent un accès à la documentation, aux téléchargements et aux foires aux questions.

Connectez-vous à votre compte MyIllumina pour accéder aux bulletins d'assistance.

En cas de problème de qualité d'analyse ou de performances, communiquez avec l'assistance technique d'Illumina. Consultez la section *Assistance technique*, page 73.

Il est possible de partager un lien vers le résumé d'analyse dans BaseSpace avec l'assistance technique d'Illumina pour faciliter le dépannage.

Fichiers de dépannage

Un représentant de l'assistance technique d'Illumina peut vous demander de fournir des copies des fichiers propres à une analyse ou à un balayage en particulier afin de résoudre les problèmes. Les fichiers suivants sont généralement utilisés pour le dépannage.

Fichiers de dépannage pour les analyses de séquençage

Fichier clé	Dossier	Description
Fichier de renseignements sur l'analyse (RunInfo.xml)	Dossier racine	Comprend les renseignements suivants : <ul style="list-style-type: none">• Nom de l'analyse• Nombre de cycles de l'analyse• Nombre de cycles dans chaque lecture• Lecture indexée ou non• Nombre de témoins et de plaques sur la Flow Cell
Fichier des paramètres de l'analyse (RunParameters.xml)	Dossier racine	Contient des renseignements concernant les paramètres et les composants des analyses. Parmi les renseignements figurent le RFID, le numéro de série, la référence et la date de péremption.
Fichiers de configuration RTA (RTAConfiguration.xml)	Dossier racine	Comprend les paramètres de configuration RTA pour l'analyse. Le fichier RTAConfiguration.xml est créé au début de l'analyse.
Fichiers InterOp (*.bin)	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.
Fichiers journaux	Logs	Les fichiers journaux décrivent chaque étape effectuée par l'instrument au cours de chaque cycle et répertorient les versions de logiciels et de progiciels utilisées lors de l'analyse. Le fichier nommé [NomInstrument]_CurrentHardware.csv répertorie les numéros de série des composants de l'instrument.

Fichier clé	Dossier	Description
Fichiers journaux des erreurs (*ErrorLog*.txt)	RTA Logs	Journal des erreurs RTA. Les fichiers journaux des erreurs sont mis à jour à chaque fois qu'une erreur se produit.
Fichiers journaux globaux (*GlobalLog*.tsv)	RTA Logs	Journal de tous les événements RTA. Les fichiers journaux globaux sont mis à jour tout au long de l'analyse.

Erreurs RTA

Pour résoudre les problèmes RTA, vérifiez d'abord le journal des erreurs RTA stocké dans le dossier RTALogs. Ce fichier n'est pas présent pour les analyses réussies. Joignez le journal des erreurs lors du signalement des problèmes à l'assistance technique d'Illumina.

Fichiers de dépannage pour les balayages des puces à ADN

Fichier clé	Dossier	Description
Fichier des paramètres du balayage (ScanParameters.xml)	Dossier racine	Contient des renseignements sur les paramètres du balayage. Parmi ces renseignements figurent la date du balayage, le code à barres de la puce BeadChip, l'emplacement du fichier de groupement et l'emplacement du fichier de manifeste.
Fichiers journaux	Logs	Les fichiers journaux décrivent chaque étape effectuée sur l'instrument lors du balayage.
Fichiers d'indicateurs	[Code à barres]	Les indicateurs sont fournis sous forme d'indicateurs d'échantillon et d'indicateurs de section. [code à barres]_sample_metrics.csv : pour chaque échantillon et chaque canal (rouge et vert), répertorie les paramètres Percent Off Image (Pourcentage hors image), Percent Outliers (Pourcentage de points aberrants), P05, P50, P95, Avg FWHM Avg (Moyenne de FWHM), FWHM Stddev (Écart-type de FWHM) et Min Registration Score (Score minimal d'enregistrement). [code à barres]_section_metrics.csv : pour chaque section et plaque, répertorie les paramètres Laser Z-position (Position Z du laser), Through Focus Z-position (Position Z de la mise au point), Red FWHM (FWHM, rouge), Green FWHM (FWHM, vert), Red Avg Pixel Intensity (Intensité moyenne des pixels, rouge), Green Avg Pixel Intensity (Intensité moyenne des pixels, vert), Red Registration Score (Score d'enregistrement, rouge), et Green Registration Score (Score d'enregistrement, vert).
Fichier de nouveau balayage	[Code à barres]	[code à barres]_rescan.flowcell : répertorie les emplacements des plaques ajustés pour un nouveau balayage, qui comprennent un chevauchement plus élevé entre les plaques.

Résoudre les erreurs relevées par les vérifications automatiques

Si les vérifications automatiques relèvent une erreur, utilisez les recommandations d'action suivantes pour résoudre l'erreur. Les vérifications automatiques du séquençage et celles des balayages de puce à ADN ne sont pas les mêmes.

Vérifications des analyses de séquençage

Si une vérification avant analyse échoue, la RFID de la cartouche de réactifs n'est pas verrouillée et peut être utilisée pour une nouvelle analyse. Cependant, la RFID est verrouillée une fois que les opercules en aluminium sont percés.

Vérifications du système	Action recommandée
Doors Closed (Portes fermées)	Assurez-vous que les portes des compartiments sont fermées.
Consumables Loaded (Consommables chargés)	Les capteurs des consommables n'enregistrent rien. Assurez-vous que chaque consommable est correctement chargé. Sur les écrans de configuration de l'analyse, sélectionnez Back (Retour) pour retourner à l'étape de chargement, puis recommencez la configuration de l'analyse.
Required Software (Logiciel requis)	Des composants critiques du logiciel sont manquants. Effectuez une mise à jour manuelle pour restaurer tous les composants du logiciel.
Instrument Disk Space (Espace disque de l'instrument)	Le disque dur de l'instrument n'a pas assez d'espace disponible pour réaliser l'analyse. Il est possible que les données provenant d'une analyse précédente n'aient pas été transférées. Effacez les données de l'analyse du disque dur de l'instrument.
Network Connection (Connexion réseau)	La connexion réseau a été interrompue. Vérifiez l'état du réseau et la connexion au réseau physique.
Network Disk Space (Espace disque réseau)	Soit le compte BaseSpace est plein, soit le serveur réseau est plein.
Température	Action recommandée
Temperature (Température)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Temperature Sensors (Capteurs de température)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Fans (Ventilateurs)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Système d'imagerie	Action recommandée
Imaging Limits (Limites de l'imagerie)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Z Steps-and-Settle (Étapes et installation Z)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Bit Error Rate (Taux d'erreur binaire)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Flow Cell Registration (Enregistrement de la Flow Cell)	Il est possible que la Flow Cell ne soit pas correctement positionnée. <ul style="list-style-type: none"> Sur l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse), sélectionnez Back (Retour) pour retourner à l'étape de la Flow Cell. La porte du compartiment d'imagerie s'ouvre. Déchargez et rechargez la Flow Cell pour vous assurer qu'elle est correctement positionnée.
Distribution des réactifs	Action recommandée
Valve Response (Réponse de la vanne)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Pump (Pompe)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.

Distribution des réactifs	Action recommandée
Buffer Mechanism (Mécanisme du tampon)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Spent Reagents Empty (Réactifs usagés vides)	Videz le réservoir à réactifs usagés et rechargez le réservoir vide.

Vérifications des balayages de puce à ADN

Vérifications du système	Action recommandée
Doors Closed (Portes fermées)	Assurez-vous que les portes des compartiments sont fermées.
Consumables Loaded (Consommables chargés)	Les capteurs des consommables n'enregistrent rien. Assurez-vous que chaque consommable est correctement chargé. Sur les écrans de configuration de l'analyse, sélectionnez Back (Retour) pour retourner à l'étape de chargement, puis recommencez la configuration de l'analyse.
Required Software (Logiciel requis)	Des composants critiques du logiciel sont manquants. Effectuez une mise à jour manuelle pour restaurer tous les composants du logiciel.
Verify Input Files (Vérifier les fichiers d'entrée)	Vérifiez que le chemin du fichier de groupement et du fichier de manifeste est correct et que les fichiers sont présents.
Instrument Disk Space (Espace disque de l'instrument)	Le disque dur de l'instrument n'a pas assez d'espace disponible pour réaliser l'analyse. Il est possible que les données provenant d'une analyse précédente n'aient pas été transférées. Effacez les données de l'analyse du disque dur de l'instrument.
Network Connection (Connexion réseau)	La connexion réseau a été interrompue. Vérifiez l'état du réseau et la connexion au réseau physique.
Network Disk Space (Espace disque réseau)	Soit le compte BaseSpace est plein, soit le serveur réseau est plein.

Système d'imagerie	Action recommandée
Imaging Limits (Limites de l'imagerie)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Z Steps-and-Settle (Étapes et installation Z)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Bit Error Rate (Taux d'erreur binaire)	Communiquez avec l'assistance technique d'Illumina.
Auto-Center (Centrage automatique)	Déchargez l'adaptateur de puce BeadChip. Vérifiez que la puce BeadChip est fixée dans l'adaptateur, puis rechargez l'adaptateur.

Réservoir à réactifs usagés plein

Commencez toujours une analyse avec un réservoir à réactifs usagés vide.

Si vous commencez une analyse sans avoir vidé le réservoir des réactifs usagés, les capteurs du système poussent le logiciel à interrompre l'analyse lorsque le réservoir est plein. Les capteurs du système ne peuvent pas interrompre une analyse durant la génération d'amplifiats, la resynthèse des paires de bases ou le lavage automatique après analyse.

Lorsque l'analyse s'interrompt, une boîte de dialogue s'ouvre et propose à l'utilisateur de soulever les dispositifs d'aspiration et de vider le réservoir plein.

Vider le réservoir des réactifs usagés

- 1 Sélectionnez **Raise Sippers** (Soulever les dispositifs d'aspiration).
- 2 Retirez le réservoir à réactifs usagés et jetez le contenu de manière appropriée.
- 3 Remettez le réservoir vide dans le compartiment de tampon.
- 4 Sélectionnez **Continue** (Continuer). L'analyse reprend automatiquement.

Flux de travail de réhybridation

Une analyse de réhybridation peut s'avérer nécessaire si les indicateurs générés au cours des quelques premiers cycles montrent des intensités inférieures à 2 500. Toutefois, on s'attend à ce que certaines librairies à faible diversité aient des intensités inférieures à 1 000, ce qui ne peut être résolu par une réhybridation.



REMARQUE

L'utilisation de la commande End Run (Terminer l'analyse) est définitive. L'analyse ne peut pas reprendre, les consommables ne peuvent pas être réutilisés et les données de séquençage de l'analyse ne sont pas enregistrées.

Lorsque vous arrêtez une analyse, le logiciel effectue les étapes suivantes avant de terminer l'analyse :

- ▶ Il place la Flow Cell en état de sécurité.
- ▶ Il déverrouille la RFID de la Flow Cell pour une future analyse.
- ▶ Il attribue une date de péremption de réhybridation à la Flow Cell.
- ▶ Il écrit les journaux de l'analyse pour les cycles terminés. Un délai est normal.
- ▶ Il ignore le lavage automatique après analyse.

Lorsque vous démarrez une analyse de réhybridation, le logiciel effectue les étapes d'analyse suivantes :

- ▶ Il crée un dossier d'analyse basé sur le nom unique de l'analyse.
- ▶ Il vérifie que la date de réhybridation de la Flow Cell n'est pas arrivée à expiration.
- ▶ Il amorce les réactifs. Un délai est normal.
- ▶ Il ignore l'étape de génération d'amplifiats.
- ▶ Il retire le primer de lecture 1 précédent.
- ▶ Il hybride un nouveau primer de lecture 1.
- ▶ Il continue la lecture 1 et le reste de l'analyse selon les paramètres de l'analyse spécifiés.

À quel moment arrêter une analyse pour réhybridation

Une réhybridation ultérieure n'est possible que si vous arrêtez l'analyse aux moments suivants :

- ▶ **Après le cycle 5** : les intensités apparaissent après l'enregistrement du modèle, qui nécessite les cinq premiers cycles du séquençage. Bien qu'il soit sûr d'arrêter l'analyse après le cycle 1, il est recommandé d'attendre la fin du cycle 5. N'arrêtez pas une analyse au cours de la génération d'amplifiats.
- ▶ **Lecture 1 ou lecture d'index 1** : arrêtez l'analyse *avant* que ne commence la resynthèse des paires de bases appariées. La Flow Cell ne peut pas être enregistrée pour une réhybridation ultérieure après le début de la resynthèse appariée.

Consommables requis

Une analyse de réhybridation nécessite une nouvelle cartouche de tampon et une nouvelle cartouche de réactifs NextSeq 550DX, quel que soit le moment d'arrêt de l'analyse.

Arrêter l'analyse en cours

- 1 Sélectionnez **End Run** (Terminer l'analyse). Lorsque vous êtes invité à confirmer la commande, sélectionnez **Yes** (Oui).
- 2 Lorsque vous êtes invité à enregistrer la Flow Cell, sélectionnez **Yes** (Oui). Notez la date de péremption pour la réhybridation.
- 3 Retirez la Flow Cell enregistrée et placez-la à une température comprise entre 2 °C et 8 °C jusqu'à ce que vous soyez prêt à configurer l'analyse de réhybridation.



REMARQUE

Vous pouvez stocker la Flow Cell jusqu'à sept jours à une température comprise entre 2 °C et 8 °C dans un étui de protection à rabat en plastique **sans** l'emballage dessiccant. Pour de meilleurs résultats, réhybridez la Flow Cell enregistrée sous trois jours.

Effectuer un lavage manuel

- 1 Sur l'écran d'accueil, sélectionnez **Perform Wash** (Procéder au lavage).
- 2 Sur l'écran Wash Selection (Sélection du lavage), sélectionnez **Manual Post-Run Wash** (Lavage manuel après analyse). Consultez la section *Effectuer un lavage manuel*, page 37.



REMARQUE

Si vous n'avez pas retiré la cartouche de réactifs et la cartouche de tampon de l'analyse arrêtée, vous pouvez les utiliser pour le lavage manuel. Sinon, effectuez le lavage manuel à l'aide de la cartouche de lavage des réactifs et de la cartouche de lavage du tampon.

Configurer une nouvelle analyse dans l'onglet Prep (Préparation) de BaseSpace

- 1 Si l'instrument est configuré pour BaseSpace ou BaseSpace Onsite, configurez une nouvelle analyse dans l'onglet Prep (Préparation) en utilisant les mêmes paramètres que ceux de l'analyse d'origine.



ASTUCE

Cliquez sur l'onglet Pools (Groupements), sélectionnez l'ID de groupement pertinent pour conserver les paramètres de l'analyse précédente, puis assignez un nom unique pour la nouvelle analyse.

Configurer une analyse sur l'instrument

- 1 Préparez une nouvelle cartouche de réactifs.
- 2 Si la Flow Cell enregistrée a été stockée, placez-la de façon à ce qu'elle atteigne la température ambiante (15 à 30 minutes).
- 3 Nettoyez et chargez la Flow Cell enregistrée.
- 4 Retirez le réservoir à réactifs usagés et jetez le contenu de façon appropriée, puis rechargez le flacon vide.

- 5 Chargez la nouvelle cartouche de tampon et la nouvelle cartouche de réactifs.
- 6 Sur l'écran Run Setup (Configuration de l'analyse), sélectionnez l'une des options suivantes :
 - ▶ **BaseSpace ou BaseSpace Onsite** : sélectionnez l'analyse et confirmez les paramètres de l'analyse.
 - ▶ **Standalone** (Autonome) : saisissez le nom de l'analyse et spécifiez des paramètres identiques à ceux de l'analyse d'origine.
- 7 Sélectionnez **Next** (Suivant) pour effectuer une vérification avant analyse, puis démarrez l'analyse.

Erreurs de puce BeadChip et de balayage

Le logiciel ne peut pas lire le code à barres de la puce BeadChip

Lorsque la boîte de dialogue d'erreur de code à barres apparaît, sélectionnez une option parmi les suivantes :

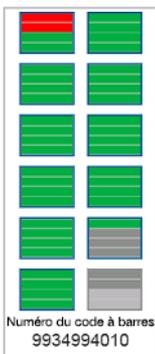
- ▶ Sélectionnez **Rescan** (Nouveau balayage). Le logiciel tente à nouveau de lire le code à barres.
- ▶ Sélectionnez le champ de texte et saisissez le code à barres numérique tel qu'affiché dans l'image. En fonction de la puce Beadchip, les numéros de code à barres peuvent comporter jusqu'à 12 chiffres. Sélectionnez **Save** (Enregistrer). L'image du code à barres est enregistrée dans le dossier de sortie.
- ▶ Sélectionnez **Cancel** (Annuler). La porte du compartiment d'imagerie s'ouvre afin de décharger l'adaptateur de puce BeadChip.

Échec du balayage de la puce BeadChip

Les images sont enregistrées après leur numérisation. L'enregistrement identifie les billes en mettant en corrélation leur emplacement dans l'image numérisée et les renseignements fournis par le dossier de bille référencée, ou DMAP.

Les sections dont l'enregistrement a échoué sont indiquées en rouge sur l'image de la puce BeadChip.

Figure 28 Puce BeadChip affichant des sections échouées



Une fois la numérisation terminée et les données de numérisation écrites vers le dossier de sortie, le bouton Rescan (Nouveau balayage) est activé.

Lorsque le bouton Rescan (Nouveau balayage) est sélectionné, le logiciel effectue les étapes suivantes :

- ▶ Exécution d'un nouveau balayage des échantillons qui comportent des sections échouées avec un chevauchement entre plaques plus élevé.
- ▶ Génération des fichiers de sortie dans le dossier de sortie original.
- ▶ Écrasement des fichiers de sortie précédents pour les sections échouées.

- ▶ Incrémentation du compteur de balayage d'une unité pour chaque nouveau balayage, mais en arrière-plan. Le logiciel ne renomme pas le dossier de sortie.

Commencer ou renouveler un balayage

- 1 Sélectionnez **Rescan** (Nouveau balayage) pour effectuer un balayage des échantillons comportant des sections ayant échoué.
- 2 Si le balayage échoue toujours, mettez fin au balayage.
- 3 Retirez la puce BeadChip et l'adaptateur, puis inspectez la puce BeadChip à la recherche de poussière et de débris. Utilisez de l'air en canette ou toute autre méthode de nettoyage à air comprimé pour éliminer les débris.
- 4 Rechargez la puce BeadChip et lancez un nouveau balayage.
Lorsqu'un nouveau balayage est lancé, le logiciel effectue les étapes suivantes :
 - ▶ Balayage de la totalité de la puce BeadChip.
 - ▶ Génération des fichiers de sortie dans un nouveau dossier de sortie.
 - ▶ Incrémentation du compteur de balayage d'une unité en fonction du décompte de balayages du dernier balayage.

Remplacer les fichiers de manifeste et les fichiers de groupement

- 1 Consultez la page d'aide d'Illumina (support.illumina.com) correspondant à la puce BeadChip que vous utilisez, puis cliquez sur l'onglet **Downloads** (Téléchargements).
- 2 Téléchargez les fichiers à remplacer ou à mettre à jour, puis copiez les fichiers vers l'emplacement réseau de votre choix.



REMARQUE

Assurez-vous de sélectionner des fichiers de manifeste et des fichiers de groupement compatibles avec le système de l'instrument NextSeq 550Dx. Les fichiers compatibles contiennent **NS550** dans leur nom de fichier.

- 3 Uniquement dans les cas où l'emplacement a changé, mettez l'emplacement à jour sur l'écran BeadChip Scan Configuration (Configuration des balayages de la puce BeadChip) de la manière suivante :
 - a Sur l'écran d'accueil NCS, sélectionnez **Manage Instrument** (Gérer l'instrument).
 - b Sélectionnez **System Configuration** (Configuration du système).
 - c Sélectionnez **BeadChip Scan Configuration** (Configuration des balayages de la puce BeadChip).
- 4 Sélectionnez **Browse** (Parcourir) puis accédez à l'emplacement des fichiers remplacés ou mis à jour.

Formules personnalisées et dossiers de formules

Ne modifiez pas les formules d'origine. Enregistrez toujours la formule d'origine sous un nouveau nom. Si une formule originale est modifiée, l'utilitaire de mise à jour du logiciel ne peut plus reconnaître la formule pour les mises à jour ultérieures et les versions plus récentes ne sont pas installées.

Enregistrez les formules personnalisées dans le dossier de formules approprié. Les dossiers de formules sont organisés comme suit.

 **Custom**

 **High** : formules personnalisées utilisées avec une trousse de débit élevé.

-  **Mid** : formules personnalisées utilisées avec une trousse de débit moyen.
-  **High** : formules d'origine utilisées avec une trousse de débit élevé.
-  **Mid** : formules d'origine utilisées avec une trousse de débit moyen.
-  **Wash** : contient la formule de lavage manuel.

Message d'erreur RAID

L'ordinateur de l'instrument NextSeq 550Dx est doté de quatre disques durs; deux pour le mode diagnostic et deux pour le mode recherche. Si l'un des disques durs cesse de fonctionner, le système génère un message d'erreur RAID et vous suggère de prendre contact avec l'assistance technique d'Illumina. Un remplacement du disque dur est généralement nécessaire.

Vous pouvez continuer la procédure de configuration de l'analyse et les opérations normales. Le but de ce message est de pouvoir planifier à l'avance une visite de service pour éviter des interruptions durant le fonctionnement normal de l'instrument. Pour continuer, sélectionnez **Close** (Fermer).

Configurer les paramètres du système

La configuration du système a lieu lors de l'installation. Toutefois, si un changement est nécessaire ou si le système doit être reconfiguré, utilisez les options de configuration du système. Seul un compte administrateur de Windows a l'autorisation d'accéder aux options de configuration du système.

- ▶ **Network Configuration** (Configuration du réseau) : fournit des options de configuration des paramètres de l'adresse IP, de l'adresse du serveur de noms de domaine (DNS), du nom de l'ordinateur et du nom de domaine.
- ▶ **Analysis Configuration** (Configuration de l'analyse) : fournit des options relatives aux méthodes d'analyse, notamment BaseSpace, BaseSpace Onsite, le mode autonome et le suivi de l'analyse sur BaseSpace, ainsi que des paramètres pour la connexion par défaut à BaseSpace et pour la création de rapports sur l'état de l'instrument.
- ▶ **BeadChip Scan Configuration** (Configuration des balayages de la puce BeadChip) : fournit des options permettant de définir l'emplacement du dossier DMAP par défaut, l'emplacement du dossier de sortie, le format de fichier des images enregistrées et le type de fichier de sortie.

Définir la configuration réseau

- 1 À l'écran Manage Instrument (Gérer l'instrument), sélectionnez **System Configuration** (Configuration du système).
- 2 Sélectionnez **Network Configuration** (Configuration du réseau).
- 3 Sélectionnez **Obtain an IP address automatically** (Obtenir automatiquement une adresse IP) pour récupérer l'adresse IP depuis un serveur DHCP.



REMARQUE

Le Dynamic Host Configuration Protocol (DHCP) est un protocole réseau standard utilisé sur les réseaux IP pour distribuer de manière dynamique les paramètres de configuration réseau.

Vous pouvez également sélectionner **Use the following IP address** (Utiliser l'adresse IP suivante) pour connecter manuellement l'instrument à un autre serveur, en procédant comme suit. Communiquez avec votre administrateur réseau pour obtenir les adresses propres à votre installation.

- ▶ Saisissez l'adresse IP. L'adresse IP est une série de quatre nombres séparés par des points, par exemple 168.62.20.37.
- ▶ Saisissez le masque de sous-réseau, qui est une subdivision du réseau IP.

- ▶ Saisissez l'adresse de la passerelle par défaut, c'est-à-dire le routeur du réseau qui se connecte à Internet.
- 4 Sélectionnez **Obtain a DNS server address automatically** (Obtenir une adresse de serveur DNS automatiquement) pour connecter l'instrument au serveur de noms de domaine associé à l'adresse IP. Vous pouvez également sélectionner **Use the following DNS server addresses** (Utiliser les adresses des serveurs DNS suivantes) pour connecter manuellement l'instrument au serveur de noms de domaine comme suit.
 - ▶ Saisissez les adresses DNS à privilégier. L'adresse DNS est le nom du serveur utilisé pour traduire les noms de domaine en adresses IP.
 - ▶ Saisissez l'adresse DNS secondaire. L'adresse secondaire est utilisée si l'adresse DNS à privilégier ne peut pas traduire un nom de domaine particulier en adresse IP.
 - 5 Sélectionnez **Save** (Enregistrer) pour passer à l'écran Computer (Ordinateur).



REMARQUE

Le nom de l'ordinateur de l'instrument est le nom attribué à l'ordinateur de l'instrument au moment de sa fabrication. Toute modification du nom de l'ordinateur peut nuire à la connectivité et nécessiter l'intervention d'un administrateur réseau.

- 6 Connectez l'ordinateur de l'instrument à un domaine ou à un groupe de travail en procédant comme suit.
 - ▶ **Pour les instruments connectés à Internet** : sélectionnez **Member of Domain** (Membre du domaine), puis saisissez le nom de domaine associé à la connexion Internet de votre établissement. Tout changement de domaine nécessite le nom d'utilisateur et le mot de passe d'un administrateur.
 - ▶ **Pour les instruments qui ne sont pas connectés à Internet** : sélectionnez **Member of Work Group** (Membre du groupe de travail), puis saisissez un nom de groupe de travail. Le nom du groupe de travail est propre à votre établissement.
- 7 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Définir la configuration de l'analyse

- 1 À l'écran Manage Instrument (Gérer l'instrument), sélectionnez **System Configuration** (Configuration du système).
- 2 Sélectionnez **Analysis Configuration** (Configuration de l'analyse).
- 3 Sélectionnez l'une des options suivantes afin de définir l'emplacement où les données seront envoyées pour une analyse ultérieure.
 - ▶ Sélectionnez **BaseSpace** pour envoyer les données de séquençage à l'environnement BaseSpace d'Illumina. **[Facultatif]** Cochez la case **Output Folder** (Dossier de sortie), sélectionnez **Browse** (Parcourir), puis accédez à un emplacement réseau secondaire où les fichiers BCL seront enregistrés, en plus de l'enregistrement BaseSpace.
 - ▶ Sélectionnez **BaseSpace Onsite**. Dans le champ Server Name (Nom du serveur), saisissez le chemin d'accès complet menant à votre serveur BaseSpace Onsite. **[Facultatif]** Cochez la case **Output Folder** (Dossier de sortie), sélectionnez **Browse** (Parcourir), puis accédez à un emplacement réseau secondaire où les fichiers BCL seront enregistrés, en plus de l'enregistrement sur le serveur BaseSpace Onsite.
 - ▶ Sélectionnez **Standalone instrument** (Instrument autonome) pour enregistrer les données à un emplacement situé sur le réseau. Sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour sélectionner l'emplacement réseau de votre choix. Le logiciel de commande génère automatiquement le nom du dossier de sortie.

- ▶ **[Facultatif]** Sélectionnez **Use Run Monitoring** (Utiliser la surveillance de l'analyse) pour surveiller l'analyse en utilisant les outils de visualisation sur BaseSpace. Des identifiants de connexion BaseSpace ainsi qu'une connexion Internet sont nécessaires.
- 4 Si vous avez sélectionné BaseSpace ou BaseSpace Onsite, réglez les paramètres BaseSpace de la manière suivante.
 - ▶ Saisissez un **nom d'utilisateur** et un **mot de passe** BaseSpace afin d'enregistrer l'instrument sur BaseSpace.
 - ▶ Sélectionnez **Use default login and bypass the BaseSpace login screen** (Utiliser la connexion par défaut et passer l'écran de connexion BaseSpace) pour définir le nom d'utilisateur et le mot de passe enregistrés en tant qu'identifiants de connexion par défaut. Ce paramètre contourne l'écran BaseSpace pendant la configuration de l'analyse.
 - 5 Sélectionnez **(Transmettre les données de performance de l'instrument à Illumina) Send Instrument Health Information to Illumina** (Transmettre les renseignements sur l'état de l'instrument à Illumina) 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 NCS utilisée. Lorsque ce paramètre est activé, les données sur la performance de l'instrument sont envoyées 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
 - ▶ Requiert que l'instrument soit connecté au BaseSpace
-  **REMARQUE**
Cette option n'est pas disponible sur la plateforme de séquences sur place
- ▶ Est activé par défaut. Pour retirer ce service, désactivez le paramètre **Send Instrument Health Information to Illumina** (Transmettre les renseignements sur l'état de santé de l'instrument à Illumina).
- 6 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Configuration des balayages de la puce BeadChip

- 1 À l'écran Manage Instrument (Gérer l'instrument), sélectionnez **System Configuration** (Configuration du système).
- 2 Sélectionnez **BeadChip Scan Configuration** (Configuration des balayages de la puce BeadChip).
- 3 Afin de spécifier un emplacement par défaut pour le dossier DMAP, sélectionnez **Browse** (Parcourir) et accédez à l'emplacement de votre choix sur le réseau de votre installation.



REMARQUE

Avant chaque balayage, téléchargez et copiez le contenu DMAP vers cet emplacement. Le contenu DMAP est requis pour chaque puce BeadChip et est unique à chaque code à barres de puce BeadChip.

- 4 Pour spécifier un emplacement de sortie par défaut, sélectionnez **Browse** (Parcourir) et accédez à l'emplacement de votre choix sur le réseau de votre installation.
- 5 Sélectionnez un format de fichier d'image pour les images enregistrées. Le type d'image par défaut est **JPG**.

- 6 Sélectionnez un format de fichier de sortie pour les données de balayage. Le type de fichier de sortie par défaut est **GTC only** (GTC uniquement).
- 7 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).
- 8 Dans l'écran Scan Map (Carte de balayage), indiquez le chemin complet du fichier de manifeste et du fichier de groupement pour chaque type de puce BeadChip. Sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour chaque type de fichier et accédez au dossier qui contient les fichiers pertinents.
- 9 **[Facultatif]** Sélectionnez **Hide Obsolete BeadChips** (Masquer les puces Beadchip obsolètes) pour ne pas afficher les puces Beadchip obsolètes.
- 10 Sélectionnez **Save** (Enregistrer).

Annexe B Real-Time Analysis

Présentation de Real-Time Analysis	57
Flux de travail de Real-Time Analysis	58

Présentation de Real-Time Analysis

L'instrument NextSeq 550Dx utilise une version du logiciel d'analyse en temps réel (Real-Time Analysis, ou RTA) appelée RTA2. RTA2 fonctionne sur l'ordinateur de l'instrument et extrait les intensités des images, effectue les définitions des bases et associe un score de qualité aux définitions des bases. RTA2 et le logiciel de commande communiquent par le biais d'une interface Web HTTP et de fichiers mémoire partagés. Si RTA2 est arrêté, le traitement ne reprend pas, et les données de l'analyse ne sont pas enregistrées.



REMARQUE

Les performances de démultiplexage ne sont pas calculées. L'onglet Index de Sequencing Analysis Viewer (SAV) n'est donc pas rempli.

Entrées dans RTA2

RTA 2 nécessite les entrées suivantes pour le traitement :

- ▶ Les images des plaques contenues dans la mémoire locale du système.
- ▶ RunInfo.xml, qui est généré automatiquement au début de l'analyse, fournit le nom de l'analyse et le nombre de cycles, vérifie si une lecture est indexée et lit le nombre de plaques sur la Flow Cell.
- ▶ RTA.exe.config, qui est un fichier de configuration logicielle au format XML.

RTA2 reçoit des commandes du logiciel de commande indiquant l'emplacement du fichier RunInfo.xml et précisant si un dossier de sortie facultatif est spécifié.

Fichiers de sortie RTA v2

Les images de chaque canal passent dans la mémoire sous forme de plaques. Les plaques sont de petites zones d'imagerie sur la Flow Cell qui constituent pour la caméra une unité de vision. À partir de ces images, le logiciel produit des fichiers de sortie qui prennent la forme d'un ensemble de fichiers de définition des bases dont la qualité est notée et de fichiers de filtrage. Tous les autres fichiers supportent les fichiers de sortie.

Type de fichier	Description
Fichiers de définition des bases	Chaque plaque analysée est incluse dans un fichier regroupant les définitions des bases (*.bcl.bgzf) pour chaque ligne et chaque cycle. Le fichier cumulé de définition des bases contient la définition des bases ainsi que le score de qualité associé à chaque amplifiat dans cette ligne.
Fichiers de filtrage	Chaque plaque produit des renseignements sur le filtre qui sont rassemblés dans un fichier de filtrage (*.filter) par ligne. Le fichier de filtrage spécifie si un amplifiat a franchi les filtres.
Fichiers d'emplacement des amplifiats	Les fichiers d'emplacement des amplifiats (*.locs) contiennent les coordonnées X et Y de chaque amplifiat dans une plaque. Lors de la génération du modèle, un fichier d'emplacement des amplifiats est créé pour chaque ligne.
Fichier d'index de définition des bases	Afin de préserver les renseignements d'origine sur les plaques, un fichier d'index de définition des bases (*.bci) est produit pour chaque ligne. Le fichier d'index contient une paire de valeurs pour chaque plaque, qui sont respectivement le numéro de cette plaque et le nombre d'amplifiats qu'elle contient.

Les fichiers de sortie sont utilisés pour une analyse en aval dans BaseSpace. Autrement, utilisez le logiciel de conversion bcl2fastq pour les conversions FASTQ et les solutions d'analyse tierce. Les fichiers NextSeq 550Dx requièrent bcl2fastq v2.0 ou une version ultérieure. Pour obtenir la dernière version de bcl2fastq, veuillez consulter la [page de téléchargement de NextSeq 550Dx](#) sur le site Web d'Illumina.

RTA v2 fournit des indicateurs en temps réel sur la qualité de l'analyse, stockés dans des fichiers InterOp. Les fichiers InterOp sont des fichiers de sortie binaires contenant des indicateurs relatifs aux plaques, aux cycles et au niveau de lecture nécessaires pour afficher des indicateurs en temps réel en utilisant le logiciel SAV (visualiseur d'analyse de séquençage). Pour la dernière version du SAV, consultez la [page de téléchargement du logiciel SAV](#) sur le site Web d'Illumina.

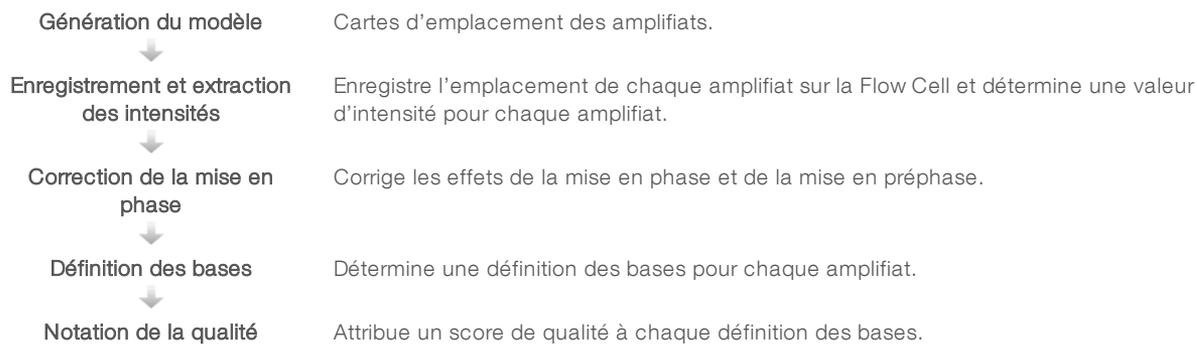
Gestion des erreurs

RTA2 crée des fichiers journaux et les enregistre dans le dossier RTALogs. Les erreurs sont enregistrées dans un fichier d'erreurs au format *.tsv.

Les fichiers journaux et d'erreurs suivants sont transférés vers leur emplacement final de sortie à la fin du traitement :

- ▶ *GlobalLog*.tsv récapitule les événements importants survenus pendant l'analyse.
- ▶ *Error*.tsv répertorie les erreurs survenues au cours d'une analyse.
- ▶ *WarningLog*.tsv répertorie les avertissements reçus au cours d'une analyse.

Flux de travail de Real-Time Analysis



Génération du modèle

La première étape du flux de travail RTA est la génération du modèle, qui définit la position de chaque amplifiat dans une plaque à l'aide des coordonnées X et Y.

La génération du modèle nécessite les données d'image des cinq premiers cycles de l'analyse. Une fois l'imagerie du dernier cycle de modèle d'une plaque réalisée, le modèle est généré.



REMARQUE

Pour la détection d'un amplifiat pendant la génération du modèle, il doit y avoir au moins une base autre que G dans les **cinq** premiers cycles. Pour toutes les séquences d'indexage, RTA v2 nécessite au moins une base autre que G dans les **deux** premiers cycles.

Le modèle est utilisé comme référence pour l'étape suivante d'enregistrement et l'extraction des intensités. Les emplacements des amplifiats sur toute la Flow Cell sont écrits dans les fichiers d'emplacement des amplifiats (*.locs), un pour chaque ligne.

Enregistrement et extraction des intensités

L'enregistrement et l'extraction des intensités débutent après la génération du modèle.

- ▶ L'enregistrement aligne les images produites par chaque cycle d'imagerie selon le modèle.
- ▶ L'extraction d'intensité détermine une valeur d'intensité pour chaque amplifiat du modèle pour une image donnée.

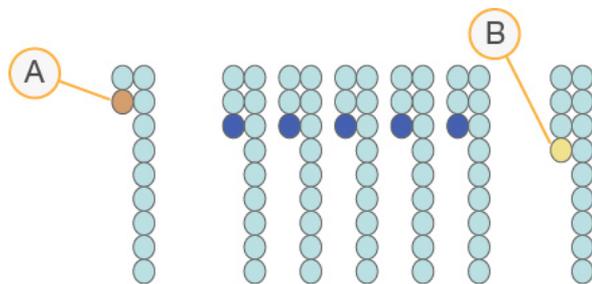
S'il y a échec d'enregistrement de l'image d'un cycle, quelle qu'elle soit, aucune définition des bases ne sera générée pour cette plaque dans ce cycle. Utilisez le logiciel SAV (visualiseur d'analyse de séquençage) pour examiner les vignettes et trouver les images dont l'enregistrement a échoué.

Correction de la mise en phase

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 29 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

RTA2 corrige les effets de la mise en phase et de la mise en préphase, ce qui maximise la qualité des données à chaque cycle tout au long de l'analyse.

Définition des bases

La définition des bases détermine une base (A, C, G ou T) pour chaque amplifiat d'une plaque donnée d'un cycle spécifique. L'instrument NextSeq 550Dx utilise un séquençage à deux canaux, qui ne nécessite que deux images pour encoder les données de quatre bases d'ADN, une provenant du canal rouge et une autre, du canal vert.

Les intensités extraites d'une image et sa comparaison avec une autre image donnent quatre populations distinctes, chacune correspondant à un nucléotide. Le processus de définition des bases détermine à quelle population appartient chaque amplifiat.

Figure 30 Visualisation de l'intensité des amplifiats

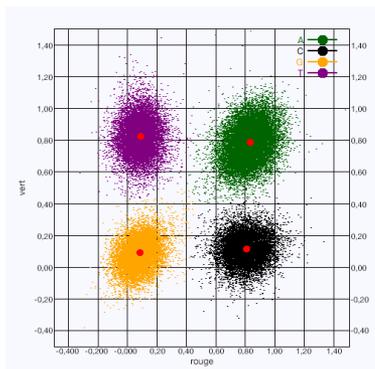


Tableau 1 Définition des bases dans le séquençage à deux canaux

Base	Canal rouge	Canal vert	Résultat
A	1 (allumé)	1 (allumé)	Amplifiats montrant une intensité tant dans le canal rouge que dans le canal vert.
C	1 (allumé)	0 (éteint)	Amplifiats montrant une intensité seulement dans le canal rouge.
G	0 (éteint)	0 (éteint)	Amplifiats ne montrant d'intensité dans aucun emplacement d'amplifiat connu.
T	0 (éteint)	1 (allumé)	Amplifiats montrant une intensité seulement dans le canal vert.

Amplifiats passant le filtre

Au cours de l'analyse, RTA2 filtre les données brutes pour supprimer les lectures non conformes au seuil de qualité des données. Les amplifiats qui se chevauchent et ceux de mauvaise qualité sont supprimés.

Dans le cas d'une analyse sur deux canaux, RTA2 utilise un système basé sur une population pour déterminer la pureté d'une définition des bases. Les amplifiats franchissent le filtre (PF) lorsqu'un maximum d'une définition des bases sur les 25 premiers cycles a une pureté < 0,63. Les bases des amplifiats qui ne passent pas le filtre ne sont pas définies.

Considérations relatives à l'indexage

Le processus de définition des bases qui a lieu pendant la lecture d'index diffère de celui qui a lieu pendant les autres lectures.

Une lecture d'index doit contenir une base autre que G au moins dans l'un des deux premiers cycles.

Si deux bases G sont définies au début d'une lecture d'index, aucune intensité de signal n'est générée.

Il faut obtenir un signal dans l'un des deux premiers cycles pour assurer la performance de démultiplexage.

Pour accroître la robustesse de démultiplexage, sélectionnez à chaque cycle des séquences d'indexage qui fournissent un signal dans un canal au moins ou si possible dans les deux canaux. Suivez cette recommandation pour éviter les combinaisons d'index pouvant aboutir à l'obtention de bases G uniquement à n'importe quel cycle.

- ▶ Canal rouge : A ou C
- ▶ Canal vert : A ou T

Ce processus de définition des bases permet d'éviter les erreurs lors de l'analyse d'échantillons low-plex.

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. Les scores de qualité sont représentés sous la forme Q(X), 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 des fichiers de définition des bases (*.bcl.bgzf).

Annexe C Fichiers et dossiers de sortie

Fichiers de sortie de séquençage	63
Structure des dossiers de sortie de séquençage	66
Fichiers de sortie du balayage	67
Structure du dossier de sortie de balayage	67

Fichiers de sortie de séquençage

Type de fichier	Description, emplacement et nom des fichiers
Fichier de définition des bases	Chaque plaque analysée est incluse dans un fichier de définition des bases; ces fichiers sont rassemblés dans un fichier pour chaque ligne de chaque cycle. Le fichier cumulé contient la définition des bases ainsi que le score de qualité codé associé à chaque amplifiat de cette ligne. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : les fichiers sont stockés dans un dossier pour chaque ligne. [Cycle].bcl.bgzf, où [Cycle] représente le numéro à quatre chiffres du cycle. Les fichiers de définition des bases sont compressés à l'aide du logiciel de compression gzip.
Fichier index de définition des bases	Pour chaque ligne, un fichier index binaire indique les renseignements sur la plaque d'origine dans une paire de valeurs pour chaque plaque, qui sont le numéro et le nombre d'amplifiats de la plaque. Les fichiers d'index de définition des bases sont créés la première fois qu'un fichier de définition des bases est créé pour une ligne. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : les fichiers sont stockés dans un dossier pour chaque ligne. s_[Ligne].bci
Fichiers d'emplacement des amplifiats	Pour chaque plaque, les coordonnées XY de chaque amplifiat sont rassemblées dans un fichier d'emplacement des amplifiats pour chaque ligne. Les fichiers d'emplacement des amplifiats sont le résultat de la génération du modèle. Data\Intensities\L00[X] : les fichiers sont stockés dans un dossier pour chaque ligne. s_[ligne].locs
Fichiers de filtrage	Le fichier de filtrage spécifie si un amplifiat a franchi les filtres. Les renseignements de filtrage sont rassemblés dans un seul fichier de filtrage pour chaque ligne et chaque lecture. Les fichiers de filtrage sont générés au cycle 26 et portent sur 25 cycles de données. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : les fichiers sont stockés dans un dossier pour chaque ligne. s_[ligne].filter
Fichiers InterOp	Fichiers de compte rendu binaire nécessaires pour le logiciel SAV (visualiseur d'analyse de séquençage). Les fichiers InterOp sont mis à jour tout au long de l'analyse. Dossier InterOp
Fichier de configuration RTA	Créé au début de l'analyse, le fichier de configuration RTA indique les paramètres de l'analyse. [Dossier racine], RTAConfiguration.xml
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

Plaques de la Flow Cell

Les plaques sont de petites zones d'imagerie sur la Flow Cell qui constituent pour la caméra une unité de vision. Le nombre total de plaques dépend du nombre de lignes, de témoins et de surfaces imagés sur la Flow Cell et de la façon dont les caméras fonctionnent conjointement pour recueillir les images. Les Flow Cell à débit élevé comportent 864 plaques au total.

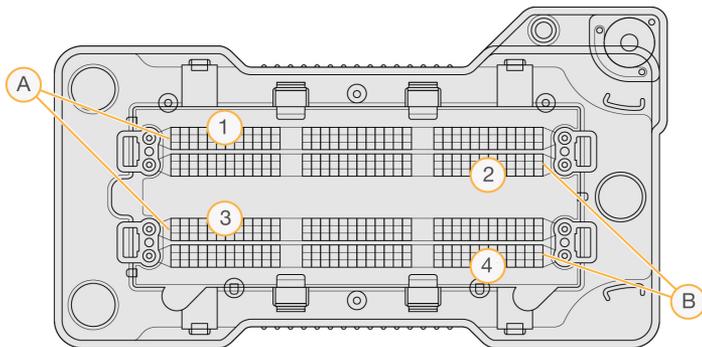
Tableau 2 Plaques de la Flow Cell

Composant de la Flow Cell	Débit élevé	Description
Lignes	4	Une ligne est un canal physique possédant des ports d'entrée et de sortie dédiés.
Surfaces	2	La Flow Cell est imagée sur deux surfaces : le dessus et le dessous. Le système image le dessus d'une plaque, puis le dessous de la même plaque avant de passer à la plaque suivante.
Témoins par ligne	3	Un témoin est une colonne de plaques sur une ligne.
Segments de caméra	3	L'instrument utilise six caméras pour imager la Flow Cell en trois segments pour chaque ligne.
Plaques par témoin par segment de caméra	12	La plaque est la zone de la Flow Cell qui constitue pour la caméra une unité d'image.
Nombre total de plaques imagées	864	Le nombre total de plaques est égal aux lignes x surfaces x témoins x segments de caméra x plaques par témoin par segment.

Numérotation des lignes

Les lignes 1 et 3, appelées paire de lignes A, sont imagées simultanément. Les lignes 2 et 4, appelées paire de lignes B, sont imagées lorsque l'imagerie de la paire de lignes A est terminée.

Figure 31 Numérotation des lignes

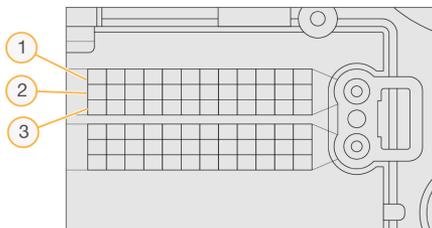


- A Paire de lignes A : lignes 1 et 3
- B Paire de lignes B : lignes 2 et 4

Numérotation des témoins

Chaque ligne est imagée en trois témoins. Les témoins sont numérotés de 1 à 3 pour les Flow Cell à débit élevé.

Figure 32 Numérotation des témoins

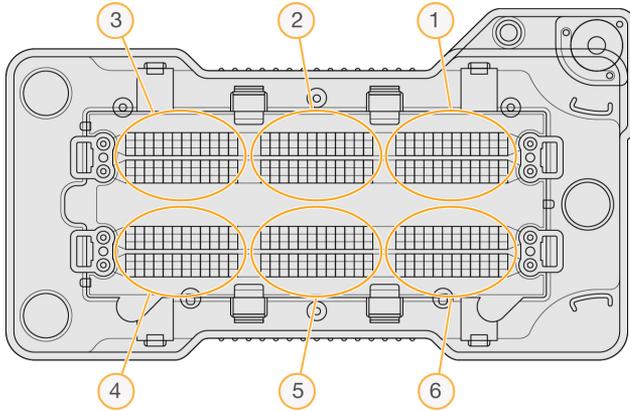


Numérotation des caméras

L'instrument NextSeq 550Dx utilise six caméras pour l'imagerie de la Flow Cell.

Les caméras sont numérotées de 1 à 6. Les caméras 1 à 3 effectuent l'imagerie de la ligne 1. Les caméras 4 à 6 effectuent l'imagerie de la ligne 3. Une fois l'imagerie des lignes 1 et 3 effectuée, le module d'imagerie se déplace sur l'axe X pour effectuer l'imagerie des lignes 2 et 4.

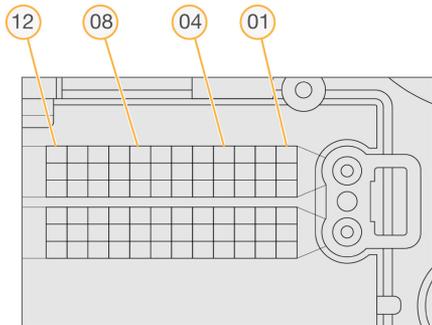
Figure 33 Numérotation des caméras et des segments (Flow Cell à débit élevé illustrée)



Numérotation des plaques

Chaque témoin du segment de chacune des caméras comporte 12 plaques. Les plaques sont numérotées de 01 à 12 dans un format de deux chiffres, quel que soit le numéro de témoin ou le segment de caméra.

Figure 34 Numérotation des plaques



Le numéro complet de la plaque comporte cinq chiffres pour indiquer son emplacement comme suit :

- ▶ **Surface** : 1 représente la surface supérieure, et 2, la surface inférieure
- ▶ **Témoin** : 1, 2 ou 3
- ▶ **Caméra** : 1, 2, 3, 4, 5 ou 6
- ▶ **Plaque** : 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 ou 12

Exemple : la plaque portant le numéro 12508 indique qu'il s'agit d'une surface supérieure, du témoin 2, de la caméra 5 et de la plaque 8.

Le numéro complet à cinq chiffres de la plaque est utilisé dans le nom des vignettes et des fichiers de mise en phase empirique. Pour plus de renseignements, consultez la section *Fichiers de sortie de séquençage*, page 63.

Structure des dossiers de sortie de séquençage

Le logiciel de commande génère automatiquement le nom du dossier de sortie.

Data (Données)

Intensities (Intensités)

BaseCalls

 **L001** : fichiers de définition des bases de la ligne 1, rassemblés dans un fichier par cycle.

 **L002** : fichiers de définition des bases de la ligne 2, rassemblés dans un fichier par cycle.

 **L003** : fichiers de définition des bases de la ligne 3, rassemblés dans un fichier par cycle.

 **L004** : fichiers de définition des bases de la ligne 4, rassemblés dans un fichier par cycle.

 **L001** : fichier *.locs rassemblant les emplacements des amplifiats de la ligne 1.

 **L002** : fichier *.locs rassemblant les emplacements des amplifiats de la ligne 2.

 **L003** : fichier *.locs rassemblant les emplacements des amplifiats de la ligne 3.

 **L004** : fichier *.locs rassemblant les emplacements des amplifiats de la ligne 4.

Images

Focus

 **L001** : images de mise au point de la ligne 1.

 **L002** : images de mise au point de la ligne 2.

 **L003** : images de mise au point de la ligne 3.

 **L004** : images de mise au point de la ligne 4.

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

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

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

 **RTALogs** : fichiers journaux décrivant les étapes de l'analyse.

 RTAConfiguration.txt

 RunInfo.xml

 RunNotes.xml

 RunParameters.xml

Fichiers de sortie du balayage

Type de fichiers	Description, emplacement et nom des fichiers
Fichiers GTC	Fichier de typage génotypique. Un fichier GTC est généré pour chaque échantillon balayé sur la puce BeadChip. Le nom du fichier comprend le code à barres et l'échantillon balayé. [code à barres]_ [échantillon].gtc
Fichiers images	Les fichiers images sont nommés d'après la zone qui a été balayée sur la puce BeadChip. Ce nom comprend le code à barres, l'échantillon et la section sur la puce BeadChip, le témoin, ainsi que le canal d'imagerie (rouge ou vert). [code à barres]_ [échantillon]_ [section]_ [témoin]_ [caméra]_ [plaque]_ [canal].jpg <ul style="list-style-type: none"> • Code à barres : le nom de fichier commence par le code à barres de la puce BeadChip. • Échantillon : une zone de la puce BeadChip numérotée selon une rangée (ROX), de haut en bas, et selon une colonne (COX), de gauche à droite. • Section : une rangée numérotée au sein d'un échantillon. • Témoin : les puces BeadChip sont imagées sous la forme d'un ensemble de plaques qui se chevauchent. Seul un témoin est donc utilisé pour l'imagerie de la section. • Caméra : la caméra utilisée pour recueillir l'image. • Plaque : une zone d'imagerie qui constitue pour la caméra l'unité de vision. • Canal : un canal est soit rouge, soit vert.

Structure du dossier de sortie de balayage

- 📁 [Date]_[Nom de l'instrument]_[N° de balayage]_[Code à barres]
 - 📁 [Code à barres]
 - 📁 Config
 - 📄 Effective.cfg : enregistre les paramètres de configuration utilisés lors du balayage.
 - 📁 Focus : contient les fichiers images servant à mettre au point le balayage.
 - 📁 Logs : contient les fichiers journaux répertoriant chaque étape effectuée pendant le balayage.
 - 📁 PreScanDiagnosticFiles
 - 📁 [Date_Heure] Barcode Scan
 - 📄 ProcessedBarcode.jpg : image du code à barres de la puce BeadChip.
 - 📄 Diagnostics de balayage (fichiers journaux)
 - 📄 PreScanChecks.csv : enregistre les résultats de la vérification automatique.
 - 📄 Fichiers GTC : fichiers de typage génotypique (un fichier par échantillon).
 - 📄 Fichiers IDAT : (facultatif) fichiers de données d'intensité (deux fichiers par échantillon, un fichier par canal).
 - 📄 Fichiers images : images du balayage pour chaque échantillon, section, témoin, caméra, plaque et canal.
 - 📄 [Code à barres]_sample_metrics.csv
 - 📄 [Code à barres]_section_metrics.csv
 - 📄 ScanParameters.xml

Index

A

- adaptateur
 - chargement de puce BeadChip 33
 - orientation de la puce BeadChip 31
 - présentation 5
- aide
 - documentation 2
- aide, technique 73
- alertes d'état 4
- algorithme Phred 61
- amplifiats passant le filtre 60
- analyse
 - fichiers de sortie 63
- analyse, primaire
 - pureté du signal 60
- arrêt de l'instrument 43
- assistance clientèle 73
- assistance technique 73
- audio 13

B

- barre d'état 3
- BaseSpace 1, 54
 - icônes de transfert 26
 - identifiants 18
- BeadChip
 - analyse 1
 - types 1
- BlueFuse Multi 1
- bouton d'alimentation 5, 11

C

- cartouche de réactifs
 - présentation 7
 - réservoir n° 28 38
- cartouche de tampon 9, 21
- clavier 13
- compartiment d'imagerie 3
- compartiment de réactifs 3
- compartiment du tampon 3
- compatibilité
 - Flow Cell, cartouche de réactifs 6
 - suivi RFID 6-7
- composants
 - barre d'état 3
 - compartiment d'imagerie 3

- compartiment de réactifs 3
- compartiment du tampon 3
- Configuration 54
- configuration autonome 24
- configuration de BaseSpace 23
- configuration de l'analyse, option avancée 13
- considérations relatives à l'indexage 60
- consommables 6
 - analyses de séquençage 14
 - cartouche de réactifs 7
 - cartouche de tampon 9
 - consommables de lavage 37-38
 - eau de laboratoire 14
 - Flow Cell 7
 - maintenance de l'instrument 14
- consommables fournis par l'utilisateur 14
- cycles d'une lecture 15-16

D

- Decode File Client 29
 - accès par compte 30
 - accès par puce BeadChip 31
- définition des bases 59
 - considérations relatives à l'indexage 60
- dépannage
 - échec de l'enregistrement du balayage 51
 - fichiers propres à une analyse 45
 - fichiers spécifiques au balayage 46
 - impossible de lire le code à barres de la puce BeadChip 51
 - indicateurs de faible qualité 49
 - options pour communiquer avec nous 45
 - remplacer les fichiers de manifeste et les fichiers de groupement 52
 - réservoir de réactifs usagés 49
 - vérification avant analyse 46
- directives à propos de l'eau de laboratoire 14
- documentation 2, 73
- dossier DMAP
 - Decode File Client 29
 - téléchargement 30
- durée de l'analyse 15-16

E

- éliminer les consommables 13
- emplacement de dossier 24

- emplacement des amplifiats
 - fichiers 63
 - génération du modèle 58
- erreurs et avertissements 4
 - dans les fichiers de sortie 58
- erreurs lors de la vérification avant analyse 46

F

- fichiers d'entrée, balayage
 - dossier DMAP 29
 - dossier DMAP, téléchargement 30
 - fichiers de groupement 29, 52
 - fichiers de manifeste 29, 52
- fichiers de définition des bases 63
- fichiers de filtrage 63
- fichiers de sortie 63
- fichiers de sortie du balayage
 - GTC, IDAT 67
- fichiers de sortie, balayage
 - GTC, IDAT 67
- fichiers de sortie, séquençage 63
- fichiers GTC 67
- fichiers InterOp 45, 63
- fichiers journaux
 - GlobalLog 58
 - LaneNLog 58
- fichiers locs 63
- filtre à air 4, 40
- filtre de pureté 60
- Flow Cell
 - broches d'alignement 18
 - emballage 17
 - imagerie 65
 - nettoyage 17
 - numéro de témoin 64
 - numérotation des lignes 64
 - numérotation des plaques 65
 - paires de lignes 7
 - plaques 63
 - présentation 7
 - réhybridation 49
 - types 1
- flux de travail
 - cartouche de réactifs 21
 - cartouche de tampon 21
 - considérations relatives à l'indexage 60
 - durée de l'analyse 15-16
 - Flow Cell 18
 - hypochlorite de sodium 38
 - identifiants BaseSpace 18

- indicateurs de l'analyse 25
- mode autonome 24
- mode BaseSpace 23
- option de chargement avancé 13
- préparation de la Flow Cell 17
- présentation 16, 30
- puce BeadChip 33
- réactifs usagés 20
- séquençage 58
 - vérification avant analyse 24, 33
- flux de travail de séquençage 58
- formamide, position 6 22
- formation en ligne 2

G

- génération d'amplifiats 15, 26
- génération du modèle 58-59
- gérer l'instrument
 - arrêter 43

H

- hypochlorite de sodium, lavage 38

I

- icônes
 - erreurs et avertissements 4
 - état 4
- imagerie, séquençage à deux canaux 59
- indicateurs
 - cycles d'intensité 26
 - cycles de densité des amplifiats 26
 - définition des bases 59
- indicateurs de l'analyse 25
- instrument
 - arrêter 43
 - avatar 12
 - bouton d'alimentation 5
 - démarrage 11
 - indicateurs de mode 12
 - paramètres de configuration 53
 - redémarrer 43
 - surnom 12
- intensités 59
- interrupteur 11

L

- lavage
 - automatique 27
 - composants du lavage 37
 - consommables fournis par l'utilisateur 37
 - lavage manuel 37
- lavage après analyse 27
- lavage de l'instrument 37
- logiciel
 - durée de l'analyse 15-16
 - initialisation 11
 - mise à jour automatique 42
 - mise à jour manuelle 42
 - paramètres de configuration 53
- logiciel Real-Time Analysis 1, 4
- Logiciel Real-Time Analysis
 - résultats 63
- logiciels
 - analyse d'image, définition des bases, logiciel de commande 4
 - sur instrument 4
- longueur de lecture 15-16
- longueurs de séquences 16

M

- maintenance de l'instrument
 - consommables 14
- maintenance préventive 37
- Message d'erreur RAID 53
- mise à jour du logiciel 41
- mise en phase empirique 59
- mise en phase, mise en préphase 59
- mode recherche uniquement 12

N

- nom d'utilisateur et mot de passe 11
- nom d'utilisateur et mot de passe du système 11
- numérotation des caméras 65
- numérotation des lignes 64
- numérotation des plaques 65
- numérotation des témoins 64

O

- option de chargement avancé 13

P

- paires de lignes 64
- paramètres d'analyse
 - mode autonome 24
 - mode BaseSpace 23
 - modifier les paramètres 23
- paramètres de configuration 53
- paramètres du système 12
- passant le filtre (PF) 60
- probabilité d'une erreur 61
- puce BeadChip
 - adaptateur 5, 31
 - chargement 33
 - échec de l'enregistrement 51
 - impossible de lire le code à barres 51
 - orientation du code à barres 31

R

- réactifs
 - fournis 6
 - mise au rebut adéquate 21
- réactifs usagés
 - mise au rebut 20, 39
 - réservoir plein 49
- Real-Time Analysis
 - flux de travail 58
 - mise en phase 59
- redémarrage 43
- redémarrage en mode recherche 12
- redémarrer
 - instrument 43
- réhybridation de primer 49
- réhybridation, lecture 1 49
- RTA2
 - gestion des erreurs 58
- RunInfo.xml 45, 63

S

- scores de qualité 61
- séquençage
 - consommables fournis par l'utilisateur 14
 - introduction 15
- service de copie d'analyse 26
- service de surveillance Illumina Proactive 54
- suivi RFID 6

T

transfert de données

données de balayage 35

icônes d'activité 26

service de copie d'analyse 26

Universal Copy Service 26

V

vérification avant analyse 24, 33

W

Windows

quitter 43

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	00806 65 1752	
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®