

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

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

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

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

© 2018 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

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

Historique des révisions

Document	Date	Description des modifications
Support n° 20023569 Document n° 15050091 v07	Mars 2018	Ajout de renseignements sur le service de surveillance Illumina Proactive à la section Afficher et envoyer les données de l'instrument.
Support n° 20023569 Document n° 15050091 v06	Octobre 2017	Mise à jour des descriptions du logiciel de contrôle HiSeq Control Software HD v3.5, disposant de l'indexage double. Mise à jour des renseignements relatifs aux réactifs : remplacement de HP12 par HP14 et de PLM2 par PLM2 v2.
Document n° 15050091 v05	Octobre 2017	Version non utilisée.
Support n° 20015568 Document n° 15050091 v04	Janvier 2017	Mise à jour des procédures de lavage de maintenance. Mise à jour du nom du logiciel de contrôle : HiSeq Control Software HD v3.4. Mise à jour du n° de référence Illumina concernant la trousse de réhybridation multiprimers HiSeq X HD cBot : n° de référence GD-305-2001. Retrait de la solution Sigma-Aldrich (n° de référence SRE0076) pour la solution de lavage SeqClin.
Support n° 20013048 Document n° 15050091 v03	Septembre 2016	Ajout de Custom Protocol Selector à la section Ressources supplémentaires. Ajout de Sigma-Aldrich numéro de référence SRE0076 pour la solution de lavage SeqClin. Ajout d'une remarque concernant la fréquence approximative du renouvellement des tubes et des flacons de lavage. Mise à jour des instructions relatives au démarrage de l'instrument : <ul style="list-style-type: none"> • Le chargement du système doit se faire avant la connexion au système d'exploitation et non après. • Augmentation de la durée nécessaire à la configuration des dispositifs de l'instrument et à l'initialisation du lecteur DoNotEject, qui passe d'une à trois minutes. • Ajout d'une remarque : les disques durs doivent être vides pour un fonctionnement correct. Mise à jour des instructions relatives au formatage rapide : inclusion du lecteur de travail (S:\). Correction des instructions concernant l'accès au fichier journal.

Document	Date	Description des modifications
Support n° 20007156 Document n° 15050091 v02	Mai 2016	<p>Mise à jour des descriptions logicielles pour le logiciel HiSeq Control Software version 3.3.76 :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajout d'instructions pour les abonnés à BaseSpace Enterprise concernant la configuration d'un domaine. • Ajout de renseignements sur les indicateurs de capteurs : ceux-ci indiquent l'état du transfert des données de BaseSpace Sequence Hub. • Mise à jour des instructions relatives à l'échelonnage des analyses : inclusion de l'utilisation du bouton Pause (Interruption). <p>Renommage de BaseSpace, qui devient BaseSpace Sequence Hub.</p> <p>Ajout du <i>Guide du système cBot 2 (document n° 15065681)</i> comme référence pour la génération d'amplifiats.</p> <p>Retrait du nom d'utilisateur et du mot de passe par défaut nécessaires pour la connexion au système d'exploitation. Illumina recommande l'utilisation d'identifiants spécifiques au site.</p> <p>Retrait du numéro de référence pour ce guide.</p>
Support n° 20002066 Document n° 15050091 v01	Décembre 2015	<p>Ajout de la structure de dossier pour les fichiers de sortie et des renseignements sur le dossier d'analyse.</p> <p>Ajout de recommandations relatives au service de maintenance préventive annuelle.</p> <p>Correction des volumes attendus pour le lavage de maintenance.</p>

Document	Date	Description des modifications
N° 15050091 Rév. E	Juillet 2015	<p>Mise à jour des descriptions logicielles pour le logiciel HiSeq X Control version 3.3 :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mise à jour du protocole de lavage de maintenance. Un lavage au Tween 20 et au ProClin 300 remplace le lavage au NaOH en trois étapes. • Remplacement du type de Flow Cell HiSeq X HD v2 par la Flow Cell HiSeq X à l'écran Flow Cell Setup (Configuration de Flow Cell). • Ajout de renseignements relatifs à un indicateur de capteur affichant l'état du transfert des données pour le logiciel Run Copy Service. <p>Ajout d'instructions relatives à la préparation des réactifs et des primers de séquençage utilisés pour l'indexage et la resynthèse appariée.</p> <p>Ajout d'une section intitulée Différences de flux de travail pour Illumina SeqLab, qui décrit où trouver les instructions concernant la préparation des réactifs et le séquençage si vous utilisez Illumina SeqLab.</p> <p>Ajout des numéros de référence pour les trousse HiSeq X v2.5 et mise à jour du numéro de référence de la trousse de réhybridation.</p> <p>Mise à jour des instructions relatives à l'échelonnage des analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B.</p> <p>Remplacement des descriptions des paramètres du système par des instructions relatives à la personnalisation des paramètres du système.</p> <p>Déplacement des renseignements relatifs au dépannage à l'Annexe A et des renseignements concernant le logiciel Real-Time Analysis à l'Annexe B.</p> <p>Retrait des fichiers de décalage et des fichiers de mise en phase de la liste des résultats de séquençage. RTA2 ne génère plus ces fichiers.</p> <p>Retrait du <i>Guide d'aménagement du laboratoire et de préparation du site du système HiSeq X Five</i> (référence 15067045) de la section Ressources supplémentaires. Les renseignements concernant l'aménagement du laboratoire et la préparation du site des systèmes HiSeq X Ten, HiSeq X Five et Illumina SeqLab se trouvent dans le <i>Guide d'aménagement du laboratoire et de préparation du site du système HiSeq X</i> (document n° 15050093).</p>
N° 15050091 Rév. D	Janvier 2015	<p>Correction du nombre de définitions de bases inférieures à 0,6 permis lors des 25 premiers cycles, de 2 à 1.</p> <p>Mise à jour de la liste de trousse de réactifs HiSeq X : inclusion des trousse de réactifs HiSeq X Ten et des trousse de réactifs HiSeq X Five.</p> <p>Changement du nom de la trousse 20-pack en trousse 10-pack. (Seuls les noms ont changé, mais pas le contenu.)</p> <p>Ajout du <i>Guide d'aménagement du laboratoire et de préparation du site du système HiSeq X Five</i> (référence 15067045) à la section Ressources supplémentaires.</p>

Document	Date	Description des modifications
N° 15050091 Rév. C	Octobre 2014	<p>Mise à jour des descriptions logicielles pour le logiciel HiSeq X Control version 3.1 :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajout du type de Flow Cell HiSeq X HD v2 à l'écran Flow Cell Setup (Configuration de la Flow Cell). • Ajout de la possibilité d'effectuer un lavage de maintenance ou un lavage à l'eau après chaque analyse. Un lavage de maintenance est recommandé, mais n'est plus nécessaire après chaque analyse. Le remplacement des joints n'est plus obligatoire lors de chaque lavage de maintenance. Le remplacement des joints doit être effectué avant le lavage de maintenance requis tous les 10 jours. • Ajout de l'option de lavage des positions de réactifs SBS uniquement. • Retrait de l'identifiant de la trousse de réactifs d'indexage de l'écran Reagents (Réactifs). Les réactifs d'indexage sont emballés avec les réactifs appariés dans les trousse de réactifs HiSeq X HD. • Mise à jour de la commande Sequence (Séquencer) à l'écran de bienvenue. <p>Ajout de la remarque : une Flow Cell HiSeq X HD (v1) et une Flow Cell HiSeq X HD (v2) peuvent être séquencées simultanément comme Flow Cell A et Flow Cell B.</p> <p>Ajout de la remarque : il est nécessaire de spécifier un dossier de sortie, même en cas d'utilisation de BaseSpace pour le stockage et l'analyse.</p> <p>Ajout d'un rappel indiquant de retourner chaque flacon plusieurs fois avant de changer les bouchons et de charger les réactifs SBS.</p> <p>Mise à jour du numéro de référence des lingettes alcoolisées VWR. Nouveau numéro : 95041-714.</p> <p>Mise à jour de l'URL pour les fiches signalétiques (SDS) : support.illumina.com/sds.html.</p>
N° 15050091 Rév. B	Mai 2014	<p>Mise à jour des renseignements suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ajout de la description des amplifiats passant le filtre en fonction des caractéristiques d'une Flow Cell modélisée. • Ajout de la description du compartimentage par score de qualité. • Mise à jour de l'espace disque requis. • Ajout de la remarque : le temps d'attente pour l'initialisation des dispositifs de l'instrument est d'au moins une minute. • Ajout des meilleures pratiques pour réaliser un formatage rapide du lecteur O:\ après chaque analyse. • Correction de la référence du <i>Guide de référence de la trousse de réactifs HiSeq X HD</i> sur le diagramme de flux de travail pour 15050092.
N° 15050091 Rév. A	Mars 2014	Publication originale.

Table des matières

Historique des révisions	iii
Chapitre 1 Vue d'ensemble	1
Introduction	1
Ressources supplémentaires	2
Composants de l'instrument	2
Présentation des consommables pour le séquençage	7
Chapitre 2 Pour commencer	8
Démarrer le système HiSeq X	8
Personnaliser les paramètres du système	9
Afficher et envoyer les données de l'instrument	10
Consommables fournis par l'utilisateur	11
Chapitre 3 Préparation des réactifs	12
Introduction	12
Préparer les réactifs SBS	12
Préparer les réactifs d'indexage et appariés	13
Chapitre 4 Séquençage	14
Introduction	14
Flux de travail de séquençage	14
Saisir les paramètres de l'analyse	15
Charger et amorcer les réactifs	18
Charger la Flow Cell de séquençage	22
Surveiller l'analyse	24
Décharger les réactifs	25
Réaliser un lavage à l'eau	25
Formater rapidement le lecteur de sortie et le lecteur de travail	26
Chapitre 5 Maintenance	27
Introduction	27
Réaliser un lavage de maintenance	27
Laisser l'instrument inactif	32
Arrêter l'instrument	33
Annexe A Dépannage	34
Fichier journal	34
Problèmes possibles de configuration de l'analyse	34
Réaliser une vérification de la fluidique	35
Interrompre ou terminer une analyse sur le système HiSeq X	35
Échelonner les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B	36

Possible réhybridation du primer de lecture 1	37
Annexe B Real-Time Analysis	38
Présentation de Real-Time Analysis	38
Flux de travail de Real-Time Analysis	39
Annexe C Fichiers et dossiers de sortie	44
Fichiers de sortie de séquençage	44
Structure du dossier de sortie	45
Nom et chemin d'accès des dossiers de l'analyse	45
Numérotation des plaques	46
Index	47
Assistance technique	51

Chapitre 1 Vue d'ensemble

Introduction	1
Ressources supplémentaires	2
Composants de l'instrument	2
Présentation des consommables pour le séquençage	7

Introduction

Le système HiSeq X^{MD} associe une ingénierie innovante et la technologie SBS éprouvée avec la puissance de séquençage du génome humain entier à l'échelle d'une population.

Fonctionnalités

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

Différences de flux de travail pour Illumina SeqLab

Lors de l'utilisation du système HiSeq X comme composant d'Illumina SeqLab, Clarity LIMS X Edition présente des différences de flux de travail qui ne sont pas exposées dans ce guide. Toutes les étapes de la préparation de librairie au séquençage sont affectées. Consultez la page d'aide pour Illumina SeqLab sur le site Web d'Illumina afin de générer un guide du flux de travail personnalisé pour votre expérience.

Ressources supplémentaires

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

Ressource	Description
Custom Protocol Selector	Assistant pour la génération de la documentation personnalisée dans son intégralité en fonction de la méthode de préparation des bibliothèques, des paramètres d'analyse et de la méthode d'analyse utilisée pour le séquençage.
<i>Guide d'aménagement du laboratoire et de préparation du site du système HiSeq X (document n° 15050093)</i>	Fournit les spécifications relatives à l'espace du laboratoire, les exigences électriques et les considérations environnementales.
<i>Guide de sécurité et de conformité du système HiSeq X (document n° 15050094)</i>	Fournit des renseignements concernant l'étiquetage de l'instrument, les certifications de conformité et les questions de sécurité.

Consultez la [page d'aide du système HiSeq X 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. Pour obtenir des renseignements spécifiques à Illumina SeqLab, rendez-vous sur la page d'aide d'Illumina SeqLab.

Composants de l'instrument

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

Figure 1 Composants externes



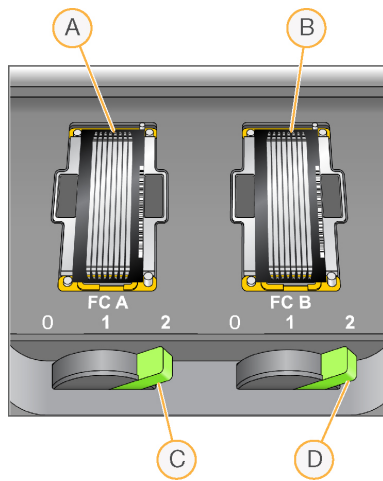
- A **Module optique** : contient les composants optiques qui permettent l'imagerie à double surface de la Flow Cell et l'imagerie simultanée de A, C, G et T en utilisant l'épifluorescence. Le faisceau laser d'excitation passe à travers l'objectif et la fluorescence est recueillie simultanément à travers le même objectif.
- B **Compartiment de Flow Cell** : contient la platine de Flow Cell commandée par dépression, qui maintient la Flow Cell en place pendant les analyses de séquençage.

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

Compartment de Flow Cell

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

Figure 2 Platine de Flow Cell avec deux Flow Cells



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

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

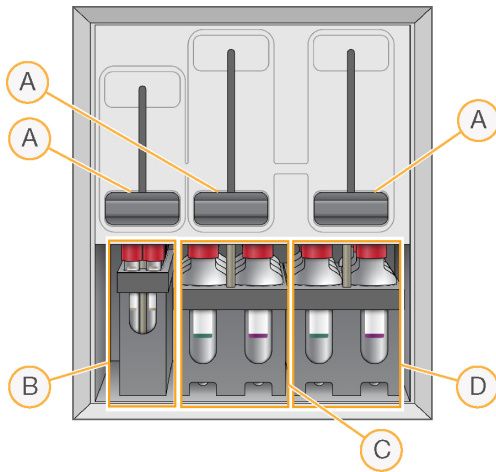
La Flow Cell est placée sur le portoir de Flow Cell avec les ports d'entrée et de sortie orientés vers le bas. La Flow Cell est maintenue en place grâce au système de décompression sous le portoir de Flow Cell. Le levier de Flow Cell éclairé en face de chaque portoir de Flow Cell commande cette dépression.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

Compartment de réactifs

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

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

Figure 3 Compartiment de réactifs



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






Logiciel HiSeq X

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

- ▶ **Logiciel de contrôle HiSeq X** : l'interface du logiciel de contrôle HiSeq Control Software HD vous guide tout au long des étapes de configuration d'une analyse de séquençage. Au cours de l'analyse, le logiciel de commande active le matériel de l'instrument, contrôle la fluidique, définit les températures et présente un récapitulatif visuel des statistiques de qualité.
- ▶ **Logiciel Real-Time Analysis** : intégré au logiciel de commande, le logiciel RTA effectue la définition des bases et associe un score de qualité à chaque base pour chaque cycle. Pour plus de renseignements, consultez la section *Real-Time Analysis*, page 38.
- ▶ **Logiciel Sequencing Analysis Viewer** : le visualiseur d'analyse de séquençage (SAV) fournit des statistiques détaillées de qualité.

Icônes d'état

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

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

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

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

Indicateurs d'activité et de capteurs

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

Figure 4 Indicateurs d'activité



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

Figure 5 Indicateurs de capteurs



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





État du transfert des données

La suite logicielle HiSeq X comprend Run Copy Service, qui gère le transfert des données vers le dossier de sortie. Une option BaseSpace permet d'envoyer les données sur l'état de l'instrument et sur le séquençage vers BaseSpace Sequence Hub.

Deux des indicateurs de capteur qui se trouvent sur l'interface du logiciel affichent l'état du transfert de Run Copy Service et BaseSpace Sequence Hub.




Run Copy Service



L'état de transfert de Run Copy Service affecte votre capacité à démarrer une nouvelle analyse ou à formater en toute sécurité le lecteur de sortie.

Icône d'état	Description
	Les données sont en cours de transfert. Ne formatez pas le lecteur de sortie avant que le transfert soit terminé.
	Les données sont en cours de transfert, mais la connexion au réseau est lente. Vous pouvez configurer une analyse de séquençage et formater le lecteur de sortie une fois le transfert terminé.
	Run Copy Service est inactif.
	Run Copy Service est actif, mais n'effectue aucun transfert de données.

BaseSpace Sequence Hub

Un indicateur de capteur BaseSpace affiche l'état de BaseSpace Sequence Hub. Un nuage bleu indique une connexion active. Un nuage gris indique que le logiciel ne peut pas se connecter. Le tableau suivant donne des détails supplémentaires concernant chaque icône d'état.

Icône d'état	Description
	Non connecté à BaseSpace Sequence Hub.
	Connecté à BaseSpace Sequence Hub, aucun transfert de données en cours.
	Connecté à BaseSpace Sequence Hub, transfert de données en cours pour quatre analyses au maximum.

Icône d'état	Description
	<p>Connecté à BaseSpace Sequence Hub, transfert de données en cours pour cinq analyses au minimum. Lorsque cette icône s'affiche, le logiciel de commande n'autorise aucune nouvelle analyse à se connecter à BaseSpace Sequence Hub.</p>
	<p>Déconnecté de BaseSpace Sequence Hub avec des données en file d'attente pour transfert.</p>

Présentation des consommables pour le séquençage

Les trousse de réactifs Illumina sont nécessaires pour le séquençage sur le système HiSeq X. Chaque trousse contient des réactifs de génération d'amplifiats utilisées sur le cBot ainsi que des réactifs SBS, des réactifs d'indexage et des réactifs appariés utilisés sur le HiSeq X.

- ▶ **Trousse Single-Pack** : chaque trousse comprend des consommables pour le séquençage de deux Flow Cells ou l'analyse d'une double Flow Cell. Les consommables sont emballés dans deux ensembles complets. Chaque ensemble prend en charge une Flow Cell.
- ▶ **Trousse 10-Pack** : chaque trousse comprend les consommables pour le séquençage de 20 Flow Cell ou 10 analyses d'une double Flow Cell. Les consommables sont emballés de façon à prendre en charge quatre Flow Cells à la fois.

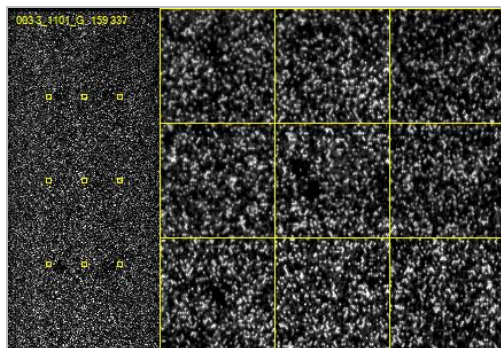
Nom de la trousse HiSeq X	N° de référence
Trousse de réactifs HiSeq X Ten v2.5 (300 cycles)	FC-501-2501
Trousse de réactifs HiSeq X Ten v2.5 (300 cycles), 10-pack	FC-501-2521
Trousse de réactifs HiSeq X Five v2.5 (300 cycles)	FC-502-2501
Trousse de réactifs HiSeq X Five v2.5 (300 cycles), 10-pack	FC-502-2521

Flow Cell structurée

Le HiSeq X utilise une Flow Cell structurée qui comporte des milliards de nanopuits ordonnés, creusés dans le verre de la Flow Cell. L'arrangement ordonné augmente le nombre de lectures de sortie et la quantité de données de séquençage générées.

La Flow Cell structurée est fournie dans la trousse de réactifs HiSeq X v2.5.

Figure 6 Exemple d'amplifiats sur une Flow Cell structurée



Chapitre 2 Pour commencer

Démarrer le système HiSeq X	8
Personnaliser les paramètres du système	9
Afficher et envoyer les données de l'instrument	10
Consommables fournis par l'utilisateur	11

Démarrer le système HiSeq X

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



REMARQUE

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

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

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

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

Personnaliser les paramètres du système

Le logiciel de commande comprend des paramètres de système personnalisables pour les dossiers d'analyse, les préférences LIMS et les domaines. La fenêtre Menu Options (Options du menu) dispose de paramètres pour définir le modèle d'identifiant d'analyse, des emplacements de dossiers par défaut, de l'envoi ou non des données concernant l'état de l'instrument, de l'authentification LIMS et des domaines BaseSpace Enterprise.

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

Définir les paramètres du dossier d'analyse

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



REMARQUE

Illumina recommande de placer les dossiers de sortie à un emplacement réseau. Vous pouvez toutefois indiquer un emplacement sur le lecteur O:\, à condition que l'emplacement soit différent de celui du dossier HiSeq Temp. N'utilisez pas le lecteur S:\ ni le lecteur C:\. Le lecteur S:\ est réservé aux opérations de l'instrument et le lecteur C:\ est trop petit.

- 4 Afin de paramétrer un emplacement pour les formulaires d'échantillons LIMS, saisissez un emplacement dans le champ **Run Setup Folder** (Dossier de configuration de l'analyse).
- 5 Cliquez sur **OK** pour enregistrer votre travail et fermer la fenêtre Menu Options (Options du menu). Cliquez sur **Cancel** (Annuler) pour fermer sans enregistrer.

Paramétrer les préférences LIMS

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

Configurer un domaine

Si vous avez souscrit à BaseSpace Enterprise, utilisez les instructions suivantes pour configurer votre domaine.

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Menu | Tools | Options** (Menu | Outils | Options) pour ouvrir la fenêtre Options.
- 2 Saisissez le domaine du serveur BaseSpace Sequence Hub.
- 3 Cliquez sur **OK** pour enregistrer votre travail et fermer la fenêtre Options. Cliquez sur **Cancel** (Annuler) pour fermer sans enregistrer.

Afficher et envoyer les données de l'instrument

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

- ▶ Pour afficher des renseignements sur le matériel de l'instrument, les versions de logiciels et les coordonnées de l'assistance technique, sélectionnez **Menu | About** (Menu | À propos).
- ▶ Sélectionnez **Menu | Tools | Options** (Menu | Outils | Options), puis sélectionnez **Send instrument health data to Illumina to help Illumina improve its products** (Envoyer les données sur l'état de l'instrument à Illumina pour l'aider à améliorer ses produits) pour activer le service de surveillance Illumina Proactive. Le nom du paramètre affiché dans l'interface du logiciel pourrait être différent du nom indiqué dans le présent guide, selon la version du logiciel de commande HiSeq utilisée.

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

Ce service :

- ▶ Ne transmet pas de données de séquençage.
- ▶ Nécessite la connexion de l'instrument à un réseau ayant accès à Internet.
- ▶ Est activé par défaut. Pour choisir de ne pas utiliser ce service, désactivez le paramètre **Send instrument health data to Illumina to help Illumina improve its products** (Envoyer les données sur l'état de l'instrument à Illumina pour l'aider à améliorer ses produits).



REMARQUE

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

Consommables fournis par l'utilisateur

Pour obtenir une liste complète des consommables fournis par l'utilisateur, consultez le *Guide d'aménagement du laboratoire et de préparation du site du système HiSeq X (document n° 15050093)*.

Consommable	Fournisseur	Utilisation
Tampons imbibés d'alcool isopropylique à 70 % ou éthanol à 70 %	Fournisseur de laboratoire général WWR, n° de référence 95041-714	Nettoyage de la Flow Cell et de la platine de Flow Cell.
Bonbonne, au moins six litres	Fournisseur de laboratoire général Corning, n° de référence 430776	Préparation de la solution de lavage de maintenance.
Gants, sans talc	Fournisseur de laboratoire général	Utilisation générale.
Tissu de laboratoire peu pelucheux	WWR, n° de référence 21905-026	Nettoyage du portoir de Flow Cell.
ProClin 300, 50 ml*	Sigma-Aldrich, n° de référence 48912-U	Lavage de maintenance.
Tubes de centrifugeuse, 250 ml	Fournisseur de laboratoire général Corning, n° de référence 430776	Lavage de l'instrument. Support de réactifs SBS, position contenant la solution PW1.
Tubes coniques, 15 ml	Fournisseur de laboratoire général Corning, n° de référence 430052	Collecte et mesure des volumes de déchets. Support de réactifs appariés, position contenant la solution PW1.
Tween 20, liquide visqueux, 100 ml	Sigma-Aldrich, n° de référence P7949	Lavage de maintenance.
Brucelles en plastique à bout carré	McMaster-Carr, n° de référence 7003A22	Retrait des joints de la Flow Cell.
Eau de laboratoire, 18 mégohms	Millipore	Lavage à l'eau. Supports de réactifs SBS et appariés, positions contenant du PW1.

* L'utilisation du ProClin 300 est limitée au diagnostic in vitro.

Chapitre 3 Préparation des réactifs

Introduction	12
Préparer les réactifs SBS	12
Préparer les réactifs d'indexage et appariés	13

Introduction

Avant de configurer l'analyse, préparez tous les réactifs pour le séquençage : réactifs SBS, réactifs d'indexage et réactifs appariés. Les instructions de préparation des réactifs sont identiques pour toutes les versions de trousse. Tous les réactifs sont chargés à la demande du logiciel au cours de la configuration de l'analyse. Il n'est pas nécessaire de revenir à l'instrument pendant l'analyse pour recharger.

Les réactifs de séquençage peuvent être préparés pendant la génération d'amplifiats. Pour des instructions relatives à la préparation de la Flow Cell et des réactifs d'amplifiats et à la génération d'amplifiats, consultez le *Guide du système cBot 2 (document n° 15065681)* ou le *Guide du système cBot (document n° 15006165)*.

Préparer les réactifs SBS

Utilisez les instructions suivantes pour décongeler et inspecter les réactifs SBS : PSM, PIM et PCM. Utilisez PB1 et PB2 directement à partir du stockage.

Préparez le nombre approprié de flacons de réactifs SBS.

Réactif	Pour une Flow Cell (Analyse de Flow Cell unique)	Pour deux Flow Cells (Analyse de double Flow Cell)	Pour quatre Flow Cells (Analyse de deux doubles Flow Cells)
PB1	1	2	4
PB2	3	6	12
PCM	1	2	4
PIM	1	2	4
PSM	1	2	4

Décongeler les réactifs SBS

- 1 Retirez quatre flacons de chacun des réactifs PSM, PIM et PCM de leur lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C.
- 2 Décongelez-les à une température comprise entre 2 °C et 8 °C pendant 16 heures environ. Vous pouvez aussi décongeler les réactifs PSM et PIM dans un bain d'eau désionisée à température ambiante pendant environ 90 minutes. Décongelez le PCM dans un bain d'eau **séparé**.



REMARQUE

Remplacez vos gants après avoir manipulé le PCM.

- 3 Retournez chaque flacon pour en mélanger le contenu.
- 4 Inspectez le réactif PSM pour vous assurer qu'il n'y a pas trace de tourbillons.
- 5 Réservez les réactifs PSM et PIM sur la glace.
- 6 Réservez **séparément** le réactif PCM sur la glace afin d'éviter la contamination croisée.

Préparer les réactifs d'indexage et appariés

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

Préparez le nombre approprié de tubes pour chaque réactif apparié et réactif d'indexage.

Réactif	Quantité pour une Flow Cell (Analyse de Flow Cell unique)	Quantité pour deux Flow Cells (Analyse de double Flow Cell)	Quantité pour quatre Flow Cells (Analyse de deux doubles Flow Cells)
PRM	1	2	4
PLM2 v2	1	2	4
PAM	1	2	4
PPM	1	2	4
PDR	1	2	4
HP11	1	2	4
HP14	1	2	4



AVERTISSEMENT

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

Décongeler les réactifs d'indexage et appariés

- 1 Retirez les réactifs suivants de leur lieu de stockage entre -25 °C et -15 °C : PRM, PLM2 v2, PAM, PPM, PDR, HP11 et HP14. Pour les bibliothèques non indexées, le réactif HP14 n'est pas requis.
- 2 Décongelez dans un bain d'eau désionisée à température ambiante pendant environ 20 minutes.
- 3 Réservez les réactifs PRM, PLM2 v2 et PAM sur la glace.

Préparer les réactifs PRM, PLM2 v2, PAM, PPM, PDR, HP11 et HP14

- 1 Retournez chaque tube pour en mélanger le contenu.
- 2 Centrifugez à 1 000 tr/min pendant une minute.
- 3 Réservez les réactifs PRM, PLM2 v2 et PAM sur la glace.
- 4 Réservez les réactifs PPM, PDR, HP11 et HP14 à température ambiante.

Chapitre 4 Séquençage

Introduction	14
Flux de travail de séquençage	14
Saisir les paramètres de l'analyse	15
Charger et amorcer les réactifs	18
Charger la Flow Cell de séquençage	22
Surveiller l'analyse	24
Décharger les réactifs	25
Réaliser un lavage à l'eau	25
Formater rapidement le lecteur de sortie et le lecteur de travail	26

Introduction

Pour effectuer une analyse sur le système HiSeq X, préparez tous les réactifs, puis suivez les invites du logiciel pour configurer l'analyse. Les étapes de configuration de l'analyse consistent à entrer les paramètres de l'analyse, à charger et amorcer les réactifs, à charger la Flow Cell et à procéder à une vérification du système fluide.

Les étapes de configuration de l'analyse sont organisées en trois onglets : Run Configuration (Configuration de l'analyse), Pre-Run Setup (Configuration avant analyse) et Initiate Run (Lancer l'analyse).

- ▶ Les écrans de configuration de l'analyse contiennent des listes déroulantes, des cases à cocher ou des champs de texte pour les paramètres de l'analyse. Utilisez le lecteur de code à barres portatif pour balayer l'identifiant de la Flow Cell ou de la trousse de réactifs, ou entrez l'identifiant à l'aide du clavier de l'écran tactile. L'icône du clavier est située à droite des champs de texte.
- ▶ Sélectionnez **Next** (Suivant) pour passer à l'écran suivant ou sélectionnez **Back** (Retour) pour revenir à l'écran précédent.
- ▶ Vous pouvez, à tout moment pendant les étapes de configuration de l'analyse, sélectionner **Cancel** (Annuler) pour abandonner la configuration de l'analyse et revenir à l'écran de bienvenue.

Pour de plus amples renseignements concernant la durée de l'analyse et d'autres caractéristiques de performance, consultez la page des spécifications du système HiSeq X sur le site Web d'Illumina.

Échelonner des analyses

Vous pouvez démarrer une nouvelle analyse sur la Flow Cell A ou sur la Flow Cell B lorsqu'une analyse est en cours sur la Flow Cell adjacente. Pour de plus amples renseignements, consultez la section [Échelonner les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B](#), page 36.

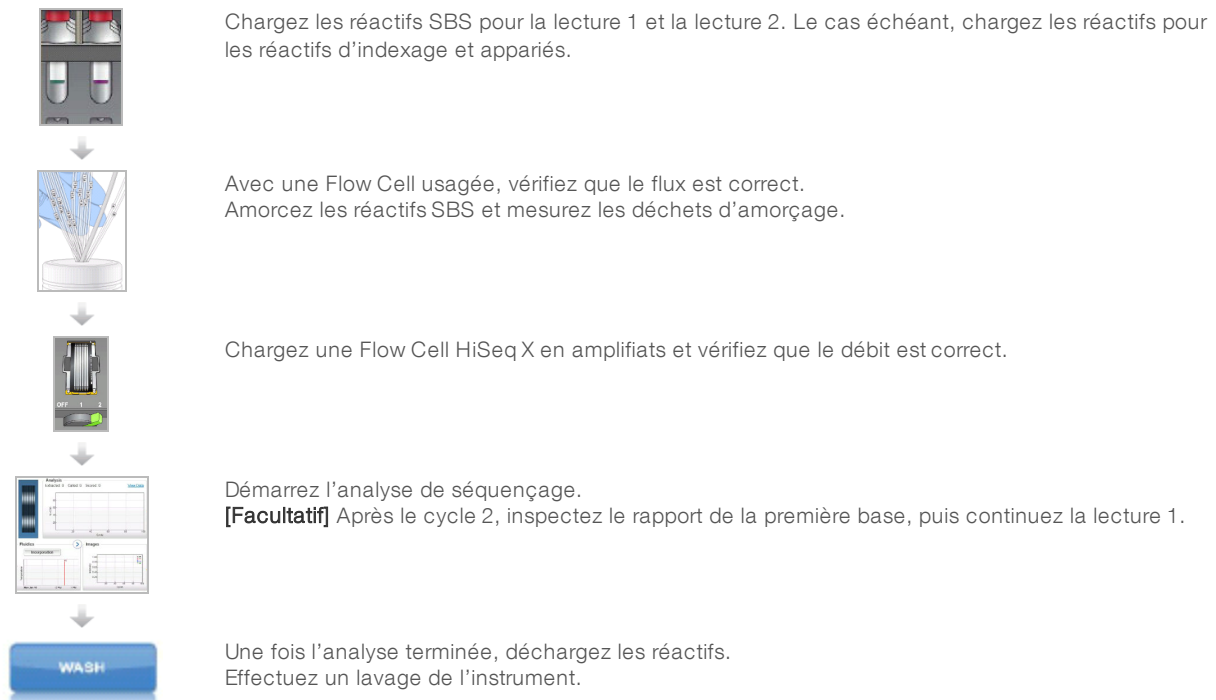
Flux de travail de séquençage



Préparez la Flow Cell et les réactifs pour l'analyse.



Saisissez les paramètres de l'analyse en suivant les indications de l'interface du logiciel de commande.



Saisir les paramètres de l'analyse

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

Écran Storage (Stockage)

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Sequence** (Séquencer) pour afficher l'écran Storage (Stockage).
- 2 **[Facultatif]** Effectuez la connexion à BaseSpace Sequence Hub de la façon suivante :
 - a Sélectionnez **Connect to BaseSpace** (Se connecter à BaseSpace).
 - b Sélectionnez l'une des options BaseSpace suivantes :
 - ▶ **Storage and Analysis** (Stockage et analyse) : envoie les données de l'analyse à BaseSpace Sequence Hub pour une surveillance à distance et une analyse des données. Cette option requiert une feuille d'échantillons.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Surveillance de l'analyse uniquement) : envoie uniquement les fichiers InterOp à BaseSpace Sequence Hub, ce qui vous permet de surveiller votre analyse à distance.
 - c Connectez-vous à BaseSpace Sequence Hub avec l'adresse électronique et le mot de passe de votre compte Myllumina.
- 3 Sélectionnez **Browse** (Parcourir) pour accéder à l'emplacement des dossiers de sortie choisi.
- 4 Vérifiez que le paramètre des miniatures est réglé sur **Save All Thumbnails** (Enregistrer toutes les miniatures).

Le logiciel enregistre automatiquement toutes les images miniatures. Une miniature consiste en un échantillon d'images provenant des nombreuses plaques de chaque colonne de plaques, ou témoin, combinées en une seule image.

- 5 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Flow Cell Setup (Configuration de la Flow Cell)

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

- 1 Numérisiez ou saisissez l'identifiant (numéro de code à barres) de la Flow Cell à séquencer.
- 2 Vérifiez que le type de Flow Cell est **HiSeq X** ou **HiSeq X HD**.



REMARQUE

Une Flow Cell HiSeq X et une Flow Cell HiSeq X HD peuvent être séquencées simultanément comme Flow Cell A et Flow Cell B.

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

Écran Advanced (Paramètres avancés)

- 1 **[Facultatif]** Cochez la case **Confirm First Base** (Confirmer la première base).
Un rapport de la première base est généré automatiquement pour chaque analyse après le cycle 2 et placé au niveau de la racine du dossier de l'analyse. En sélectionnant cette option, vous pouvez confirmer le rapport de la première base avant de procéder à l'analyse. Dans le cas contraire, l'analyse continue sans afficher la boîte de dialogue de confirmation.
- 2 **[Facultatif]** Sur l'image de la Flow Cell, sélectionnez les lignes à retirer de l'analyse.
Toutes les lignes sont incluses par défaut. L'alignement PhiX s'exécute automatiquement pour toutes les lignes.



REMARQUE

Vous n'avez pas besoin d'une ligne de contrôle dédiée, elle est facultative.

- 3 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Recipe (Formule)

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

- 1 Sélectionnez une option Index Type (Type d'index) :
 - ▶ **No Index** (sans index) : effectue une analyse à lecture appariée sans index.
 - ▶ **Single Index** (Un seul index) : effectue une analyse à lecture appariée avec lecture d'indexage de 8 pb.
 - ▶ **Dual Index** (Index double) : effectue une analyse à lecture appariée avec deux lectures d'indexage de 8 pb.

Les champs restants sont automatiquement remplis en fonction du type d'index sélectionné.

- 2 Confirmez les paramètres automatiquement remplis :
 - ▶ Cycles : **151** pour la lecture 1 et la lecture 2, et **8** ou **0** pour l'index 1 et l'index 2, soit le nombre de cycles pour chaque lecture de séquençage et d'indexage.
 - ▶ SBS : **HiSeq X SBS** : la chimie SBS utilisée pour la lecture 1 et la lecture 2.
 - ▶ Index : **HiSeq X Sequencing Primer (primer de séquençage HiSeq X)** ou **HiSeq X Dual Index Sequencing Primer** (primer de séquençage à index double HiSeq X) : la chimie utilisée pour les lectures d'index 1 et 2, le cas échéant.
 - ▶ PE turnaround (Traitement apparié) : **HiSeq X PE (chimie appariée HiSeq X PE)** ou **HiSeq X PE Dual Index (chimie appariée HiSeq X à index double)** : indique la chimie utilisée pour la resynthèse appariée.

Écran Sample Sheet (Feuille d'échantillons)

Les feuilles d'échantillons sont facultatives, sauf si vous utilisez BaseSpace Sequence Hub pour effectuer l'analyse des données.

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

Écran Reagents (Réactifs)

L'écran Reagents (Réactifs) consigne des renseignements sur la trousse de réactifs utilisée pour votre analyse.

- 1 Dans le champ SBS Reagent Kit ID (Identifiant de la trousse de réactifs SBS), numérisez ou entrez le code à barres identifiant la trousse de réactifs à partir des boîtes des troussees SBS suivantes :
 - ▶ **Trousse Single-Pack** : boîte de la trousse de réactifs SBS n° 1 ou 2
 - ▶ **Trousse 10-Pack** : boîtes de la trousse de réactifs SBS A à F
- 2 Dans le champ PE Reagent Kit ID (Identifiant de la trousse de réactifs appariés), numérisez ou saisissez l'identifiant du code à barres de la trousse de réactifs appariés à partir d'une boîte de troussees d'amplifiats appariés :
 - ▶ **Trousse Single-Pack** : boîte de la trousse d'amplifiats appariés n° 2
 - ▶ **Trousse 10-Pack** : boîte de la trousse d'amplifiats appariés C
- 3 Sélectionnez **300 Cycles**.
Le champ « Cycles remaining » (Cycles restants) est défini sur 325 par défaut.



REMARQUE

Le logiciel effectue un compte à rebours du nombre de cycles saisi dans le champ Cycles Remaining (Cycles restants). Lorsqu'il reste peu de cycles, le logiciel vous invite à charger de nouveaux réactifs.

- 4 Sélectionnez **Prime SBS Reagents** (Amorcer les réactifs SBS) pour amorcer les réactifs.
Amorcez toujours les réactifs **avant** de charger une Flow Cell en amplifiats.
- 5 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Écran Review (Révision)

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

Charger et amorcer les réactifs

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

Charger les réactifs SBS

- 1 Retournez chaque flacon pour en mélanger le contenu.



ATTENTION

Mélangez et chargez le réactif PCM en dernier, une fois tous les autres réactifs chargés, afin d'éviter toute contamination croisée. Jetez systématiquement vos gants et prenez-en une nouvelle paire après avoir manipulé le PCM.

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

Tableau 1 Positions des réactifs SBS

Position	Réactif	Description
1	PIM	Mélange d'incorporation pour Flow Cell structurée
2	PW1	25 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire
3	PSM	Mélange de balayage pour Flow Cell structurée
4	PB1	Tampon SBS pour Flow Cell structurée 1
5	PB2	Tampon SBS pour Flow Cell structurée 2
6	PB2	Tampon SBS pour Flow Cell structurée 2
7	PCM	Mélange de clivage pour Flow Cell structurée
8	PB2	Tampon SBS pour Flow Cell structurée 2

- 7 Enfilez une nouvelle paire de gants en latex sans talc.
- 8 Faites glisser le support dans le compartiment de réactifs, en alignant le support sur le guide surélevé sur le plancher du compartiment.
- 9 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les flacons de réactifs SBS, comme suit :
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers vous, puis abaissez-la.
 - b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois abaissés dans les bouchons verseurs.
 - c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.

Charger les réactifs d'indexage et les réactifs appariés

- 1 Relevez les dispositifs d'aspiration du support de réactifs appariés, comme suit :
 - a Tirez la poignée vers vous, puis soulevez-la.
 - b Relâchez la poignée dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée soit bien fixée dans la fente.
- 2 Faites glisser le support de réactifs hors du compartiment de réactifs à l'aide de la poignée du support.
- 3 Chargez des tubes coniques de 15 ml contenant 10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire dans les positions 12, 18 et 19 du support apparié.
- 4 Retirez le bouchon des tubes de réactif et placez chaque tube dans le support, dans la position numérotée associée ou la couleur d'étiquette correspondante.

Tableau 2 Positions des réactifs appariés

Position	Réactif	Description
10	PRM	Mélange de resynthèse pour Flow Cell structurée
11	PLM2 v2	Mélange de linéarisation pour Flow Cell structurée 2
12	PW1	10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire
13	PAM	Mélange d'amplification pour Flow Cell structurée
14	PPM	Prémélange d'amplification pour Flow Cell structurée
15	PDR	Mélange de dénaturation pour Flow Cell structurée (contient du formamide)
16	HP11	Mélange de primer, lecture 2
17	HP14*	Mélange de primers de l'indexage
18	PW1	10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire
19	PW1	10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire

* HP14 n'est nécessaire que pour les analyses indexées. Si HP14 n'est pas utilisé, chargez un tube conique de 15 ml avec 10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire.

- 5 Faites glisser le support de réactifs dans le compartiment de réactifs, en alignant le support sur le guide surélevé du plancher du compartiment.
- 6 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les tubes de réactifs appariés, comme suit :
 - a Tirez la poignée vers vous, puis abaissez-la.
 - b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois plongés dans les tubes.
 - c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.
- 7 Cochez la case **PW1 (25 ml) loaded in Position 2** (PW1 [25 ml] chargé en position 2), puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Amorcer les réactifs

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



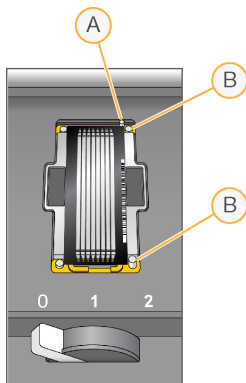
ATTENTION

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

Charger une Flow Cell d'amorçage

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

Figure 7 Flow Cell positionnée contre les broches de guidage supérieure et de droite



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

- 6 Retirez votre main de la Flow Cell afin d'éviter que l'alignement ne dévie.
- 7 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour engager la décompression et maintenir la Flow Cell.
Lorsque le levier de Flow Cell clignote en vert, la décompression est en cours. Si le voyant du levier n'est pas vert, consultez la section *Problèmes possibles de configuration de l'analyse*, page 34.
- 8 Attendez environ cinq secondes, puis placez lentement le levier de la Flow Cell en position 2.
Lorsque le levier de Flow Cell est vert et ne clignote plus, cela signifie que les collecteurs sont en place et que la Flow Cell est prête.

- Assurez-vous que la case **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) est cochée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Vérifier que le flux est correct

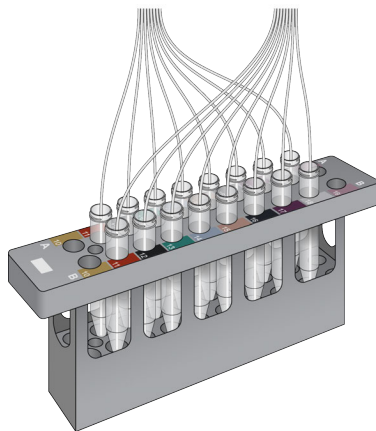
La vérification du flux confirme que la Flow Cell et les joints sont correctement installés et que le collecteur est engagé.

- Sélectionnez la position **2** dans la liste déroulante.
- Vérifiez les valeurs par défaut suivantes :
 - ▶ Volume : **125**
 - ▶ Taux d'aspiration : **250**
 - ▶ Taux de distribution : **2 000**
- Sélectionnez **Pump** (Pompe).
- Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
- Si trop de bulles sont présentes, procédez comme suit :
 - Vérifiez l'absence d'obstruction au niveau des joints.
 - Diminuez le taux d'aspiration à 100.
 - Pompez 125 µl d'eau supplémentaires vers la Flow Cell.
 - Si le problème persiste, retirez la Flow Cell, répétez les étapes de nettoyage, puis rechargez la Flow Cell.

Positionner les tubes et démarrer l'amorçage

- Retirez le tube d'évacuation de chaque Flow Cell du conteneur à déchets.

Figure 8 Positionner les tubes



- Placez chaque tube d'évacuation dans un tube vide distinct de 15 ml.
- Sélectionnez **Start Prime** (Démarrer l'amorçage). Surveillez la progression de l'amorçage à l'écran d'amorçage.
- Lorsque l'amorçage est terminé, mesurez les déchets et vérifiez que le volume de chaque tube est de **1,75 ml**. Si vous avez recueilli le volume des liquides d'amorçage dans un seul flacon pour chaque Flow Cell, vérifiez que le volume est de **14 ml**.
Les volumes sont calculés de la manière suivante :

- ▶ 250 µl pour chaque position SBS, sauf pour la position 2 ($250 \times 7 = 1,75$ ml)
 - ▶ 1,75 ml pour chaque ligne ($1,75 \times 8 = 14$ ml)
- 5 Remplacez le tube d'évacuation dans le conteneur à déchets.
 - 6 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Charger la Flow Cell de séquençage

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

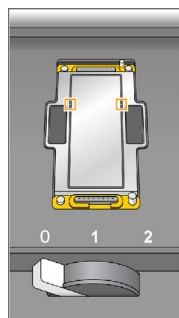
Retirer la Flow Cell usagée

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

Nettoyer le portoir de Flow Cell

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

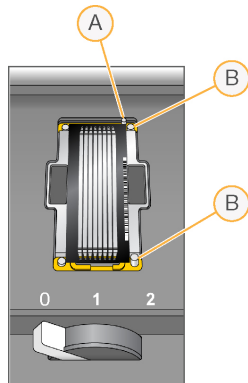
Figure 9 Inspecter les trous de décompression



Charger la Flow Cell de séquençage

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

Figure 10 Flow Cell positionnée contre les broches de guidage supérieure et de droite



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

- 3 Retirez votre main de la Flow Cell afin d'éviter que l'alignement ne dévie avec le temps.
- 4 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour engager la décompression et maintenir la Flow Cell.
Lorsque le levier de Flow Cell clignote en vert, la décompression est en cours. Si le voyant du levier n'est pas vert, consultez la section *Problèmes possibles de configuration de l'analyse*, page 34.
- 5 Attendez environ cinq secondes, puis placez lentement le levier de la Flow Cell en position 2.
Lorsque le levier de Flow Cell est vert et ne clignote plus, cela signifie que les collecteurs sont en place et que la Flow Cell est prête à être utilisée.
- 6 Assurez-vous que la case **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) est cochée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Vérifier que le flux est correct

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

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

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

Surveiller l'analyse

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

Figure 11 Écran Run Overview (Aperçu de l'analyse)



- A **Barre de progression** : surveillance du nombre de cycles terminés.
- B **Image de la Flow Cell** : surveillez les lignes imagées.
- C **Graphique de la fluidique** : développez la section de la fluidique pour surveiller les étapes de la chimie.
- D **Configuration de l'analyse** : contrôlez les paramètres de l'analyse actuelle.
- E **Graphique d'analyse** : contrôlez les scores de qualité par cycle.
- F **Graphique d'images** : contrôlez les intensités par cycle. Une miniature est affichée pour chaque témoin numérisé. Aucune autre image n'apparaît sur l'interface du logiciel.

Rapport de la première base

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

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

Afficher les indicateurs de l'analyse

Lorsque des indicateurs d'analyse sont disponibles, le Sequencing Analysis Viewer (SAV) s'ouvre automatiquement et les affiche. Les indicateurs apparaissent sous forme de tracés, de graphiques et de tableaux. Pour plus de renseignements, consultez le *Guide de l'utilisateur du logiciel SAV (document n° 15051736)*.

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

Décharger les réactifs

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



AVERTISSEMENT

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

Réaliser un lavage à l'eau

Un lavage à l'eau est requis après chaque analyse de séquençage afin de laver le système et de vérifier la fluidique. Le lavage de maintenance est une solution de remplacement facultative au lavage à l'eau après analyse. Pour obtenir des directives, consultez la section *Réaliser un lavage de maintenance*, page 27. Pour obtenir des instructions, consultez le Guide du système HiSeq X (document n° 15050091).

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

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



REMARQUE

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

- 4 Assurez-vous qu'une Flow Cell usagée est chargée. Si nécessaire, chargez une Flow Cell usagée.
- 5 Sélectionnez **Next** (Suivant).

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

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

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

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

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

Formater rapidement le lecteur de sortie et le lecteur de travail

Une fois le transfert des données terminé, effectuez un formatage rapide du lecteur de sortie (O:\) et du lecteur de travail (S:\). Un formatage rapide permet de nettoyer le lecteur pour une analyse ultérieure, sans supprimer les fichiers système ou les fichiers de maintenance de l'instrument.

Avant de pouvoir commencer une analyse, un espace minimum de 2 To est requis pour une analyse de double Flow Cell. Si l'espace disque descend sous le seuil de sécurité au cours d'une analyse, le logiciel interrompt l'analyse et met la Flow Cell en état de sécurité. L'analyse reprend automatiquement lorsqu'un espace disque suffisant est disponible.



REMARQUE

Les journaux de maintenance de l'instrument sont enregistrés sur le lecteur C:\. C'est pourquoi il n'est pas risqué de procéder à un formatage rapide des lecteurs O:\ et S:\ pendant un lavage de l'instrument.

- 1 Dans Windows, ouvrez Computer (Ordinateur) pour afficher la liste des lecteurs de l'ordinateur.
- 2 Faites un clic droit sur le lecteur O:\ et sélectionnez **Format** (Formater).
- 3 Dans la boîte de dialogue Format (Formater), cochez la case **Quick Format** (Formatage rapide).
- 4 Sélectionnez **Start** (Démarrer).
- 5 Répétez les étapes 1 à 4 pour effacer le contenu du lecteur S:\.

Chapitre 5 Maintenance

Introduction	27
Réaliser un lavage de maintenance	27
Laisser l'instrument inactif	32
Arrêter l'instrument	33

Introduction

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

- ▶ En vue des périodes d'inactivité, arrêtez l'instrument ou effectuez les étapes pertinentes de préparation à l'inactivité.
- ▶ En plus du lavage à l'eau effectué à la fin de chaque analyse, faites régulièrement des lavages de maintenance afin d'entretenir la fluidique.
Les lavages d'instruments réguliers maintiennent les performances de l'instrument en rinçant le système fluidique et en évitant l'accumulation de sel et la contamination croisée des réactifs.

Maintenance préventive

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

Réaliser un lavage de maintenance

Réalisez un lavage de maintenance lorsque vous y êtes invité par le logiciel tous les 10 jours ou facultativement après une analyse. Un lavage de maintenance dure près de 90 minutes et survient après l'un de deux flux de travail, selon la disponibilité de la solution ProClin 300 :

- ▶ **Lavage au Tween 20 et au ProClin 300** : lavage du système au moyen d'une solution de Tween 20 et de ProClin 300 préparée par l'utilisateur. Consultez la section *Lavage de maintenance au Tween 20 et au ProClin 300*, page 27.
- ▶ **Lavage au Tween 20** : lavage du système au moyen d'une solution de Tween 20 préparée par l'utilisateur; un lavage à l'eau peut être nécessaire. Consultez la section *Lavage de maintenance au Tween 20*, page 30.

Lorsque l'écran Load Gasket (Charger les joints) s'affiche avant un lavage de maintenance, les joints du collecteur avant et du collecteur arrière doivent être remplacés avant de lancer le lavage.

Lavage de maintenance au Tween 20 et au ProClin 300

Préparer la solution de lavage de maintenance

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

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

- 1 Combinez les volumes suivants pour diluer le Tween 20, en ajoutant d'abord l'eau :
 - ▶ Eau de laboratoire (225 ml)
 - ▶ Tween 20 (25 ml)

Ces volumes permettent d'obtenir une solution de Tween 20 à 10 % environ.

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

Tween 20 et ProClin 300

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Wash | Maintenance** (Lavage | Maintenance).
- 2 Si vous utilisez une nouvelle solution de lavage de maintenance, chargez la solution dans l'instrument comme suit :
 - a Remplissez huit flacons SBS de 250 ml de nouvelle solution de lavage.
 - b Remplissez 10 tubes appariés de 12 ml de nouvelle solution de lavage.
 - c Attribuez une position du support de réactifs à chaque flacon et à chaque tube. Conservez ces positions pour chaque lavage ultérieur afin d'éviter toute contamination croisée par le réactif présent sur les dispositifs d'aspiration.
- 3 Si vous avez stocké une solution de lavage de maintenance issue d'une analyse précédente, chargez la solution dans l'instrument comme suit :
 - a Remplissez les flacons et les tubes de la solution stockée et renversez-les pour la mélanger. Ne réutilisez la solution stockée que deux fois au maximum après la première utilisation.
 - b Chargez les flacons et les tubes dans les positions du support de réactifs qui leur sont attribuées.

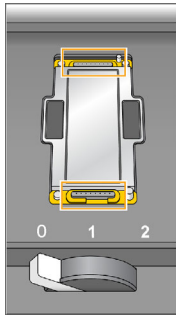


REMARQUE

Généralement, le remplacement mensuel des tubes et des flacons de lavage est suffisant.

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

Figure 12 Retrait des joints de collecteur usagés



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

Positions	Volume distribué
Huit positions SBS	74 ml
10 positions appariées	52 ml
Toutes les positions	15,75 ml par ligne



REMARQUE

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

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

Lavage de maintenance au Tween 20

Préparer la solution de lavage de maintenance

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

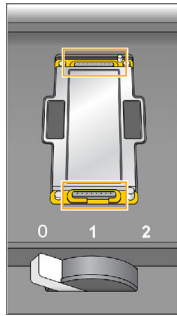
Éliminez la solution de lavage conformément aux normes de sécurité gouvernementales de votre région.

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

Lavage au Tween 20

- 1 À l'écran de bienvenue, sélectionnez **Wash | Maintenance** (Lavage | Maintenance).
- 2 Chargez une nouvelle solution de lavage de maintenance dans l'instrument, comme suit :
 - a Remplissez huit flacons SBS de 250 ml de nouvelle solution de lavage.
 - b Remplissez 10 tubes appariés de 12 ml de nouvelle solution de lavage.
- 3 Videz le flacon à déchets.
- 4 Sélectionnez **Next** (Suivant).
- 5 Retirez la Flow Cell de la platine de Flow Cell et mettez-la de côté.
- 6 Enfilez une nouvelle paire de gants en latex sans talc.
- 7 Appliquez une légère pression sur l'un des côtés du joint jusqu'à ce que l'autre côté se soulève. Utilisez des brucelles pour attraper et retirer le joint. Répétez l'opération pour retirer le joint arrière.

Figure 13 Retrait des joints de collecteur usagés



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

Positions	Volume distribué
Huit positions SBS	74 ml
10 positions appariées	52 ml
Toutes les positions	15,75 ml par ligne



REMARQUE

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

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

Lavage à l'eau

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

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



ATTENTION

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

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

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

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

Laisser l'instrument inactif

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

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

Arrêter l'instrument

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

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



ATTENTION

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

- 4 Chargez 10 ml d'eau de laboratoire dans chacune des positions dans les supports de réactifs, puis abaissez les dispositifs d'aspiration.
- 5 Mettez l'instrument hors tension.
- 6 Pour redémarrer l'instrument :
 - a Chargez de l'eau dans toutes les positions des réactifs.
 - b Allumez l'instrument.
 - c Réalisez un lavage à l'eau.

Annexe A Dépannage

Fichier journal	34
Problèmes possibles de configuration de l'analyse	34
Réaliser une vérification de la fluidique	35
Interrompre ou terminer une analyse sur le système HiSeq X	35
Échelonner les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B	36
Possible réhybridation du primer de lecture 1	37

Fichier journal

Le fichier journal répertorie toutes les erreurs qui se sont produites dans le logiciel de commande. Utilisez ce fichier à des fins de dépannage.

Pour accéder au fichier journal, sélectionnez **Menu | Tools | Show Log** (Menu | Outils | Afficher le journal) à l'écran de bienvenue.

Problèmes possibles de configuration de l'analyse

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

Réaliser une vérification de la fluidique

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

- 1 Sélectionnez **Check** (Vérifier) à l'écran de bienvenue.
- 2 Numérisez ou saisissez l'identifiant de lavage de la Flow Cell (numéro du code à barres) de la Flow Cell d'amorçage. Assurez-vous d'utiliser une Flow Cell **usagée** pour cette étape.
- 3 Chargez la Flow Cell usagée sur l'instrument.
- 4 Remplissez huit flacons SBS de solution PW1 ou d'eau de laboratoire, puis chargez-les dans le support de réactifs SBS.
- 5 Sélectionnez la solution 2 dans la liste déroulante.
- 6 Vérifiez les valeurs par défaut suivantes :
 - ▶ Volume : **250**
 - ▶ Taux d'aspiration : **250**
 - ▶ Taux de distribution : **2 000**
- 7 Sélectionnez **Pump** (Pompe).
- 8 Inspectez la Flow Cell à la recherche de bulles dans les lignes et de fuites à proximité des collecteurs.
- 9 Si trop de bulles sont présentes :
 - a Vérifiez l'absence d'obstructions au niveau des joints de collecteur.
 - b Diminuez le taux d'aspiration à 100.
 - c Pompez 250 µl d'eau supplémentaires vers la Flow Cell.

Interrompre ou terminer une analyse sur le système HiSeq X

Terminer une analyse ne fournit pas l'option d'enregistrer les données ou de reprendre l'analyse. Interrompre une analyse peut être nécessaire pour vérifier les composants d'une analyse ou pour configurer une analyse sur la Flow Cell adjacente.

Interrompre une analyse

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

RTA2 reprend automatiquement une analyse interrompue : celle-ci reprend donc sans perte de données. Pour plus de renseignements, consultez la section *Real-Time Analysis*, page 38.

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

Changer les réactifs en cours d'analyse

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



REMARQUE

L'amorçage n'est pas nécessaire.

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

Terminer une analyse

Si RTA2 est arrêté, le logiciel ne reprend pas le traitement, et les données de l'analyse ne sont pas enregistrées. Une analyse ne peut donc pas reprendre une fois arrêtée.



ATTENTION

Terminer une analyse sur le système HiSeq X est une action *définitive*.

- 1 Pour terminer l'analyse, sélectionnez **Abort** (Abandonner). Confirmez ou annulez cette commande.
- 2 Confirmer la commande d'abandon vous ramènera à l'écran de bienvenue.
- 3 Passez aux procédures après analyse.



REMARQUE

Si une analyse est arrêtée au moment de la lecture 1, il est possible d'effectuer une réhybridation de primer sur le système cBot. Après la réhybridation de primer, démarrez une nouvelle analyse sur le système HiSeq X pour lancer le séquençage de la Flow Cell.

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

- 1 Sélectionnez **Pause | Normal Pause** (Interruption | Interruption normale).
- 2 Attendez que le logiciel ait terminé l'étape de chimie ou d'imagerie en cours.
Le système est automatiquement placé en état de sécurité.
- 3 Vérifiez que l'analyse a bien été interrompue.
Lorsqu'une analyse est interrompue, le bouton Resume (Reprendre) est affiché.
- 4 Configurez la nouvelle analyse.
- 5 Une fois le chargement de la nouvelle Flow Cell effectué pour la nouvelle analyse, fermez la porte du compartiment.

- 6 Sélectionnez **Start** (Démarrer) pour lancer la nouvelle analyse.
- 7 Sur la Flow Cell adjacente, sélectionnez **Resume** (Reprendre) pour reprendre l'analyse interrompue.
Le logiciel commande automatiquement les processus de chimie et d'imagerie sur les deux Flow Cell.

Possible réhybridation du primer de lecture 1

Si les indicateurs de lecture 1 montrent des nombres d'amplifiats faibles, des intensités faibles ou tout autre problème, vous pouvez effectuer une réhybridation du primer de lecture 1 pour préserver la Flow Cell. La réhybridation du primer de lecture 1 est effectuée sur le cBot et n'endommage pas les amplifiats présents sur la Flow Cell.

L'hybridation du primer de lecture 1 réalisée sur une Flow Cell modélisée HiSeq X nécessite les consommables Illumina suivants :

- ▶ Trousse de réhybridation multiprimers HiSeq X HD cBot (n° de référence GD-305-2001)
- ▶ Collecteur HiSeq cBot (n° de référence SY-401-2015)

Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Réhybridation du primer de lecture 1 sur une Flow Cell HiSeq X (document n° 15053711)*.

Annexe B Real-Time Analysis

Présentation de Real-Time Analysis	38
Flux de travail de Real-Time Analysis	39

Présentation de Real-Time Analysis

Le système HiSeq X utilise une version du logiciel Real-Time Analysis 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; ainsi, les champs de l'onglet Index du logiciel SAV (Sequencing Analysis Viewer) ne sont pas remplis.

Fichiers d'entrée

RTA2 requiert les fichiers d'entrée suivants :

- ▶ Les images des plaques contenues dans la mémoire locale du système.
- ▶ RunInfo.xml, que le logiciel de commande génère automatiquement au début de chaque analyse. À partir de ce fichier, RTA2 lit le nom de l'analyse, le nombre de cycles, vérifie si une lecture est indexée et lit le nombre de plaques sur la Flow Cell.
- ▶ RTA.exe.config, qui est un fichier de configuration logicielle au format XML.

RTA2 reçoit des commandes du logiciel de commande comprenant des renseignements sur l'emplacement du fichier RunInfo.xml et en cas d'indication d'un dossier de sortie facultatif.

Fichiers de sortie

Les images de chaque canal passent de la mémoire à RTA2 sous forme de plaques. À partir de ces images, RTA2 produit des fichiers primaires qui prennent la forme d'un ensemble de fichiers de définition des bases dont la qualité est notée et de fichiers de filtrage. Les autres fichiers prennent en charge la génération de fichiers de sortie primaires.

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

Les fichiers de sortie primaires sont utilisés pour l'analyse des données ultérieure. Utilisez le logiciel de conversion bcl2fastq pour le démultiplexage et la conversion FASTQ. Pour convertir des données à partir du système HiSeq X, utilisez bcl2fastq v2.14.03.07 ou une version supérieure. Pour obtenir la version actuelle du logiciel ainsi que des renseignements sur le téléchargement, consultez la page d'aide du système HiSeq X sur le site Web d'Illumina.

RTA2 fournit des indicateurs en temps réel sur la qualité de l'analyse, stockés dans des fichiers InterOp. Il s'agit de fichiers binaires regroupant les mesures relatives aux plaques et aux cycles ainsi que les mesures réalisées lors des lectures. Ces fichiers sont nécessaires pour afficher les mesures dans Sequencing Analysis Viewer. Pour afficher les indicateurs générés par RTA2, utilisez le logiciel SAV v1.8.37 ou une version supérieure.

Pour obtenir des détails sur chaque fichier de sortie, consultez la section *Fichiers de sortie de séquençage*, page 44.

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.
- ▶ *LaneNLog*.tsv répertorie les événements relatifs au traitement de chaque ligne.
- ▶ *Error*.tsv répertorie les erreurs survenues au cours d'une analyse.
- ▶ *WarningLog*.tsv répertorie les avertissements reçus au cours d'une analyse.

Transfert de données

Tout au long de l'analyse, RTA2 requiert un transfert de données de Run Copy Service, le logiciel qui gère le transfert vers l'emplacement du dossier de sortie spécifié. Si BaseSpace Sequence Hub est utilisé, le BaseSpace Broker gère le transfert des données vers BaseSpace Sequence Hub. En cas de coupure de la connexion réseau, RTA2 poursuit le traitement et écrit les données localement. Le transfert de données reprend lorsque la connexion est restaurée.

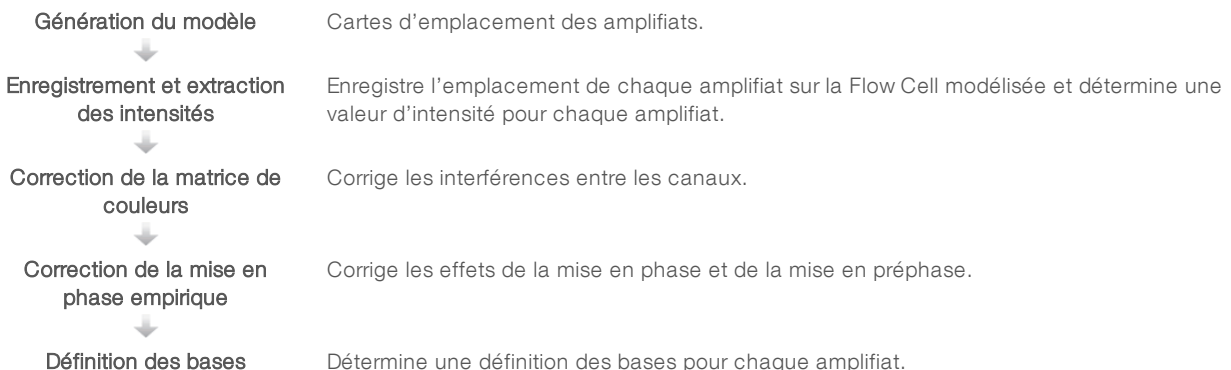


REMARQUE

Assurez-vous que votre connexion réseau correspond aux exigences minimales requises pour le transfert de données d'analyse vers BaseSpace Sequence Hub. Pour obtenir plus de renseignements, consultez le guide de préparation du site et d'aménagement du laboratoire.

Une fois le traitement terminé, RTA2 crée un fichier de marqueur nommé RTAComplete.txt. Le transfert de données s'achève après la création de ce fichier. Un indicateur de capteur affiche l'état du transfert au bas de l'écran. Pour obtenir des détails, consultez la section *Indicateurs d'activité et de capteurs*, page 5.

Flux de travail de Real-Time Analysis



**Notation de la qualité**

Attribue un score de qualité à chaque définition des bases.

Génération du modèle

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

En raison du réseau de la Flow Cell structurée, les positions de l'amplifiat sont préétablies en fonction du nombre de rangées et de colonnes, ainsi que de la distance entre les nanopuits. Pour obtenir plus de renseignements, consultez la section *Flow Cell structurée*, page 7.

Les positions des amplifiats de la totalité de l'analyse s'inscrivent dans un même fichier d'emplacement des amplifiats (s.locs).

Enregistrement et extraction des intensités

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

- ▶ L'enregistrement transforme les modèles d'emplacement des amplifiats en l'emplacement sur l'image pour chacun des quatre canaux de couleur.
- ▶ L'extraction d'intensités détermine une valeur d'intensité pour chaque amplifiat du modèle pour une image donnée.

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

Correction de la matrice de couleurs

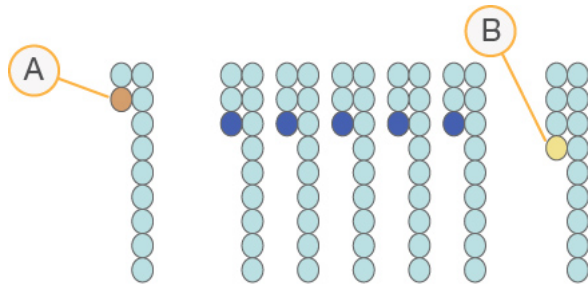
Après l'enregistrement et l'extraction de l'intensité, RTA2 corrige les interférences entre les canaux. Les interférences se produisent par exemple lorsqu'un amplifiat a une intensité dans le canal C, mais également dans le canal A. À l'aide d'une matrice de couleurs de 4 x 4, RTA2 génère des intensités corrigées par matrice avec interférences inexistantes ou faibles, puis équilibre les différences générales d'intensité entre les canaux de couleur.

Correction de la mise en phase empirique

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

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

Figure 14 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 à l'aide de l'algorithme de correction empirique de la mise en phase, qui optimise la qualité des données à chaque cycle tout au long de l'analyse.

Définition des bases

Après la correction des intensités brutes en termes d'interférence, de mise en phase et de mise en préphase, le canal dont l'intensité est la plus forte correspond à la définition pour cet amplifiat dans ce cycle. La définition des bases sur le système HiSeq X à l'aide de RTA2 commence après le cycle 3.

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

Amplifiats passant le filtre

Pendant les 25 premiers cycles de la lecture 1, le filtre de pureté supprime les amplifiats de mauvaise qualité des résultats d'analyse. Les amplifiats passent le filtre s'il n'existe pas plus d'une définition des bases présentant une valeur de pureté inférieure à 0,6 dans les 25 premiers cycles. La pureté est définie comme le rapport de l'intensité de base la plus brillante divisée par la somme de l'intensité de base la plus brillante et de la deuxième plus brillante. Dans les rapports d'analyse, on représente le pourcentage d'amplifiats passant le filtre par la mention « %PF ».

La Flow Cell HiSeq X modélisée produit un réseau ordonné d'amplifiats. Les puits vides ne contenant pas d'amplifiat et les puits polyclonaux, où plus d'une séquence est présente, sont inclus dans le décompte d'amplifiats bruts, mais ne passent pas le filtre. Le réseau ordonné sur une Flow Cell modélisée produit donc un pourcentage relativement faible d'amplifiats passant le filtre.

Figure 15 Puits vides et polyclonaux (compris dans le comptage d'amplifiats bruts)

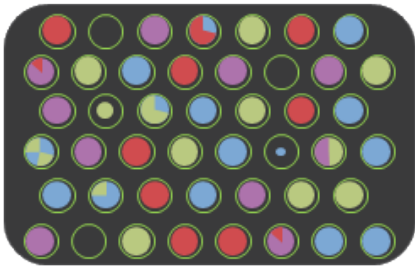
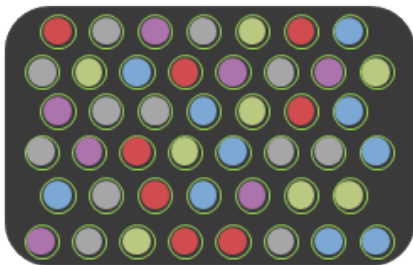


Figure 16 Puits contenant des amplifiats autres que PF (indiqués en gris)



Notation de la qualité

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

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

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



REMARQUE

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

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

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

Compartimentage par score de qualité

RTA2 regroupe les scores de qualité selon des plages ou compartiments spécifiques et attribue une valeur à chaque plage. Le compartimentage par score de qualité réduit considérablement les besoins en espace de stockage, sans affecter la précision ou le fonctionnement des applications en aval.

Le compartimentage par score de qualité contribue à l'efficacité des processus d'analyse et aux exigences en matière de transfert des données associées au haut débit du système HiSeq X. Les fichiers *.bcl générés sont plus petits, car les algorithmes de compression peuvent compresser le fichier de façon plus efficace. La quantité de données écrites sur l'ordinateur de l'instrument est réduite. Les données sont transférées à un emplacement réseau, ce qui permet de copier le fichier plus vite.

Annexe C Fichiers et dossiers de sortie

Fichiers de sortie de séquençage	44
Structure du dossier de sortie	45
Nom et chemin d'accès des dossiers de l'analyse	45
Numérotation des plaques	46

Fichiers de sortie de séquençage

Type de fichier	Description, emplacement et nom des fichiers
Fichiers de définition des bases	Chaque plaque analysée est incluse dans un fichier de définition des bases qui contient la définition des bases ainsi que le score de qualité encodé. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : pour chaque ligne, les fichiers sont enregistrés dans des dossiers par cycle. s_[Rainure]_[Plaque].bcl.gz , où la « Rainure » représente le numéro à un chiffre de la ligne et la « Plaque » représente le numéro à quatre chiffres de la plaque. Les fichiers de définition des bases sont compressés selon la méthode gzip.
Fichiers d'emplacement des amplifiats	Pour chaque plaque, un fichier d'emplacement des amplifiats contient les coordonnées XY de chaque amplifiat. Les fichiers d'emplacement des amplifiats sont le résultat de la génération du modèle. Data\Intensities : un fichier correspondant à l'analyse est enregistré dans le dossier Intensities. s.locs
Fichiers de filtrage	Les fichiers de filtrage spécifient si les amplifiats ont franchi les filtres. Les fichiers de filtrage sont générés au cycle 26 et portent sur 25 cycles de données. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X] : les fichiers sont enregistrés dans un dossier pour chaque rainure et chaque plaque. s_[ligne]_[plaque].filter
Fichiers InterOp	Les fichiers binaires sont utilisés pour le logiciel Sequencing Analysis Viewer. Les fichiers InterOp sont mis à jour tout au long de l'analyse. Dossier InterOp
Fichier de configuration de Real-Time Analysis	Créé au début de l'analyse, le fichier de configuration de Real-Time Analysis indique les paramètres de l'analyse. [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 indexée et le nombre de témoins et de plaques sur la Flow Cell. Le fichier de renseignements sur l'analyse est créé au début de l'analyse. [Dossier racine] RunInfo.xml
Fichiers des miniatures	Image miniature pour chaque canal et plaque dans chaque témoin à chaque cycle pendant l'imagerie. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1] (Vignettes\L00[X]\C[X.1]) : les fichiers sont stockés dans un seul dossier pour chaque ligne et un sous-dossier pour chaque cycle. s_[rainure]_[plaque]_[canal].jpg : la plaque est représentée par un nombre à quatre chiffres qui indique la surface, le témoin et la plaque. Consultez la section <i>Numérotation des plaques</i> , page 46.

Structure du dossier de sortie

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

 **Data**

 **Intensities**

 **BaseCalls**


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


 s.locs

 **Images**

 **Focus**


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

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

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

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

 **RTALogs** : fichiers journaux décrivant les événements de RTA2.

 **Thumbnail_Images** : miniatures des neuf emplacements d'un sous-ensemble de plaques, générées pour chaque cycle et pour chaque base.

 RTAConfiguration.xml

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

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

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

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

Exemple : 110114_SN106_0716_A90095ACXX

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

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

Numérotation des plaques

La Flow Cell HiSeq X modélisée est imagée en 96 plaques sur chaque ligne, en haut et en bas, pour chaque cycle. Chacune des huit lignes comporte deux témoins, et chaque témoin, 24 plaques. Les plaques sont numérotées en fonction de leur position.



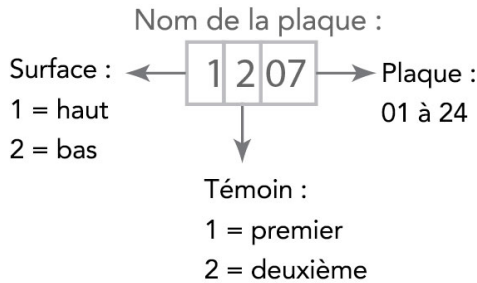
REMARQUE

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

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

- ▶ Le premier chiffre représente la surface :
 - ▶ 1 indique le haut
 - ▶ 2 indique le bas
- ▶ Le second chiffre représente le témoin :
 - ▶ 1 indique le premier témoin
 - ▶ 2 indique le deuxième témoin
- ▶ Les deux derniers chiffres, de 01 à 24, représentent la plaque. Le numérotage des plaques commence à 01 à la fin de la sortie de la Flow Cell et va jusqu'à 24 à la fin de l'entrée.

Figure 17 Numérotation des plaques



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

Index

%

% PF 41

A

aide

- documentation 2
- génération d'amplifiats 12
- Illumina SeqLab 1-2
- réhybridation du primer 37
- SAV 24

aide, technique 51

alertes

- descriptions 5
- résolution 5

algorithme Phred 42

alignement sur le PhiX 16

allumage de l'instrument 8

aménagement du laboratoire 2, 39

analyses adjacentes 36

applications, installées 4

assistance clientèle 51

assistance en ligne 2

assistance technique 51

attribution d'un nom

- analyses 16
- dossiers d'analyse 9, 45
- plaques 46

B

bain d'eau 12-13

barre d'état, couleurs 3

BaseSpace Broker 39

BaseSpace Enterprise 10

BaseSpace Sequence Hub

- configuration d'un domaine 10
- connexion d'une analyse 15
- feuilles d'échantillons 17
- icônes 6
- intégration 1
- transfert des données 39

bcl2fastq, version 38

bouchons verseurs 18

branchement des câbles USB 8

broches de guidage 20, 22

bulles 21, 23

C

câbles USB, branchement 8

capacité de stockage

- optimisation 43

capteurs 5

caractéristiques de performance 14

changer les réactifs en cours d'analyse 36

Clarity LIMS X Edition 1

compartiments 2

conformité 2

connexion réseau 39

consommables

- fournis par l'utilisateur 11
- Illumina 7

consommables de séquençage 7

contamination croisée, prévention 12, 28

conversion des données 38

conversion FASTQ 38

côté de la Flow Cell 3, 45

couleurs de la barre d'état 3

cycles par défaut 17

cycles restants 17

D

déchets d'amorçage 21

démultiplexage 38

dépannage de la lecture 1 37

documentation 2, 51

domaine, configuration 10

données

- compression 43
- conversion 38
- envoi à Illumina 10
- Illumina Proactive 10

dossiers de l'analyse, temporaires 45

dossiers de sortie

- emplacements 9, 15
- structure 45

dossiers temporaires 45

E

écran Run Overview (Aperçu de l'analyse) 24

emplacement des amplifiats 7

emplacement des dossiers 9, 45

emplacement des dossiers de l'analyse 45

- emplacement des dossiers par défaut 9
- emplacements des amplifiats 40
- emplacements des dossiers 45
- emplacements des fichiers 44-45
- enregistrement des identifiants de Flow Cell 16
- enregistrement des identifiants de la trousse de réactifs 17
- enregistrement des images miniatures 15
- enregistrement, dépannage 40
- erreurs 39
 - probabilité 42
- espace disque disponible 26
- espace disque requis 26
- étapes de chimie, surveillance 24
- étapes de séquençage, vue d'ensemble 14
 - RTA 39
- état du transfert des données
 - BaseSpace Sequence Hub 6
 - Run Copy Service 6

F

- fenêtre Menu Options (Options du menu) 9
- feuilles d'échantillons, exigences 17
- fichier de configuration 44
- fichier de renseignements sur l'analyse 44
- fichiers de définition des bases 41
- fichiers de marqueurs 39
- fichiers InterOp 39, 44
- fichiers journaux 44
- fichiers mémoire 38
- filtre de pureté 41
- Flow Cell
 - amorçage 20
 - imagerie 46
 - inspection 21, 23
 - positionnement 3, 20, 22
 - réseau d'amplifiats 40-41
 - structurée 7
- Flow Cell d'amorçage 20
- Flow Cell modélisée 40
- Flow Cell structurée 1, 7
- fluidique
 - maintenance 25
- fonctionnalités du matériel 1
- formules 16
- fuites 21, 23

G

- génération de formules 16

H

- HCS 4
 - journaux d'erreurs 34
 - navigation 14
 - options d'affichage 9
 - ouverture 8

I

- icônes 5
 - état du transfert des données 6
- icônes de Run Copy Service 6
- identifiant de la Flow Cell, enregistrement 16
- identifiant de la trousse de réactifs, enregistrement 17
- Illumina SeqLab 1-2
- images, enregistrement 15
- incorporation de la première base 24
- indexage des positions des réactifs 19
- indicateurs de capteur
 - BaseSpace Sequence Hub 6
 - Run Copy Service 6
- indicateurs de l'analyse 24, 39
- initialisation du logiciel 8
- initialisation du logiciel, dépannage 34
- installation, vérification de la fluidique 35
- intensités, surveillance 24
- interférences 40

J

- joints 27
- joints, dépannage 34
- journaux d'erreurs 34, 39

L

- lavage après analyse 25
- lavages
 - avantages 27
 - eau et maintenance 27
 - exigences du système 25
 - exigences système 27
 - solution de lavage de maintenance 27, 30
- lavages à l'eau
 - durée et fréquence 25
 - volumes distribués 26
- lavages de maintenance 27
 - fréquence 27

- réutilisation de la solution 27-28, 30
- volumes distribués 29, 31
- lecteur de sortie 26
- lecteur de travail 26
- levier de Flow Cell 3
 - clignotant 34
 - orange 34
- levier de Flow Cell clignotant 34
- levier de Flow Cell orange 34
- ligne de contrôle 16
- lignes
 - Flow Cell 16, 46
- LIMS
 - Illumina SeqLab 1
 - paramètres 9
 - serveur 9
- localisation des amplifiats 40
- logiciels
 - applications installées 4
 - dépannage 34
 - fonctionnalités 1

M

- maintenance préventive 27
- miniatures 15, 44
- mise en phase 40
- mise en préphase 40
- module optique 2

N

- nanopuits 7
- no-call (N) 41
- nom de l'expérience 16
- nombre de cycles
 - valeurs par défaut 17
- numéros de référence
 - collecteurs 37
 - consommables fournis par l'utilisateur 11
 - trousses de réactifs Illumina 7
 - trousses de réhybridation Illumina 37

O

- options d'indexage 16
- options d'interruption 35-36

P

- pages d'aide 2
- paramètres de l'analyse, révision 17
- paramètres de la chimie 16
- paramètres, logiciel 9
- performance, caractéristiques 14
- perte de données 36, 38
- PhiX
 - alignement 16
 - ligne de contrôle 16
- plaques 38, 46
- positionnement des Flow Cell 20, 22
- positions des réactifs
 - support PE 19
 - support SBS 18
- positions des réactifs appariés 19
- positions, réactifs
 - appariés 19
 - indexage 19
 - SBS 18
- préparation à l'inactivité, durée acceptable 32
- préparation de l'amorçage 21
- préparation du site 2, 39
- PSM, trace de tourbillons 12
- puits polyclonaux 41

Q

- qualité des amplifiats 41

R

- rapport de la première base 16
- rapports, incorporation de la première base 24
- réactifs
 - appariés 13
 - changer en cours d'analyse 36
 - indexage 13
 - manipulation après analyse 25
 - préparation 12
 - quantité par analyse 12-13
 - SBS 12
- réactifs, supports 3
- réactifs, trousses 7
- redémarrage de l'instrument 33
- réfrigérant pour réactifs, température 4
- réhybridation 36-37
- réseau d'amplifiats 41
- resynthèse de la lecture 2 13

réutilisation de la solution de lavage de
maintenance 28

RTA 4

RTA2

fichiers d'entrée 38

fin 38

fin d'une analyse 36

Run Copy Service 6, 39

lavages à l'eau 26
lavages de maintenance 29, 31

volumes distribués

amorçage 21

lavages à l'eau 26

lavages de maintenance 29, 31

S

SAV 4

documentation 24

fichiers InterOp 44

onglet Index 38

version 39

scanner de code à barres 14

schéma d'indexage 17

scores de qualité 42

surveillance 24

sécurité 2

service de surveillance Illumina Proactive 10

solution de lavage de maintenance 27, 30

stockage de la solution de lavage de
maintenance 27, 30

structure des dossiers 45

supports des réactifs 3

surveillance à distance 15

système de décompression 3

système fluidique 3

accès 3

dépannage 34-35

entretien 27

T

tableaux de qualité 42

témoins 15, 46

température, réfrigérant pour réactifs 4

trace de tourbillons 12

transfert des données 26, 39

trousses de réactifs 7

tube d'évacuation 21, 29, 31

V

valeurs d'intensité 40

vider l'espace disque 26

volumes attendus

amorçage 21

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
Taïwan	00806651752	
Autres pays	+44 1799 534000	

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

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



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Californie 92122 États-Unis

+(1) 800 809-ILMN (4566)

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

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Destiné à la recherche uniquement.

Ne pas utiliser dans le cadre d'examens diagnostiques.

© 2018 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

illumina®