

HiSeq 4000

Guide du système



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° 20015630 Document n° 15066496 v05	Mars 2018	Ajout de renseignements sur le service de surveillance Illumina Proactive à la section Afficher et envoyer les données de l'instrument. Mise à jour des renseignements sur les réactifs pour remplacer le HP12 par le HP14.
Support n° 20015630 Document n° 15066496 v04	Janvier 2017	Mise à jour des procédures de lavage de maintenance. Retrait de la solution Sigma-Aldrich (n° de référence SRE0076) pour la solution de lavage SeqClin. Mise à jour du nom du logiciel HiSeq Control Software HD v3.4.
Support n° 20013047 Document n° 15066496 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. Correction des descriptions des options du serveur BaseSpace.

Document	Date	Description des modifications
<p>Support n° 20007157 Document n° 15066496 v02</p>	<p>Mai 2016</p>	<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. • Mise à jour des instructions relatives à l'échelonnage des analyses : inclusion de l'utilisation du bouton Pause (Interruption). <p>Renommage de BaseSpace par BaseSpace Sequence Hub, et de BaseSpace Onsite par BaseSpace Onsite Sequence Hub.</p> <p>Ajout des renseignements suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les numéros de référence pour les trousseaux d'amplifiats. • Le <i>Guide du système cBot 2 (document n° 15065681)</i> comme référence pour la génération d'amplifiats. • La structure des dossiers pour les fichiers de sortie de séquençage ainsi que le nom et le chemin d'accès des dossiers de l'analyse. • Le dépannage pour la perte d'enregistrement lors de la lecture 1. • La recommandation relative au service de maintenance préventive annuelle. <p>Retrait des éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les tubes coniques autoportants et des embouts de pipettes de la liste des consommables fournis par l'utilisateur. • Le nom d'utilisateur et mot de passe par défaut nécessaires pour la connexion au système d'exploitation. Illumina recommande l'utilisation d'identifiants spécifiques au site. • Le numéro de référence pour ce guide. <p>Correction des éléments suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les instructions de préparation et de chargement des réactifs d'indexage et appariés pour une analyse à lecture unique. HRM n'est pas requis pour une analyse à lecture unique avec index simple. • Le nom du logiciel Real-Time Analysis utilisé sur l'instrument, qui passe de RTA v2 à RTA2.

Document	Date	Description des modifications
<p>Support n° 20000063 Document n° 15066496 v01</p>	<p>Août 2015</p>	<p>Mise à jour des descriptions logicielles pour le logiciel HiSeq Control Software version 3.3.52, qui intègre les fonctionnalités suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> • L'option de séquençage d'une Flow Cell à lecture unique. • L'option de connexion à BaseSpace Onsite. • Des indicateurs de capteur qui montrent l'état de transfert des données de Run Copy Service et de BaseSpace. <p>Renommage du champ PE Reagent Kit ID (Identifiant de la trousse de réactifs PE) de l'écran Reagents (Réactifs) par Cluster Kit ID (Identifiant de la trousse d'amplifiats).</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>Ajout d'une option permettant de définir un nombre personnalisé de cycles SBS à l'écran Reagents (Réactifs) et mise à jour des cycles restants par défaut.</p> <p>Ajout des renseignements suivants :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Les instructions de préparation de réactifs SBS, appariés et d'indexage. • Les instructions d'essuyer le portoir de Flow Cell avec une lingette imbibée d'eau avant de l'essuyer avec une lingette imbibée d'alcool. • La remarque relative à l'élimination de la solution de lavage de maintenance conformément aux normes gouvernementales locales. <p>Correction de la durée et des volumes attendus pour le lavage de maintenance.</p>
<p>N° 15066496 Rév. A</p>	<p>Février 2015</p>	<p>Publication originale.</p>

Table des matières

Historique des révisions	iii
Chapitre 1 Vue d'ensemble	1
Introduction	1
Ressources supplémentaires	1
Composants de l'instrument	2
Présentation des consommables pour le séquençage	7
Chapitre 2 Pour commencer	8
Démarrer le système HiSeq 4000	8
Personnaliser les paramètres du système	8
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	12
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	26
Formater rapidement le lecteur de sortie et le lecteur de travail	27
Chapitre 5 Maintenance	28
Introduction	28
Réaliser un lavage de maintenance	28
Laisser l'instrument inactif	33
Arrêter l'instrument	33
Annexe A Dépannage	35
Fichier journal	35
Problèmes possibles de configuration de l'analyse	35
Réaliser une vérification de la fluidique	36
Interrompre ou terminer une analyse sur le système HiSeq 4000	36
Échelonner les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B	38

Possible réhybridation du primer de lecture 1	38
Annexe B Real-Time Analysis	39
Présentation de Real-Time Analysis	39
Flux de travail de Real-Time Analysis	40
Annexe C Fichiers de sortie	45
Fichiers de sortie de séquençage	45
Structure du dossier de sortie	45
Numérotation des plaques	46
Index	48
Assistance technique	52

Chapitre 1 Vue d'ensemble

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

Introduction

Le système HiSeq^{MD} 4000 associe des techniques novatrices et des performances éprouvées afin de fournir un débit maximal et un coût minimal pour la génomique à l'échelle de la production.

Fonctionnalités

- ▶ **Imagerie à double surface** : le système HiSeq 4000 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.
- ▶ **Double Flow Cell** : le système HiSeq 4000 est un système à double Flow Cell, qui permet le séquençage d'une seule Flow Cell ou de deux Flow Cell avec des longueurs de séquence différentes simultanément.
- ▶ **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 ou BaseSpace Onsite Sequence Hub.

Ressources supplémentaires

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

Ressource	Description
Custom Protocol Selector	Assistant pour la génération de la documentation personnalisée dans son intégralité en fonction de la méthode de préparation des bibliothèques, des paramètres d'analyse et de la méthode d'analyse utilisée pour le séquençage.
<i>Guide de préparation du site des systèmes HiSeq 4000 et HiSeq 3000 (document n° 15066492)</i>	Fournit les spécifications relatives à l'espace du laboratoire, les exigences électriques et les considérations environnementales.
<i>Guide de sécurité et de conformité des systèmes HiSeq 4000 et HiSeq 3000 (document n° 15066491)</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 4000 sur le site Web d'Illumina pour accéder à la documentation, aux téléchargements de logiciels, à la formation en ligne et aux foires aux questions.

Composants de l'instrument

Le système HiSeq 4000 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 fluidique et le compartiment de réactifs. Une barre d'état éclairée indique l'état de fonctionnement de l'instrument.

Figure 1 Composants externes



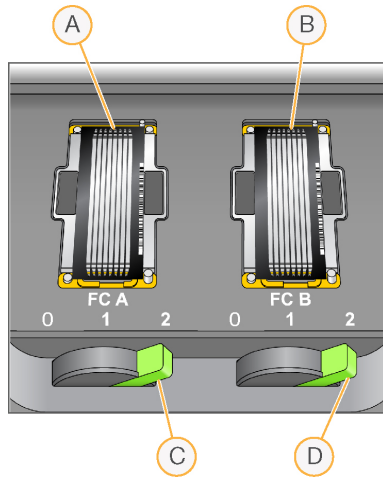
- A **Module optique** : contient les composants optiques qui permettent l'imagerie à double surface de la Flow Cell et l'imagerie simultanée de A, C, G et T en utilisant l'épifluorescence. Le faisceau laser d'excitation passe à travers l'objectif et la fluorescence est recueillie simultanément à travers 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 **Compartiment fluidique** : contient les pompes fluidiques qui envoient les réactifs à la Flow Cell, puis au conteneur à déchets.
- D **Barre d'état** : utilise trois couleurs comme indicateurs de l'état de l'instrument. Le bleu indique que l'instrument effectue une analyse, l'orange, qu'il nécessite une intervention, et le vert, que l'instrument est prêt à commencer l'analyse suivante.

- E **Compartment de réactifs** : contient les supports des réactifs requis pour les analyses de séquençage et la solution de lavage pour les lavages de l'instrument.

Compartment de Flow Cell

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

Figure 2 Platine de Flow Cell avec deux Flow Cells



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

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

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

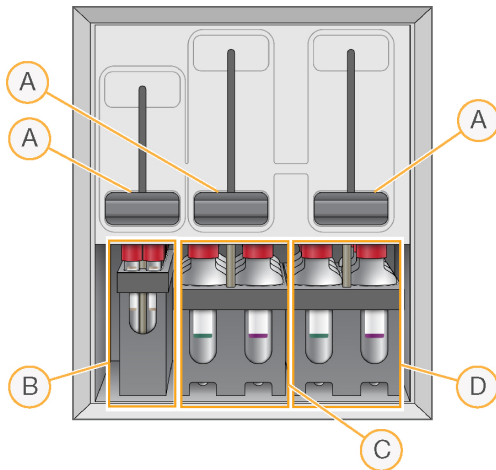
Compartment de réactifs

Le compartiment de réactifs est un 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 4000

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

- ▶ **Logiciel de commande HiSeq 4000** : l'interface du HiSeq Control Software HD v3.4 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 39.
- ▶ **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 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 ou BaseSpace Onsite 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.
	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.
	Déconnecté de BaseSpace Sequence Hub avec des données en file d'attente pour transfert.

Présentation des consommables pour le séquençage

Pour effectuer une analyse sur le système HiSeq 4000, vous devez disposer d'une trousse SBS HiSeq 3000/4000 et d'une trousse d'amplifiats. Les trousse d'amplifiats sont disponibles en version appariée (PE) ou à lecture unique (SR).

Nom de la trousse	N° de référence
Trousse SBS HiSeq 3000/4000 (300 cycles)	FC-410-1003
Trousse SBS HiSeq 3000/4000 (150 cycles)	FC-410-1002
Trousse SBS HiSeq 3000/4000 (50 cycles)	FC-410-1001
Trousse d'amplifiats à lecture appariée HiSeq 3000/4000	PE-410-1001
Trousse d'amplifiats à lecture unique HiSeq 3000/4000	GD-410-1001

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

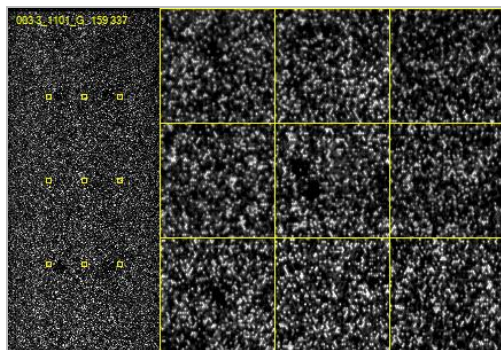
Les trousse d'amplifiats contiennent des réactifs de génération d'amplifiats utilisés sur le cBot, et des réactifs d'indexage et appariés utilisés sur HiSeq 4000. Chaque trousse d'amplifiats comprend une trousse d'accessoires avec des joints d'étanchéité de Flow Cell, des bouchons verseurs pour les flacons de réactifs SBS ainsi qu'un tube de stockage de Flow Cell.

Flow Cell structurée

Le HiSeq 4000 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 d'amplifiats HiSeq 3000/4000.

Figure 6 Exemple d'amplifiats sur une Flow Cell structurée



Chapitre 2 Pour commencer

Démarrer le système HiSeq 4000	8
Personnaliser les paramètres du système	8
Afficher et envoyer les données de l'instrument	10
Consommables fournis par l'utilisateur	11

Démarrer le système HiSeq 4000

- 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 Sélectionnez une option du serveur BaseSpace :
 - ▶ **Cloud** : connectez-vous à votre domaine BaseSpace Sequence Hub.
 - ▶ **Onsite** : connectez-vous à votre domaine BaseSpace Onsite Sequence Hub.
- 3 Entrez le domaine pour le serveur sélectionné.
- 4 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

Consommable	Fournisseur	Utilisation
Tampons imbibés d'alcool isopropylique à 70 % ou Éthanol à 70 %	VWR, n° de référence 95041-714 Fournisseur de laboratoire général	Nettoyage de la Flow Cell et de la platine de Flow Cell.
Bonbonne, au moins six litres	Fournisseur de laboratoire général	Préparation de la solution de lavage de maintenance.
Tubes pour centrifugeuse, 250 ml	Coming, n° de référence 430776	Supports de réactifs SBS, positions contenant la solution PW1. Lavage de l'instrument.
Tubes coniques, 15 ml	Coming, n° de référence 430052	Supports de réactifs appariés, positions contenant la solution PW1. Lavage de l'instrument. Collecte et mesure des volumes de déchets.
Gants jetables sans talc	Fournisseur de laboratoire général	Utilisation générale.
Tissu de laboratoire peu pelucheux	VWR, n° de référence 21905-026	Nettoyage du portoir de Flow Cell.
Papier pour lentilles, 10,1 × 15,2 cm (4 × 6 po)	VWR, n° de référence 52846-001	Nettoyage de la Flow Cell.
ProClin 300, 50 ml	Sigma-Aldrich, n° de référence 48912-U	Lavage de maintenance.
Tween 20, liquide visqueux, 100 ml	Sigma-Aldrich, n° de référence P7949	Lavage de maintenance.
Brucelles en plastique à bout carré	McMaster-Carr, n° de référence 7003A22	Retrait des joints de la Flow Cell.
Eau de laboratoire, 18 mégohms	Millipore	Supports de réactifs SBS et appariés, positions contenant la solution PW1. Lavage de l'instrument.

Chapitre 3 Préparation des réactifs

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

Introduction

Avant de configurer l'analyse, préparez tous les réactifs pour le séquençage : réactifs SBS, réactifs d'indexage et réactifs appariés. 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.

Préparer les réactifs SBS

Les réactifs SBS sont chargés dans l'instrument au début de l'analyse. Suivez les instructions ci-dessous pour décongeler et inspecter HCM, HIM et HSM.

Décongeler les réactifs SBS

- 1 Retirez HCM, HIM et HSM de leur emplacement 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 HIM et HSM dans un bain d'eau désionisée à température ambiante pendant environ 90 minutes. Décongelez HCM dans un bain d'eau **séparé**.



REMARQUE

Changez toujours de gants après avoir manipulé HCM.

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

Préparer les réactifs d'indexage et appariés

Les réactifs d'indexage et les réactifs appariés sont chargés dans l'instrument au début de l'analyse. Ils sont utilisés pendant les lectures d'indexage et au cours de l'étape de resynthèse pour la lecture 2 d'une analyse de séquençage.

Suivez les instructions pour préparer des réactifs d'indexage et des réactifs appariés uniquement si vous souhaitez séquencer une Flow Cell à lecture appariée ou des bibliothèques indexées sur une Flow Cell à lecture unique.



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 et préparer les réactifs d'indexage et appariés

- 1 Retirez les réactifs suivants de leur lieu de stockage entre -25 et -15 °C :
 - ▶ Pour une analyse sur une Flow Cell appariée : HAM, HDR, HLM2, HP11, HP14, HPM et HRM. Pour les librairies non indexées, le réactif HP14 n'est pas requis.
 - ▶ Pour une analyse sur une Flow Cell à lecture unique :
 - ▶ Librairies à index double : HDR, HP14 et HRM.
 - ▶ Librairies à index simple : HDR et HP14.
- 2 Décongelez dans un béccher contenant de l'eau désionisée à température ambiante pendant environ 20 minutes.
- 3 Retournez chaque tube pour en mélanger le contenu.
- 4 Centrifugez à 1 000 tr/min pendant une minute.
- 5 Réservez HAM, HLM2 et HRM sur de la glace.
- 6 Réservez HDR, HP11, HP14 et HPM 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	26
Formater rapidement le lecteur de sortie et le lecteur de travail	27

Introduction

Pour effectuer une analyse sur le système HiSeq 4000, préparez tous les réactifs, puis suivez les invites du logiciel pour configurer l'analyse. Les étapes de configuration de l'analyse consistent à entrer les paramètres de l'analyse, à charger et amorcer les réactifs, à charger la Flow Cell et à procéder à une vérification du système fluidique.

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 obtenir des renseignements sur la durée des analyses ainsi que sur d'autres caractéristiques de performance, consultez la [page relative aux caractéristiques du HiSeq 4000](#) 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 38.

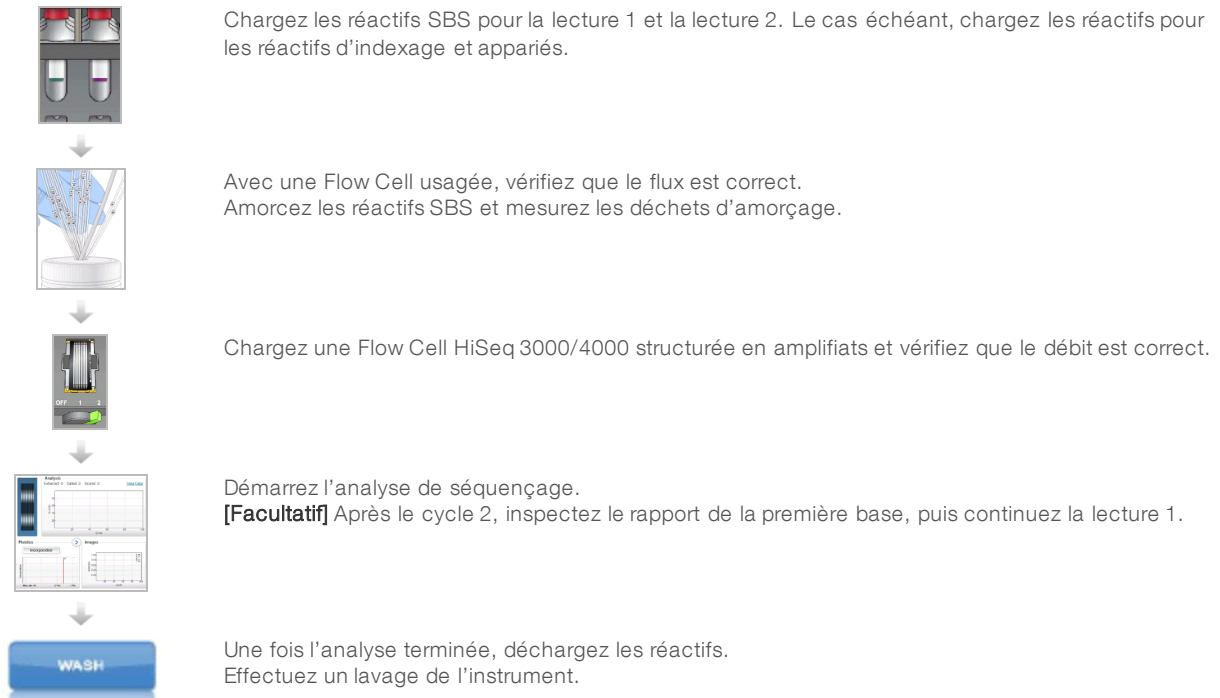
Flux de travail de séquençage



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]** Connectez-vous à BaseSpace Sequence Hub ou BaseSpace Onsite Sequence Hub comme suit :
 - a Sélectionnez **Connect to BaseSpace** (Se connecter à BaseSpace).
 - b Sélectionnez **BaseSpace** ou **BaseSpace Onsite**.
 - c Si vous avez sélectionné BaseSpace, sélectionnez l'une des options suivantes :
 - ▶ **Storage and Analysis** (Stockage et analyse) : envoie les données de l'analyse à BaseSpace Sequence Hub pour une surveillance à distance et une analyse des données. Cette option requiert une feuille d'échantillons.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Surveillance de l'analyse uniquement) : envoie uniquement les fichiers InterOp à BaseSpace Sequence Hub, ce qui vous permet de surveiller votre analyse à distance.
 - d Connectez-vous à BaseSpace Sequence Hub ou BaseSpace Onsite Sequence Hub avec l'adresse courriel et le mot de passe de votre compte Myllumina.
- 3 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 Numérisez ou saisissez l'identifiant (numéro de code à barres) de la Flow Cell à séquencer.
- 2 Sélectionnez le type de Flow Cell approprié, **HiSeq 3000/4000 PE** ou **HiSeq 3000/4000 SR**.
- 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.
- 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 unique ou à lecture appariée sans index.
 - ▶ **Single Index** (Index simple) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec une seule lecture d'indexage.
 - ▶ **Dual Index** (Index double) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec deux lectures d'indexage.
 - ▶ **Custom** (Personnalisé) : effectue une analyse à lecture unique ou à lecture appariée avec un nombre personnalisé de cycles pour les lectures d'index.
- 2 Entrez le nombre de cycles pour la lecture 1 et la lecture 2, s'il y a lieu.



REMARQUE

Chaque lecture comprend un cycle de plus que le nombre de cycles analysés. Par exemple, pour effectuer 125 cycles pour la lecture 1, entrez 126.

- 3 Si vous avez sélectionné l'option d'indexage **Custom** (Personnalisé), saisissez le nombre de cycles pour chaque lecture d'index.



REMARQUE

Il n'est pas nécessaire que les longueurs de séquences correspondent.

- 4 Vérifiez les paramètres de chimie suivants, générés automatiquement :
 - ▶ **SBS : HiSeq 3000/4000 SBS Kit** (Trousse SBS HiSeq 3000/4000) : indique la chimie SBS utilisée pour la lecture 1 et la lecture 2.
 - ▶ **Index : HiSeq 3000/4000 Sequencing Primer** (Primer de séquençage HiSeq 3000/4000) ou **HiSeq 3000/4000 Dual Index Sequencing Primer** (Primer de séquençage à index double HiSeq 3000/4000) : indique la chimie utilisée pour les lectures d'index.
 - ▶ **PE turnaround** (Rotation des paires de bases appariées) : **HiSeq 3000/4000 PE** (HiSeq 3000/4000, lecture appariée) ou **HiSeq 3000/4000 PE Dual Index** (HiSeq 3000/4000, lecture appariée à index double) : affiche la chimie utilisée pour la resynthèse appariée.
- 5 **[Facultatif]** Cochez la case **Use Existing Recipe** (Utiliser la formule existante) pour utiliser une formule personnalisée.

Écran Sample Sheet (Feuille d'échantillons)

Les feuilles d'échantillons sont facultatives, sauf si vous utilisez BaseSpace Sequence Hub pour effectuer 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 Effectuez le balayage de l'identifiant de code à barres de la trousse de réactifs SBS ou saisissez-le.
- 2 Pour les analyses à lecture appariée, numérisez ou saisissez l'identifiant de la trousse d'amplifiats.
- 3 Sélectionnez la trousse de réactifs SBS à utiliser pour l'analyse :
 - ▶ Sélectionnez **300 Cycles** pour une trousse de 300 cycles. Le nombre de cycles restants est défini sur 325 par défaut.
 - ▶ Sélectionnez **150 Cycles** pour une trousse de 150 cycles. Le nombre de cycles restants est défini sur 174 par défaut.
 - ▶ Sélectionnez **50 Cycles** pour une trousse de 50 cycles. Le nombre de cycles restants est défini sur 74 par défaut.
 - ▶ Sélectionnez **Custom** (Personnalisé) pour une trousse partielle ou plusieurs trousse de 50 cycles. Dans le champ Cycles Remaining (Cycles restants), entrez le nombre de cycles SBS que doivent couvrir les réactifs.



REMARQUE

Le champ Cycles Remaining (Cycles restants) est rempli automatiquement en fonction de l'identifiant de la trousse SBS. Le logiciel effectue un compte à rebours du nombre de cycles saisi. Lorsqu'il reste peu de cycles, le logiciel vous invite à charger de nouveaux réactifs.

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

Écran Review (Révision)

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

Charger et amorcer les réactifs

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

Charger les réactifs SBS

- 1 Retournez chaque flacon pour en mélanger le contenu.



ATTENTION

Mélangez et chargez le réactif HCM 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 HCM.

- 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	HIM	Mélange d'incorporation HT
2	PW1	25 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire
3	HSM	Mélange de balayage HT
4	HB1	Tampon SBS HT 1
5	HB2	Tampon SBS HT 2
6	HB2	Tampon SBS HT 2
7	HCM	Mélange de clivage HT
8	HB2	Tampon SBS HT 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 Retournez chaque flacon pour en mélanger le contenu.
- 2 Relevez les dispositifs d'aspiration du support de réactifs appariés, comme suit :
 - a Tirez la poignée vers vous, puis soulevez-la.
 - b Relâchez la poignée dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée soit bien fixée dans la fente.
- 3 Faites glisser le support hors du compartiment de réactifs, à l'aide de la poignée du support.
- 4 Si vous effectuez une analyse à lecture unique sans index, ignorez l'étape 5 et chargez chaque position avec un tube conique de 15 ml rempli de 10 ml de la solution PW1 ou d'eau de laboratoire.
- 5 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 Flow Cell à lecture appariée

Position	Réactif	Description
10	HRM	Mélange de resynthèse HT
11	HLM2	Mélange de linéarisation HT 2
12	PW1	10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire
13	HAM	Mélange d'amplification HT
14	HPM	Prémélange d'amplification HT
15	HDR	Réactif de dénaturation HT (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 contenant 10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire.

Tableau 3 Flow Cell à lecture unique

Position	Réactif	Description
10	HRM*	Mélange de resynthèse HT
11	PW1	10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire
12	PW1	10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire
13	PW1	10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire
14	PW1	10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire
15	HDR	Réactif de dénaturation HT (contient du formamide)

Position	Réactif	Description
16	PW1	10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire
17	HP14	Mélange de primers de l'index 1
18	PW1	10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire
19	PW1	10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire

* HRM est uniquement nécessaire pour les analyses à index double. Si HRM n'est pas utilisé, chargez un tube conique de 15 ml contenant 10 ml de PW1 ou d'eau de laboratoire.

- 6 Faites glisser le support dans le compartiment, en alignant le support sur le guide surélevé sur le plancher du compartiment.
- 7 Abaissez les dispositifs d'aspiration dans les tubes de réactifs appariés, comme suit :
 - a Tirez la poignée vers vous, puis abaissez-la.
 - b Inspectez les dispositifs d'aspiration pour vérifier qu'ils ne se sont pas pliés une fois plongés dans les tubes.
 - c Relâchez la poignée dans la fente située à la base de la ligne.
- 8 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.



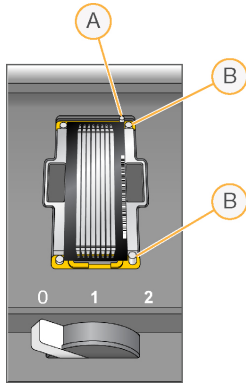
ATTENTION

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 Numérisiez 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 35.
- 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.
- 9 Assurez-vous que la case **Vacuum Engaged** (Décompression en cours) est cochée, puis sélectionnez **Next** (Suivant).

Vérifier que le flux est correct

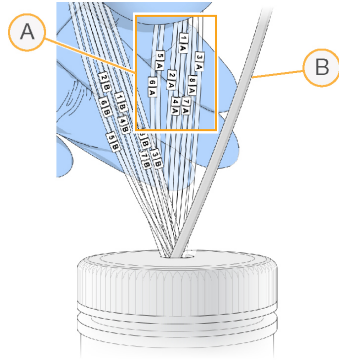
La vérification du flux confirme que la Flow Cell et les joints sont correctement installés et que le collecteur est engagé.

- 1 Sélectionnez la position **2** dans la liste déroulante.
- 2 Vérifiez les valeurs par défaut suivantes :
 - ▶ Volume : **125**
 - ▶ 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 et 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.
 - b Diminuez le taux d'aspiration à 100.
 - c Pompez 125 µl d'eau supplémentaires vers la Flow Cell.
 - d Si le problème persiste, retirez la Flow Cell, répétez les étapes de nettoyage, puis rechargez la Flow Cell.
- 6 Sélectionnez **Next** (Suivant).

Positionner les tubes et démarrer l'amorçage

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

Figure 8 Positionner les tubes



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

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

Charger la Flow Cell de séquençage

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

Retirer la Flow Cell usagée

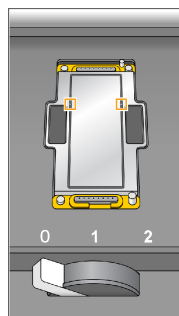
- 1 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 1 pour libérer les collecteurs.
- 2 Placez doucement le levier de Flow Cell en position 0 pour désengager le joint de décompression et libérer la Flow Cell.
- 3 Soulevez la Flow Cell utilisée du portoir de Flow Cell.

Nettoyer le portoir de Flow Cell

- 1 Enfilez une nouvelle paire de gants en latex sans talc.

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

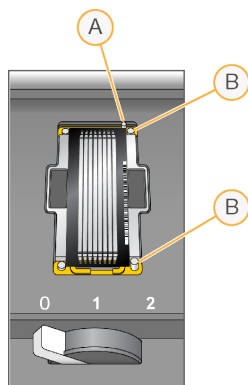
Figure 9 Inspecter les trous de décompression



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 35.

- 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

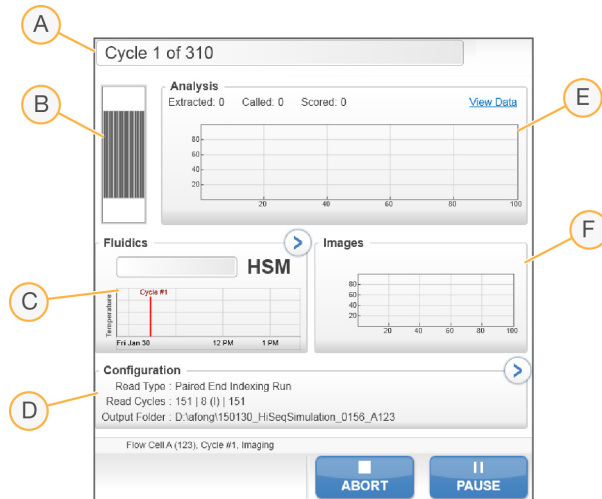
La vérification du flux confirme que la Flow Cell et les joints sont correctement installés et que le collecteur est engagé.

- 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 Sequencing Analysis Viewer (document n° 15020619)*.

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

Décharger les réactifs

- 1 Lorsque l'analyse est terminée, ouvrez la porte du compartiment de réactifs.
- 2 Relevez les dispositifs d'aspiration du support apparié et du support SBS correspondants comme suit :
 - a Tirez la poignée du dispositif d'aspiration vers l'extérieur.

- b Soulevez la poignée du dispositif d'aspiration tout en la tirant vers l'extérieur.
 - c Relâchez la poignée du dispositif d'aspiration dans la fente située en haut de la ligne. Veillez à ce que la poignée du dispositif d'aspiration demeure de manière sécurisée dans la fente.
- 3 Faites glisser chaque support de réactifs hors du compartiment de réactifs, à l'aide des poignées des supports.
- 4 Retirez chaque flacon du support de réactifs.



AVERTISSEMENT

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

Réaliser un lavage à l'eau

Un lavage à l'eau est requis après chaque analyse de séquençage afin de laver le système et de vérifier la fluidique. Le lavage de maintenance est une solution de remplacement facultative au lavage à l'eau après analyse. Pour obtenir des directives, consultez la section *Réaliser un lavage de maintenance*, page 28. Pour obtenir des directives, consultez le Guide du système HiSeq 4000 (document n° 15066496).

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 démarrer une analyse, un minimum de 2 To est requis pour une longueur d'analyse de 2 x 151. 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	28
Réaliser un lavage de maintenance	28
Laisser l'instrument inactif	33
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 28.
- ▶ **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 31.

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.

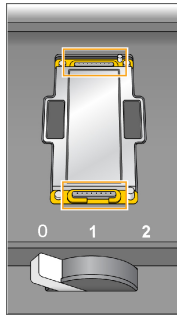


REMARQUE

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.

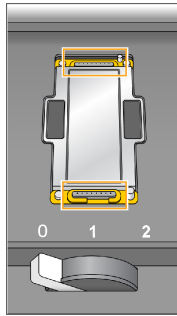
Éliminez la solution de lavage conformément aux normes de sécurité gouvernementales de votre région.

- 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 fluïdique.

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



ATTENTION

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

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

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

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

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 fluïdique 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	35
Problèmes possibles de configuration de l'analyse	35
Réaliser une vérification de la fluidique	36
Interrompre ou terminer une analyse sur le système HiSeq 4000	36
Échelonner les analyses sur la Flow Cell A et la Flow Cell B	38
Possible réhybridation du primer de lecture 1	38

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.

Problème	Cause possible	Action
Perte d'enregistrement lors de la lecture 1 caractérisée par une absence d'intensité et 0 % d'amplifiats passant le filtre dans une partie de la Flow Cell. Le pourcentage d'amplifiats passant le filtre diminue brusquement de la plaque 1 (entrée) à la plaque 28 (sortie).	La Flow Cell n'est pas bien positionnée.	Si l'analyse n'a pas effectué une rotation complète des lectures appariées, arrêtez l'analyse et réhybridez la Flow Cell. Avant de redémarrer l'analyse, consultez la section <i>Charger la Flow Cell de séquençage</i> , page 22 pour vous assurer du bon positionnement de la Flow Cell. Si l'analyse a effectué une rotation complète des lecture appariées, configurez une nouvelle analyse avec une nouvelle Flow Cell.

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 4000

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 39.

- 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 4000 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 4000 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 structurée HiSeq 4000 nécessite les consommables Illumina suivants :

- ▶ Trousse de réhybridation multiprimers HiSeq 3000/4000 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 3000/4000* (document n° 15058794).

Annexe B Real-Time Analysis

Présentation de Real-Time Analysis	39
Flux de travail de Real-Time Analysis	40

Présentation de Real-Time Analysis

Le système HiSeq 4000 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 4000, utilisez bcl2fastq v2.16 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 4000 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 v1.10.2 ou une version supérieure.

Pour obtenir des détails sur chaque fichier de sortie, consultez la section *Fichiers de sortie de séquençage*, page 45.

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.

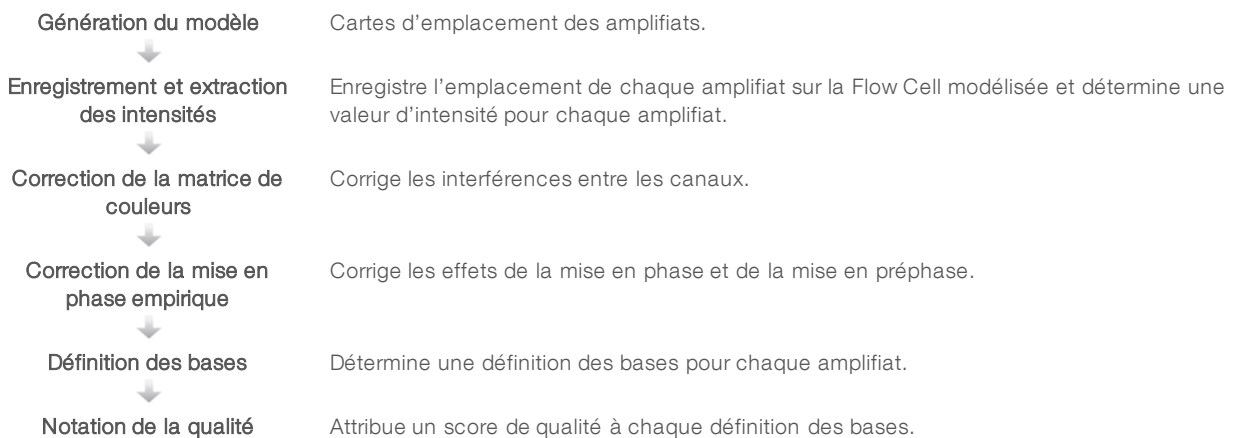


REMARQUE

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

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



Génération du modèle

La génération du modèle définit la position de chaque amplifiât 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'amplifiât 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 amplifiâts de la totalité de l'analyse s'inscrivent dans un même fichier d'emplacement des amplifiâts (s.locs).

Enregistrement et extraction des intensités

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

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

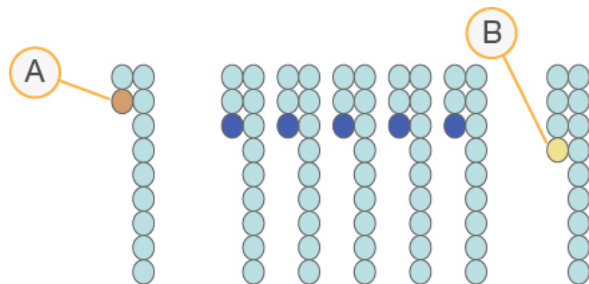
Après l'enregistrement et l'extraction de l'intensité, RTA2 corrige les interférences entre les canaux. Les interférences se produisent par exemple lorsqu'un amplifiât a une intensité dans le canal C, mais également dans le canal A. À l'aide d'une matrice de couleurs de 4 x 4, RTA2 génère des intensités 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 amplifiât 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 4000 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 4000 structurée 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)

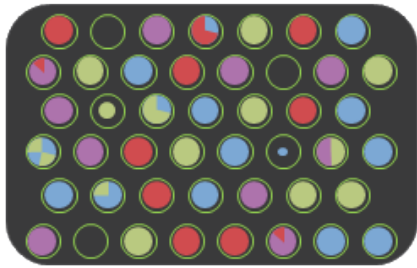
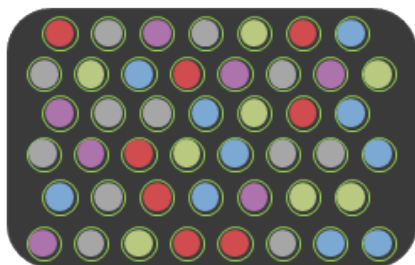


Figure 16 Puits contenant des amplifiats autres que PF (indiqués en gris)



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 du traitement des analyses et du transfert de données associés au débit élevé du système HiSeq 4000. Le fichier *.bcl qui en résulte est plus petit en raison des algorithmes de compression, qui parviennent à mieux compresser le fichier. La quantité de données écrites sur l'ordinateur de l'instrument est réduite. Les données sont transférées à un emplacement réseau, ce qui permet de copier le fichier plus vite.

Annexe C Fichiers de sortie

Fichiers de sortie de séquençage	45
Structure du dossier de sortie	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 3000/4000 structurée est imagée en 112 plaques sur chaque ligne, en haut et en bas, pour chaque cycle. Chacune des huit lignes comporte deux témoins, et chaque témoin, 28 plaques. Les plaques sont numérotées en fonction de leur position.



REMARQUE

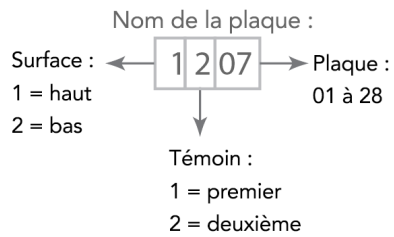
Un témoin est une colonne de plaques dans une ligne de Flow Cell.

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 28, représentent la plaque. Le numérotage des plaques commence à 01 à la fin de la sortie de la Flow Cell et va jusqu'à 28 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 42

A

aide

- documentation 1
- génération d'amplifiats 12
- réhybridation du primer 38
- SAV 25

aide, technique 52

alertes

- descriptions 4
- résolution 5

algorithme Phred 43

aligner sur PhiX 16

allumage de l'instrument 8

aménagement du laboratoire 2, 40

amorçage

- paramètre facultatif 17

analyses adjacentes 38

applications, installées 4

assistance clientèle 52

assistance en ligne 1

assistance technique 52

attribution d'un nom

- dossiers d'analyse 9, 46
- plaques 46

B

barre d'état, couleurs 2

BaseSpace Broker 40

BaseSpace Enterprise 9

BaseSpace Onsite Sequence Hub

- configuration de domaine 9
- connecter une analyse 15
- intégration 1

BaseSpace Sequence Hub

- configuration de domaine 9
- connecter une analyse 15
- feuilles d'échantillons 17
- icônes 6
- intégration 1
- transfert des données 40

bcl2fastq, version 39

bouchons verseurs 18

branchement des câbles USB 8

broches de guidage 20, 23

bulles 21, 24

C

câbles USB, branchement 8

capacité de stockage

- optimisation 44

capteurs 5

changer les réactifs en cours d'analyse 37

compartiments 2

configuration de l'analyse

- amorçage des réactifs 17
- cycles restants 17

conformité 2

connexion réseau 40

consommables

- fournis par l'utilisateur 11
- trousses de séquençage d'Illumina 7

consommables de séquençage 7, 12

contamination croisée, prévention 29

conversion des données 39

conversion FASTQ 39

côté de la Flow Cell 3, 46

couleurs de la barre d'état 2

D

déchets d'amorçage 22

démultiplexage 39

dépannage de la lecture 1 36, 38

documentation 1, 52

domaine, configuration 9

données

- compression 44
- conversion 39
- envoi à Illumina 10
- Illumina Proactive 10

dossiers de l'analyse, temporaires 46

dossiers de sortie

- emplacements 9, 15
- structure 45

dossiers temporaires 46

É

écran Flow Cell Setup (Configuration de la Flow Cell) 16

écran Reagents (Réactifs) 17

écran Run Overview (Aperçu de l'analyse) 24

E

emplacement des ampliats 7
 emplacement des dossiers 9, 46
 emplacement des dossiers de l'analyse 46
 emplacement des dossiers par défaut 9
 emplacement des fichiers 45
 emplacements des ampliats 41
 emplacements des dossiers 45
 emplacements des fichiers 45
 enregistrement des images miniatures 15
 enregistrement, dépannage 41
 erreurs 40
 probabilité 43
 espace disque disponible 27
 espace disque requis 27
 étapes de chimie, surveillance 24
 étapes de séquençage, vue d'ensemble 14
 RTA 40
 état du transfert des données
 BaseSpace Sequence Hub 6
 Run Copy Service 6

F

fenêtre Menu Options (Options du menu) 8
 feuilles d'échantillons, exigences 17
 fichier de configuration 45
 fichier de renseignements sur l'analyse 45
 fichiers de définition des bases 42
 fichiers de marqueurs 40
 fichiers InterOp 40
 Fichiers InterOp 45
 fichiers journaux 45
 fichiers mémoire 39
 filtre de pureté 42
 Flow Cell
 amorçage 20
 identifiant de la Flow Cell 16
 imagerie 46
 inspection 21, 24
 positionnement 3, 20, 23
 réseau d'ampliats 41-42
 structurée 7
 Flow Cell d'amorçage 20
 Flow Cell modélisée 41
 Flow Cell structurée 1, 7
 fluidique
 maintenance 26

fonctionnalités du matériel 1
 formules, personnaliser 17
 fuites 21, 24

H

HCS 4
 journaux d'erreurs 35
 options d'affichage 8
 ouverture 8

I

icônes 4-5
 état du transfert des données 5
 icônes de Run Copy Service 6
 images, enregistrement 15
 incorporation de la première base 25
 indicateurs de capteur
 BaseSpace Sequence Hub 6
 Run Copy Service 6
 indicateurs de l'analyse 24, 40
 initialisation du logiciel 8
 initialisation du logiciel, dépannage 35
 installation, vérification de la fluidique 36
 intensités, surveillance 24
 interférences 41

J

joints 28
 joints, dépannage 35
 journaux d'erreurs 35, 40

L

lavage après analyse 26
 lavages
 avantages 28
 eau et maintenance 28
 exigences du système 26
 exigences système 28
 solution de lavage de maintenance 28, 31
 lavages à l'eau
 durée et fréquence 26
 volumes distribués 27
 lavages de maintenance 28
 fréquence 28
 réutilisation de la solution 28-29, 31
 volumes distribués 30, 32

- lecteur de sortie 27
- lecteur de travail 27
- levier de Flow Cell 3
 - clignotant 35
 - orange 35
- levier de Flow Cell clignotant 35
- levier de Flow Cell orange 35
- lignes
 - Flow Cell 16, 46
- LIMS
 - paramètres 9
 - serveur 9
- localisation des amplifiats 41
- logiciels
 - applications installées 4
 - dépannage 35
 - fonctionnalités 1

M

- maintenance préventive 28
- miniatures 15, 45
- mise en phase 41
- mise en préphase 41
- module optique 2

N

- nanopuits 7
- no-call (N) 42
- nom d'expérience 16
- nombre de cycles
 - effectués et entrés 16
- numéros de référence
 - collecteurs 38
 - consommables fournis par l'utilisateur 11
 - trousses de réhybridation Illumina 38

O

- options d'indexage 16
- options d'interruption 37-38

P

- pages d'aide 2
- paramètres de l'analyse, révision 18
- paramètres de la chimie 17
- paramètres, logiciel 8
- personnalisation des formules 17

- perte d'enregistrement 36
- perte d'enregistrement, lecture 1 36
- perte de données 37, 39
- PhiX, alignement 16
- plaques 39, 46
- positionnement des Flow Cell 20, 23
- positions des réactifs
 - support SBS 18
- positions, réactifs
 - SBS 18
- préparation à l'inactivité, durée acceptable 33
- préparation de l'amorçage 22
- préparation du site 2, 40
- puits polyclonaux 42

Q

- qualité des amplifiats 42

R

- rapport de la première base 16
- rapports, incorporation de la première base 25
- réactifs
 - changer en cours d'analyse 37
 - consignation de l'identifiant de la trousse 17
 - manipulation après analyse 25
 - préparation 12
 - séquençage 12
- réactifs, supports 3
- redémarrage de l'instrument 34
- réfrigérant pour réactifs, température 4
- réhybridation 37-38
- réseau d'amplifiats 42
- réutilisation de la solution de lavage de maintenance 29
- RTA 4
- RTA2
 - fichiers d'entrée 39
 - fin 39
 - fin d'une analyse 37
- Run Copy Service 5, 40

S

- SAV 4
 - documentation 25
 - fichiers InterOp 45
 - onglet Index 39
 - version 40

- schéma d'indexage 17
- scores de qualité 43
 - surveillance 24
- sécurité 2
- Service de surveillance Illumina Proactive 10
- solution de lavage de maintenance 28, 31
- stockage de la solution de lavage de maintenance 28, 31
- structure des dossiers 45
- supports des réactifs 3
- surveillance à distance 15
- système de décompression 3
- système fluidique 3
 - accès 2
 - dépannage 35-36
 - entretien 28

T

- tableaux de qualité 43
- témoins 15, 46
- température, réfrigérant pour réactifs 4
- transfert des données 27, 40
- trousses SBS 7
- tube d'évacuation 22, 30, 32

V

- valeurs d'intensité 41
- vider l'espace disque 27
- volumes attendus
 - amorçage 22
 - lavages à l'eau 27
 - lavages de maintenance 30, 32
- volumes distribués
 - amorçage 22
 - lavages à l'eau 27
 - lavages de maintenance 30, 32

Assistance technique

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

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

Numéros de téléphone de l'assistance clientèle d'Illumina

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

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

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



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, Californie 92122 États-Unis

+(1) 800 809-ILMN (4566)

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

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

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

© 2018 Illumina, Inc. Tous droits réservés.

illumina®