

NovaSeq 6000

Руководство для системы секвенирования



Настоящий документ и его содержание являются собственностью компании Illumina, Inc. и ее филиалов (далее — Illumina) и предназначены для использования исключительно в рамках договора с потребителем при эксплуатации изделия (-й), описанного (-ых) в настоящем документе, и ни для какой иной цели. Настоящий документ и его содержание не подлежат использованию или распространению не по назначению и (или) передаче, раскрытию или воспроизведению каким-либо способом без предварительного письменного согласия компании Illumina. Посредством настоящего документа компания Illumina не передает какую-либо лицензию на патент, товарный знак, авторское право или права, регулируемые общим правом, или аналогичные права какой-либо третьей стороне.

Инструкции, изложенные в настоящем документе, должны строго и точно соблюдаться квалифицированным и прошедшим соответствующее обучение персоналом для обеспечения правильной и безопасной эксплуатации изделия (-й), описанного (-ых) в настоящем документе. Перед началом эксплуатации изделия (-ий) убедитесь, что вы полностью прочитали и поняли содержание настоящего документа.

НЕВЫПОЛНЕНИЕ ТРЕБОВАНИЙ ПО ПОЛНОМУ ПРОЧТЕНИЮ И ТОЧНОМУ ВЫПОЛНЕНИЮ ВСЕХ ИНСТРУКЦИЙ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ, МОЖЕТ ПРИВЕСТИ К ПОВРЕЖДЕНИЮ ИЗДЕЛИЯ (-Й), ТРАВМАМ (ПОЛЬЗОВАТЕЛЯ ИЛИ ИНЫХ ЛИЦ) И ПОВРЕЖДЕНИЮ ИМУЩЕСТВА.

КОМПАНИЯ ILLUMINA НЕ НЕСЕТ НИКАКОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТИ, ВОЗНИКАЮЩЕЙ ВСЛЕДСТВИЕ НЕНАДЛЕЖАЩЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИЗДЕЛИЯ (-Й), ОПИСАННОГО (-ОХ) В НАСТОЯЩЕМ ДОКУМЕНТЕ (ВКЛЮЧАЯ ИХ ЧАСТИ ИЛИ ЧАСТИ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ).

© Illumina, Inc., 2017. Все права защищены.

Illumina, BaseSpace, HiSeq, HiSeq X, NovaSeq, тыквенно-оранжевый цвет и рисунок потока оснований являются товарными знаками компании Illumina, Inc. и (или) ее филиала (-ов) в США и (или) других странах. Все остальные названия, логотипы и другие товарные знаки являются собственностью их соответствующих владельцев.

История редакций

Документ	Дата	Описание изменений
Материал № 20018871 Документ № 1000000019358, версия 02	Апрель 2017 г.	<p>Добавлена следующая информация.</p> <ul style="list-style-type: none"> Расходные материалы, предоставляемые компанией Illumina, которые необходимы для проведения цикла. Условия хранения компонентов комплекта реактивов. Рекомендации по загрузочным концентрациям библиотек. Разбавление NaOH для двух проточных кювет. Этап доведения проточной кюветы до комнатной температуры перед загрузкой. Этап замены перчаток после опорожнения бутылей с использованными реактивами. Конфигурирование выходных данных LIMS для LIMS-систем разработанных сторонними организациями. Соглашение о наименовании протоколов анализов. Значки управления процессами, поиск и устранение неисправностей. Приложение, содержащее функции безопасности Windows и инструкции по их конфигурированию. Контактная информация для оказания технической помощи. <p>Время размораживания картриджа с реагентами увеличено до 4 часов.</p> <p>Обновленные инструкции по добавлению Phi-X: объем 1%-ного раствора Phi-X изменен и составляет теперь 0,9 мкл, добавлено положение об использовании 10 мМ буферного раствора Tris-HCl с pH 8,5 для разбавления Phi-X с концентрацией 10 нМ.</p> <p>Обновлены инструкции по очистке проточных кювет и площадки для проточных кювет — теперь очистку нужно выполнять только при наличии видимых посторонних частиц.</p> <p>Обновлена частота проведения профилактической технологической промывки — теперь она составляет один раз в 14 дней.</p> <p>Реорганизованы и консолидированы инструкции по подготовке расходных материалов с тем, чтобы улучшить единообразие текста.</p> <p>Створчатые дверцы переименованы и упоминаются теперь как дверцы отсека для жидкостей.</p>
Материал № 20018406 Документ № 1000000019358, версия 01	Март 2017 г.	Исправлено название столбца на экране Process Management (Управление процессом) на Sequencing (Секвенирование).
Материал № 20015871 Документ № 1000000019358, версия 00	Февраль 2017 г.	Первый выпуск.

Содержание

Глава 1 Обзор	1
Введение	1
Дополнительные ресурсы	2
Обзор секвенирования	2
Рабочий процесс секвенирования	3
Компоненты прибора	4
Обзор комплекта реактивов	9
Глава 2 Начало работы	13
Методы	13
Запуск прибора	13
Настройки конфигурации	14
Расходные материалы и оборудование	17
Глава 3 Подготовка расходных материалов	20
Размораживание картриджей SBS и кластерных картриджей	20
Объединение и денатурирование библиотек для секвенирования	21
Глава 4 Секвенирование	25
Число циклов в одном считывании	25
Настройка цикла секвенирования	25
Отслеживание выполнения цикла	33
Удаление цикла	34
Отсоединение положения № 30	34
Автоматическая промывка после цикла	35
Глава 5 Техническое обслуживание	36
Профилактическое техническое обслуживание	36
Выполнение профилактической промывки	36
Циклы ступенчатого удлинения для проточных кювет А и В	39
Приложение А Поиск и устранение неисправностей	40
Ресурсы поиска и устранения неисправностей	40
Файлы поиска и устранения неисправностей	40
Ошибки проверок перед циклом	40
Управление процессом: поиск и устранение неисправностей	41
Неудача цикла до кластеризации	42
Окончание цикла	43
Выключение прибора	43
Приложение В Анализ в реальном времени	44
Обзор программного обеспечения Real-Time Analysis	44
Рабочий процесс анализа в режиме реального времени	46

Приложение С Выходные папки и файлы	50
Структура папок выходных данных секвенирования	50
Выходные файлы секвенирования	51
Приложение D Безопасность Windows	52
Конфигурации безопасности для системы NovaSeq 6000	52
Требования к паролям	52
Брандмауэр Windows	53
Набор технических средств для расширения возможностей по смягчению последствий	53
Правила, ограничивающие использование программного обеспечения, для Windows. .	53
Алфавитный указатель	56
Техническая помощь	61

Глава 1 Обзор

Введение	1
Дополнительные ресурсы	2
Обзор секвенирования	2
Рабочий процесс секвенирования	3
Компоненты прибора	4
Обзор комплекта реактивов	9

Введение

Система секвенирования Illumina® NovaSeq™ 6000 предлагает гибкую и масштабируемую по производительности технологию секвенирования на платформе промышленного уровня, имеющую при этом эффективность и экономичность на уровне лабораторных настольных систем.

Характеристики

- ▶ **Масштабируемое секвенирование** — система NovaSeq 6000 позволяет проводить секвенирование в промышленных масштабах в широком спектре приложений с получением высококачественных данных.
- ▶ **Регулируемый объем выходных данных** — система NovaSeq 6000 предусматривает использование двойных проточных кювет, что позволяет менять объем выходных данных в широком интервале. Можно секвенировать одну или две проточных кюветы с разной длиной считывания одновременно. Можно использовать различные комбинации проточных кювет и три разные длины считывания.
- ▶ **Структурированная проточная кювета** — структурированная проточная кювета генерирует плотно упакованные в пространстве кластеры. Уменьшение расстояния между нанолунками повышает плотность кластеров и улучшает выходные данные.
- ▶ **Кластерирование на приборе** — система NovaSeq 6000 позволяет смешивать реактивы ExAmp с библиотекой, амплифицирует библиотеку на поверхности проточной кюветы и генерирует кластеры, обеспечивая упрощенную рабочую схему секвенирования.
- ▶ **Сканирование дорожек с высокой пропускной способностью** — в системе NovaSeq 6000 используется только камера с технологией двунаправленного сканирования, которая позволяет быстро делать снимки проточной кюветы одновременно по двум цветовым каналам.
- ▶ **Анализ в режиме реального времени (RTA)** — система NovaSeq 6000 использует версию RTA, известную как RTA3. Это интегрированное программное обеспечение анализирует изображения и распознает основания.
- ▶ **Интеграция с хабом секвенирования BaseSpace®** — рабочий процесс секвенирования интегрирован в хаб секвенирования BaseSpace — среду, созданную компанией Illumina для вычислений в области геномики, анализа и хранения данных, а также совместной работы. По мере выполнения цикла файлы выходных данных направляются в эту среду в режиме реального времени.
- ▶ **Готовность к использованию BaseSpace Clarity LIMS** — эффективность эксплуатации повышается за счет полной цепочки прослеживаемости образцов и реактивов, применения автоматизированных рабочих процессов и интегрированности операций прибора.

Дополнительные ресурсы

На страницах технической поддержки систем секвенирования [NovaSeq 6000 Sequencing System](#) веб-сайта компании Illumina вы можете скачать программное обеспечение, ознакомиться с учебными ресурсами, информацией о совместимой продукции компании Illumina и с самыми последними по времени версиями данного системного руководства, а также со следующей документацией.

Ресурс	Описание
Custom Protocol Selector (Средство выбора пользовательского протокола)	Мастер, позволяющий создать документацию полного цикла, которая описывает конкретные методы подготовки библиотеки, параметры цикла и методы анализа, используемые для цикла секвенирования.
Руководство по подготовке рабочего места для приборов серии NovaSeq (документ № 1000000019360)	Содержит технические характеристики, касающиеся лабораторного пространства, требований к электроснабжению и рекомендаций по условиям окружающей среды и сетевому окружению.
Руководство по технике безопасности и нормативно-правовому соответствию для систем серии NovaSeq (документ № 1000000019357)	Содержит рекомендации по эксплуатационной безопасности, сведения о положениях соответствия и маркировке прибора.
Руководство по нормативно-правовому соответствию считывающего устройства RFID (документ № 1000000002699)	Содержит сведения о считывателе RFID, установленном в приборе, в том числе о сертификатах соответствия, и рекомендации по безопасности.
Руководство по подготовке пользовательских праймеров для приборов серии NovaSeq (документ № 1000000022266)	Содержит сведения о замене праймеров секвенирования производства компании Illumina пользовательскими праймерами секвенирования.

Обзор секвенирования

Генерация кластера

При подготовке к генерации кластера 525 мкл реактива ExAmp Master Mix автоматически смешивается с 225 мкл библиотеки, загруженной в прибор, обеспечивая окончательную концентрацию библиотеки на уровне 200–500 пМ. Отдельные молекулы ДНК связываются с поверхностью проточной кюветы; одновременно с этим происходит амплификация для формирования кластеров.

Секвенирование

Кластеры визуализируются с помощью двунаправленного сканирования и химикатов двухканальной схемы секвенирования. Камера использует датчики красного и зеленого света для визуализации каждой полосы и одновременного создания красного и зеленого изображений всей полосы. После визуализации два изображения разделяются на красные и зеленые плитки, которые RTA3 использует для распознавания оснований, фильтрации и определения баллов качества. Процесс повторяется для каждого вложенного цикла в цикле секвенирования.

Анализ

По мере выполнения цикла секвенирования управляющее программное обеспечение автоматически переносит файлы распознавания оснований (*.cbcl) в указанное место для выходных данных для проведения анализа данных.

В зависимости от используемого приложения доступны несколько методов анализа. Дополнительную информацию можно получить на странице поддержки хаба секвенирования BaseSpace на веб-сайте компании Illumina.

Рабочий процесс секвенирования



Разморозьте новые картриджи с реактивами SBS и реактивами для кластеризации.



Выполните объединение и денатурирование библиотек, а затем загрузите пробирку с библиотеккой в размороженный картридж кластеров.



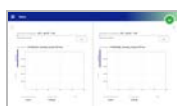
Выберите в интерфейсе ПО опцию **Sequence** (Последовательность) и укажите, одна проточная кювета будет использоваться в данном цикле или две.



Выгрузите расходные материалы из предыдущего цикла и загрузите расходные материалы для текущего. Опорожните и снова поставьте на место бутылки для использованных реактивов.



Укажите параметры цикла на экране Run Setup (Настройка цикла). Если настроено использование хаба секвенирования BaseSpace, войдите туда через экран входа. По окончании проверки перед циклом цикл запустится автоматически.



Контролируйте выполнение цикла на экране Sequence (Последовательность) через хаб секвенирования BaseSpace, если включена возможность мониторинга цикла, или через компьютер, входящий в сеть, используя средство просмотра Sequencing Analysis Viewer. Данные передаются в указанную папку выходных данных.

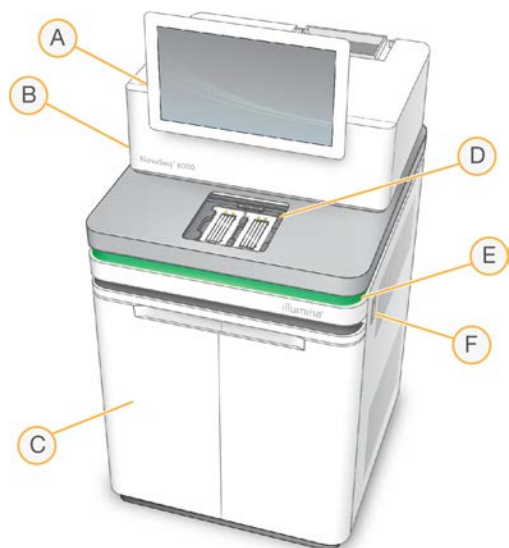


Промывка прибора начинается автоматически после завершения секвенирования.

Компоненты прибора

Система секвенирования NovaSeq 6000 состоит из монитора с сенсорным экраном, полосы статуса, кнопки питания с расположенными рядом портами USB и трех отсеков.

Рисунок 1 Внешние комплектующие



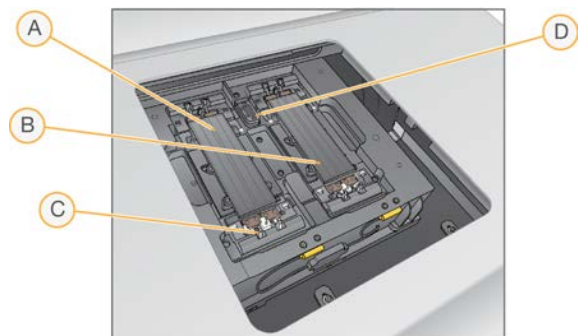
- A **Монитор с сенсорным экраном** — отображает интерфейс управляющего ПО для конфигурирования системы и настройки цикла.
- B **Отсек оптики** — здесь находятся оптические комплектующие, которые позволяют визуализировать обе поверхности проточных кювет.
- C **Отсек для жидкостей** — здесь располагаются реактивы, буферные растворы и бутылки для отработанных реактивов.
- D **Отсек проточной кюветы** — здесь располагаются проточные кюветы.
- E **Полоса статуса** — отображает статус проточной кюветы: готова к секвенированию (зеленый), в обработке (голубой) или требует внимания оператора (оранжевый).
- F **Питание и порты USB** — обеспечивает доступ к кнопке питания и разъемам USB для периферийных комплектующих.

Отсек проточной кюветы

Отсек для проточной кюветы оснащен площадкой проточной кюветы, при этом слева располагается проточная кювета А, а справа — проточная кювета Б. На каждой стороне есть четыре зажима, которые автоматически удерживают проточную кювету в нужном положении и фиксируют ее.

Мишень для проверки соосности оптики, установленная на площадке проточной кюветы, служит для проверки и корректировки проблем с оптикой. Когда управляющее ПО выдает соответствующее сообщение, по мишени для определения соосности оптики производятся выравнивание системы и корректировка фокусировки камеры, что позволяет улучшить результаты секвенирования.

Рисунок 2 Площадка проточной кюветы



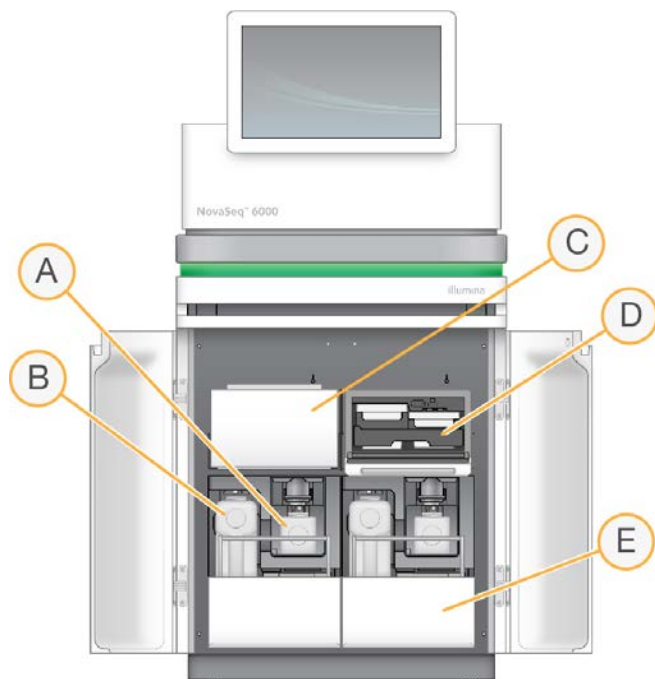
- A Держатель проточной кюветы стороны А
- B Держатель проточной кюветы стороны Б
- C Зажим проточной кюветы (один из четырех на каждой стороне)
- D Мишень для проверки соосности оптики

Программное обеспечение контролирует открывание и закрывание дверцы отсека для проточных кювет. Дверца открывается автоматически для загрузки проточной кюветы при выполнении цикла или для технологической профилактической промывки. После загрузки программное обеспечение закрывает дверцу отсека, перемещает проточную кювету в нужное положение, закрывает зажимы и включает вакуумный затвор. Датчики проверяют наличие проточной кюветы и ее совместимость с прибором.

Отсек для жидкостей

Настройка цикла подразумевает наличие доступа к отсекам для жидкостей, чтобы загружать туда реактивы и буферные растворы и опорожнять бутылки для использованных реактивов. Отсек для жидкостей закрывается створчатой дверцей, состоящей из двух совмещающихся друг с другом половинок для проточной кюветы А и для проточной кюветы В.

Рисунок 3 Компоненты отсека для жидкостей



- A **Малая бутылка для использованных реактивов** — предназначена для сбора использованных реактивов из картриджа кластера; оснащена держателем крышки для удобства хранения крышки.
- B **Большая бутылка для использованных реактивов** — предназначена для сбора использованных реактивов из картриджей буферных растворов и SBS; оснащена держателем крышки для удобства хранения крышки.
- C **Холодильник для реактивов** — охлаждает картридж SBS и кластерный картридж.
- D **Ящик холодильника для реактивов** — имеет кодированные цветными бирками положения: слева (серая этикетка) — для картриджа SBS, справа (оранжевая метка) — для кластерного картриджа.
- E **Ящик для буферных растворов** — в левой части находится большая бутылка для использованных растворов, в правой располагается картридж с буфером.

Использованные реактивы

Жидкостные системы предназначены для направления реактивов из картриджей кластеризации, которые могут потенциально быть опасными, в небольшие бутылки для использованных реактивов. Реактивы из SBS и буферных картриджей направляются в большие бутылки для использованных реактивов. Однако между потоками реактивов может существовать перекрестное загрязнение. Из соображений безопасности рекомендуется считать, что в бутылках обоих типов могут находиться потенциально опасные вещества. Подробная информация о реактивах приводится в соответствующих паспортах безопасности вещества (SDS).

**ПРИМЕЧАНИЕ**

Если система настроена на сбор использованных реактивов во внешний резервуар, то поток для большой бутылки использованных реактивов будет направляться наружу. Реактивы кластерного картриджа по-прежнему направляются в малую бутылку использованных реактивов.

Системное программное обеспечение

Пакет программного обеспечения прибора включает в себя встроенные приложения, которые выполняют циклы секвенирования и анализ, проводимый на приборе, а также соответствующие функциональные возможности.

- ▶ **Управляющее ПО NovaSeq (NVCS)** — предоставляет пошаговые инструкции для настройки цикла секвенирования, управляет операциями прибора и отображает статистику по мере выполнения цикла. Чтобы напомнить правильный порядок разгрузки и загрузки расходных материалов, во время настройки цикла NVCS воспроизводит обучающие видеоролики.
- ▶ **Программа анализа в реальном времени (RTA)** — выполняет анализ изображений и распознавание нуклеотидных оснований во время цикла. В NovaSeq 6000 используется RTA3, содержащая улучшения в архитектуре, безопасности и других функциях, направленные на оптимизацию производительности. Дополнительную информацию см. в разделе [Анализ в реальном времени на стр. 44](#).
- ▶ **Служба универсального копирования** — копирует выходные файлы из RTA3 и NVCS в папку выходных данных на протяжении цикла. Если соответствующая функция предусмотрена, служба также передает данные в хаб секвенирования BaseSpace.

Значки состояния

Значки состояния на панели интерфейса управляющего ПО указывают на состояние цикла. Цифра на значке указывает на количество состояний в статусе.

Когда статус цикла меняется, значок начинает мигать, чтобы предупредить вас. Выберите значок для просмотра описания состояния. Выберите опцию **Acknowledge** (Подтвердить) для сброса сообщения, а затем выберите опцию **Close** (Закрыть), чтобы закрыть диалоговое окно.

Таблица 1 Значки состояния NVCS







Значок состояния	Название состояния	Описание
	Состояние в порядке	Система в обычном состоянии.
	Обработка	Система выполняет обработку.
	Предупреждение	Предупреждение имеет место, на него нужно обратить внимание. Предупреждения не останавливают цикл и не требуют обязательных действий перед продолжением работы.
	Ошибка	Появляется ошибка. Ошибки требуют принятия определенных мер до перехода к выполнению цикла.

Управление процессом

Экран Process Management (Управление процессом) обеспечивает доступ к вычислительному ядру (SE) и жесткому диску (C:\). Экран Process Management (Управление процессом) используется для отслеживания хода выполнения цикла, удаления циклов и иных действий по управлению дисковым пространством. Не удаляйте файлы и папки с диска C:\ напрямую.

Экран Process Management (Управление процессом) отображает доступное дисковое пространство, пространство, использованное на SE and C:\, а также состояние циклов в отношении использования дискового пространства. Столбцы Run Date (Дата цикла) и Name (Название) позволяют идентифицировать каждый цикл. Столбцы Run Status (Статус цикла), BaseSpace и Network (Сеть) показывают статус каждого из процессов в цикле.

Таблица 2 Значки статуса управления процессом

Процесс	Пиктограмма	Описание
Run Status (Статус цикла)	 Running	Цикл выполняется
	 Complete	В цикле завершено секвенирование
Network (Сеть)	 Copying	Файлы копируются в папку выходных данных в сетевом расположении.
	 Complete	Все файлы скопированы в папку выходных данных в сетевом расположении.
	N/A	Неприменимо, поскольку цикл не сконфигурирован таким образом, чтобы файлы копировались в папку выходных данных в сетевом расположении, или же статус копирования файлов неизвестен. Для поиска и устранения неисправностей см. раздел Управление процессом: поиск и устранение неисправностей на стр. 41.
BaseSpace	 Uploading	Файлы загружаются в хаб секвенирования BaseSpace.
	 Complete	Все файлы загружены в хаб секвенирования BaseSpace.
	N/A	Неприменимо, поскольку цикл не сконфигурирован таким образом, чтобы файлы копировались в хаб секвенирования BaseSpace, или же статус копирования файлов неизвестен. Для поиска и устранения неисправностей см. раздел Управление процессом: поиск и устранение неисправностей на стр. 41.

Перед началом цикла с двумя проточными кюветами проверьте наличие свободного места, SE требует не менее 5,4 Гб места на каждый цикл, на диске C:\ должно иметься 10 Гб места. О том, как очистить дисковое пространство, см. раздел [Удаление цикла](#) на стр. 34.

Обзор комплекта реактивов

Комплект реактивов NovaSeq 5000/6000 S2 — это одноразовый комплект реактивов, необходимый для выполнения секвенирования. Комплект выпускается в следующих конфигурациях.

Таблица 3 Конфигурация комплекта

Наименование комплекта	Illumina, № по каталогу
Комплект реактивов NovaSeq 5000/6000 S2 (300 циклов)	20012860
Комплект реактивов NovaSeq 5000/6000 S2 (200 циклов)	20012861
Комплект реактивов NovaSeq 5000/6000 S2 (100 циклов)	20012862

S2 означает режим цикла. Технические характеристики и подробные сведения приведены на странице с описаниями продукции [NovaSeq Reagent Kits product page](#) на веб-сайте компании Illumina.

Компоненты комплекта

Каждый комплект содержит следующие компоненты. Получив комплект, храните его компоненты при указанной температуре, чтобы обеспечить надлежащее функционирование.

Таблица 4 Компоненты комплекта

Количество	Компонент комплекта	Температура хранения
1	Пробирка с библиотекой *	От 15 до 30 °C *
1	Проточная кювета	От 2 до 8 °C
1	Картридж с буфером	От 15 до 30 °C
1	Картридж кластера	От -25 до -15 °C
1	Картридж SBS	От -25 до -15 °C

* Перед началом использования пробирка с библиотеками должна находиться при комнатной температуре (от 15 до 30 °C).

Каждый компонент имеет устройство радиочастотной идентификации (RFID) для точного отслеживания расходных материалов и совместимости.

Пробирка с библиотекой

Пробирка с библиотекой NovaSeq 5000/6000 — это пробирка 16 мм, которая вставляется в положение № 8 кластерного картриджа. Положение № 8 снабжено этикеткой **Library Tube** (Пробирка с библиотекой) и обведено оранжевым цветом для лучшей идентификации.

Рисунок 4 Пробирка с библиотекой



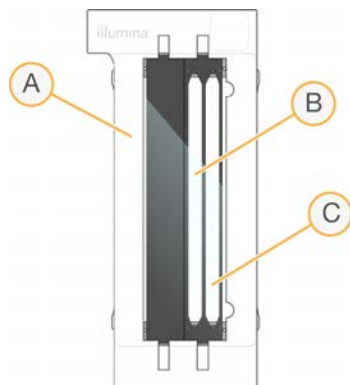
Объединенные и денатурированные библиотеки добавляют в пробирку библиотек, затем вставляют пробирку без колпачка в кластерный картридж. Винтовая крышка позволяет при необходимости хранить библиотеки. После начала цикла библиотеки смешиваются с реактивами ExAmp в пробирке с библиотекой, а затем автоматически переносятся на обе дорожки проточной кюветы.

Проточная кювета

Проточная кювета NovaSeq 5000/6000 представляет собой структурированную проточную кювету, заключенную в картридж. Проточная кювета является стеклянной основой, содержащей миллиарды нанолунок. Лунки, расположенные в определенном порядке, улучшают результаты считывания и данные секвенирования. В нанолунках генерируются кластеры, а затем проводится процесс секвенирования.

Проточная кювета S2 имеет две дорожки для секвенирования комплектом объединенных библиотек. Каждая дорожка визуализируется набором полос, а затем программное обеспечение разделяет изображение каждой полосы на меньшие части, называемые плитками. Дополнительную информацию см. в разделе *Плитки проточной кюветы на стр. 45*.

Рисунок 5 Проточная кювета с двумя дорожками






- A Картридж проточной кюветы
- B Дорожка 1
- C Дорожка 2

Картриджи буферных растворов, кластеризации и SBS

Картриджи с буферными растворами, с растворами для кластеризации и с SBS для систем NovaSeq 5000/6000 имеют запечатанные резервуары, предварительно наполненные реактивами, буферными и промывными растворами. В каждый комплект реактивов включено по одному картриджу каждого типа.

Картриджи непосредственно загружаются в прибор и помечены по цветовой схеме, а также снабжены этикетками для уменьшения ошибок при загрузке. Направляющие в ящике холодильника для реактивов и в ящике для буфера обеспечивают надлежащую ориентацию.

Таблица 5 Картриджи с реактивами

Картридж	Описание
<p>Картридж с буферным раствором (буферный картридж) NovaSeq 5000/6000</p> 	<p>Заранее заполнен буферными растворами для секвенирования, весит до 6,8 кг (15 фунтов). Пластмассовая ручка помогает переносить картридж, загружать и выгружать его. Вырезы в верхней пластине позволяют устанавливать картриджи друг на друга.</p>
<p>Картридж с растворами для кластеризации (картридж кластера) NovaSeq 5000/6000</p> 	<p>Предварительно заполнен реактивами для кластеризации, индексирования и считывания парных концевых оснований; включает отмеченное специальным знаком положение для пробирки с библиотеками. Оранжевая этикетка отличает картридж кластера от картриджа SBS.</p>
<p>Картридж с раствором SBS (картридж SBS) NovaSeq 5000/6000</p> 	<p>Заранее заполнен реактивами для секвенирования в объемах, характерных для количества циклов, поддерживаемых комплектом (300, 200 или 100). Каждое из трех положений реактивов имеет зарезервированное для автоматической промывки после цикла соседнее положение. От картриджа кластера картридж SBS отличается этикеткой серого цвета.</p>

Резервуары картриджа кластера

Съемная емкость

Реактив для денатурации в положении № 30 содержит формамид — органический амид, токсичный для репродуктивной системы. Для безопасной утилизации неиспользованного реактива после цикла секвенирования эту емкость можно снять.



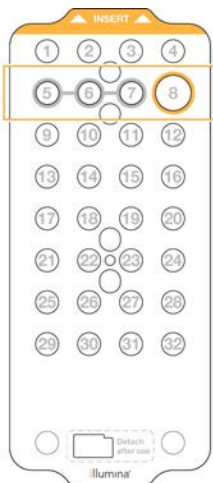
ПРИМЕЧАНИЕ

Не кладите картридж SBS поверх картриджа кластера, так как это может привести к отделению положения № 30.

Зарезервированные емкости

Три резервуара предназначены для пользовательских праймеров, а пустое положение зарезервировано для пробирки с библиотекой. С целью прослеживания образцов пробирка с библиотекой загружается в картридж кластера во время настройки цикла и остается в картридже до окончания цикла.

Рисунок 6 Пронумерованные емкости



Положение	Описание
5, 6 и 7	Подготовлены для дополнительных пользовательских праймеров
8	Пробирка с библиотекой

Дополнительно о пользовательских праймерах см. в разделе *Руководство по пользовательским праймерам для серии NovaSeq (документ № 1000000022266)*.

Глава 2 Начало работы

Методы	13
Запуск прибора	13
Настройки конфигурации	14
Расходные материалы и оборудование	17

Методы

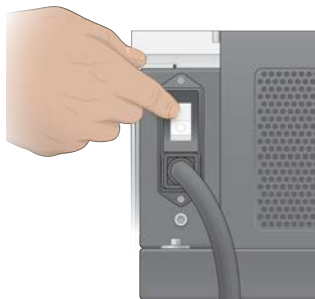
Чтобы цикл секвенирования прошел успешно:

- ▶ убедитесь в наличии всего необходимого оборудования и расходных материалов;
- ▶ всегда проверяйте этикетку во время приготовления расходных материалов, чтобы убедиться в том, что компоненты совместимы друг с другом;
- ▶ выполняйте протоколы в указанном порядке, используя указанные значения объемов, температур и продолжительностей;
- ▶ если в протоколе не указывается определенный момент остановки, переходите к следующим этапам незамедлительно.

Запуск прибора

- 1 Переведите переключатель питания в задней части прибора в положение [«ВКЛ.»] .

Рисунок 7 Местоположение переключателя питания



- 2 Дождитесь, пока кнопка питания на правой стороне прибора начнет светиться синим, затем нажмите ее.

Рисунок 8 Местоположение кнопки питания



- 3 Когда операционная система загрузится, войдите в Windows с помощью имени пользователя и пароля учреждения.

- 4 Открытие управляющего программного обеспечения NovaSeq.
Программное обеспечение запускается и инициализирует систему. Когда инициализация будет завершена, появится главная страница.

Настройки конфигурации

Управляющее программное обеспечение включает настройки, используемые при конфигурировании режима с использованием файлов или ручного режима.

- ▶ **Manual** (Ручной режим) — этот режим принят по умолчанию и отправляет данные в указанную папку выходных данных для последующего анализа.
- ▶ **File-Based** (Режим с использованием файлов) — это альтернативный режим, в котором для определения параметров цикла используются файлы из BaseSpace Clarity LIMS или иной системы LIMS. Дополнительную информацию см. в разделе *Конфигурирование выходных данных LIMS* на стр. 15.

При конфигурировании режима цикла обязательно укажите существующее место расположения папки выходных данных или папки настройки цикла. Указывать эти папки обязательно; если система указывает на недействительность места, значит, указанное место расположения не существует.

В обоих вариантах работы предусмотрен вариант отправки данных для анализа в хаб секвенирования BaseSpace.

Настройка ручного режима

- 1 В основном меню выберите пункт **Settings** (Настройки).
Откроется вкладка Mode Selection (Выбор режима) экрана Settings (Настройки).
- 2 Выберите **Manual** (Ручной).
- 3 Введите или просмотрите желаемый сетевой адрес для папки выходных данных.
Не указывайте места расположения на дисках C:\ или D:\, поскольку на них недостаточно места.
Эта настройка представляет собой место расположения по умолчанию. Место расположения файлов выходных данных можно изменять для каждого цикла.



ПРИМЕЧАНИЕ

При использовании хаба секвенирования BaseSpace для отслеживания и хранения цикла указание папки выходных данных не является обязательным.

- 4 [Дополнительно.] Снимите флажок **Send instrument Performance Data to Illumina** (Отправить информацию о производительности прибора в компанию Illumina), чтобы не отправлять файлы журналов в компанию Illumina.
Если эта функция включена, для нее требуется подключение внешнего интернет-соединения.
- 5 Выберите **Save** (Сохранить).

Настройка режима с использованием файлов

- 1 В основном меню выберите пункт **Settings** (Настройки).
Откроется вкладка Mode Selection (Выбор режима) экрана Settings (Настройки).
- 2 Выберите **File-Based** (С использованием файлов).

- 3 Введите или просмотрите желаемый сетевой адрес для папки настройки цикла, в котором находятся файлы LIMS .
Удостоверьтесь в том, что нужные файлы LIMS добавлены в папку настроек цикла до того, как вы приступите к его настройке. Во время настройки цикла программное обеспечение использует идентификатор RFID пробирки с библиотекой для определения местонахождения файлов для текущего цикла.
- 4 [Дополнительно.] Введите или просмотрите желаемый сетевой адрес для папки выходных данных. Не указывайте места расположения на дисках C:\ или D:\, поскольку на них недостаточно места.
Место расположения файлов выходных данных можно изменять для каждого цикла.
- 5 [Дополнительно.] Снимите флажок **Send instrument Performance Data to Illumina** (Отправить информацию о производительности прибора в компанию Illumina), чтобы отправить файлы журналов в компанию Illumina.
Если эта функция включена, для нее требуется подключение внешнего интернет-соединения.
- 6 Выберите **Save** (Сохранить).

Конфигурирование выходных данных LIMS

Если ваша система сконфигурирована для работы с файлами и вы используете ПО LIMS , отличное от BaseSpace Clarity LIMS, сконфигурируйте LIMS так, чтобы она создавала файл настройки цикла в формате *.json. В файле должны содержаться следующие поля. Значения нечувствительны к буквенному регистру ввода.

Название поля	Значение
run_name	Предпочтительное название цикла, которое может содержать буквенно-цифровые символы, дефисы и подчеркивания
run_mode	S2
workflow_type	NoIndex, SingleIndex или DualIndex
librarytube_ID	Метка RFID на пробирке с библиотекой
rehyb *	True (Истина) или False (Ложь)
paired_end	True (Истина) или False (Ложь)
read1	Значение вплоть до 151
read2	Значение вплоть до 151
index_read1	Значение вплоть до 20
index_read2	Значение вплоть до 20
output_folder	Путь к файлу выходных данных с двумя обратными косыми чертами для последовательности выхода
attachment	Путь к протоколу анализов или иному файлу в формате *.csv с двумя обратными косыми чертами для последовательности выхода
use_basespace	True (Истина) или False (Ложь)
basespace_mode	RunMonitoringOnly или RunMonitoringAndStorage
use_custom_read1_primer	True (Истина) или False (Ложь)
use_custom_read2_primer	True (Истина) или False (Ложь)
use_custom_index_read1_primer	True (Истина) или False (Ложь)

* Регибридизация невозможна при использовании ПО NovaSeq Control Software v1.0.

Пример файла с расширением *.json:

```
"run_name": "Test Experiment",
"run_mode": "S2",
"workflow_type": "DualIndex",
"librarytube_ID": "VY9999999-TMP",
"rehyb": false,
"paired_end": true,
"read1": 151,
"read2": 151,
"index_read1": 8,
"index_read2": 8,
"output_folder": "Z:\\Outputfolder",
"attachment": "Z:\\samplesheet.csv",
"use_basespace": true,
"basespace_mode": "RunMonitoringAndStorage",
"use_custom_read1_primer": false,
"use_custom_read2_primer": false,
"use_custom_index_read1_primer": false
```

Настройка хаба секвенирования BaseSpace

Представленные далее инструкции позволяют выполнить конфигурирование настройки по умолчанию хаба секвенирования BaseSpace. Во время настройки цикла пользователь может отключить хаб секвенирования BaseSpace для текущего цикла или изменить настройки отслеживания и хранения цикла. Для того чтобы установить связь с хабом секвенирования BaseSpace, требуется интернет-подключение.

- 1 В основном меню выберите пункт **Settings** (Настройки).
Откроется вкладка Mode Selection (Выбор режима) экрана Settings (Настройки).
- 2 Установите флажок **BaseSpace Sequence Hub** (Хаб секвенирования BaseSpace).
- 3 Выберите вариант конфигурации.
 - ▶ **Run Monitoring and Storage** (Отслеживание и хранение цикла) — отправка данных цикла секвенирования в хаб секвенирования BaseSpace для дистанционного мониторинга и анализа данных. При выполнении этой опции в ходе цикла выгружается протокол анализа SampleSheet.csv.
 - ▶ **Run Monitoring Only** (Только отслеживание цикла) — отправка файлов InterOp, журнала и других файлов цикла не-CBCL в хаб секвенирования BaseSpace для дистанционного мониторинга циклов.
- 4 В раскрывающемся меню Hosting Location (Место расположения серверов) выберите **EU (Frankfurt)** (ЕС [Франкфурт]) или **USA (N. Virginia)** (США [С. Виргиния]).
Эта настройка определяет, куда будут выгружаться данные.
- 5 Для подписчиков BaseSpace Enterprise
 - a Установите флажок **Private Domain** (Частный домен).
 - b Введите используемое название домена для однократного входа в хаб секвенирования BaseSpace.
- 6 Выберите **Save** (Сохранить).

Название протокола анализа

Протокол анализов, используемый в цикле системы NovaSeq 6000 и загружаемый в хаб секвенирования BaseSpace, должен иметь название SampleSheet.csv (название чувствительно к регистру букв). Если протокол анализа назван неправильно, то при включенных опциях мониторинга цикла и сохранения хаб секвенирования BaseSpace пометит данный цикл и выдаст предупреждение. Такой цикл с пометкой может быть поставлен в очередь на генерирование FASTQ при выборе опций **More | Fix Sample Sheet and Requeue** (Еще | Исправить протокол анализа и повторить запрос на очередь), после чего нужно будет ввести правильное название протокола анализов. Пока не будет протокола анализов, данные секвенирования нельзя будет преобразовать в файлы FASTQ.

Если вы используете программное обеспечение bcl2fastq2 Conversion Software v2.19 или более поздней версии для получения файлов FASTQ локально, можно воспользоваться опцией командной строки --sample-sheet и указать любой файл CSV в любом местонахождении. В командной строке можно указывать файл с любым названием.

Расходные материалы и оборудование

Для секвенирования, подготовки расходных материалов и технического обслуживания используются следующие расходные материалы и оборудование.

Расходные материалы, поставляемые компанией Illumina

Секвенирование одной проточной кюветы на приборе NovaSeq 6000 требует использования одного комплекта реактивов NovaSeq 5000/6000 S2. Комплект содержит по одному из следующих расходных материалов, каждый из которых необходим для проведения цикла.

Расходный материал	Цель
Картридж с буфером	Обеспечивает наличие буферных растворов, поддерживающих секвенирование в цикле.
Картридж кластера	Обеспечивает реактивы для кластеризации, индексирования и считывания парных концевых последовательностей в цикле.
Проточная кювета	В проточной кювете происходят реакции кластеризации и секвенирования.
Картридж SBS	Обеспечивает наличие реактивов, поддерживающих секвенирование в цикле.
Пробирка с библиотекой	Содержит объединенные и денатурированные библиотеки для секвенирования.

Расходные материалы, приобретаемые пользователем

Расходный материал	Поставщик	Цель
1 н NaOH (гидроксид натрия)	Основной поставщик лаборатории	Разбавление до 0,2 н для денатурирования библиотек.
10 мМ трис-HCl, pH 8,5	Основной поставщик лаборатории	Разбавление библиотек и дополнительного контроля PhiX после денатурирования.

Расходный материал	Поставщик	Цель
400 мМ трис-HCl, pH 8,0	Основной поставщик лаборатории	Нейтрализация библиотек и дополнительного (при необходимости) контроля PhiX после денатурирования.
Бутыль для центрифуги, 500 мл	Основной поставщик лаборатории	Разбавление препарата Tween 20 для профилактической промывки.
Центрифужная пробирка, 30 мл	Основной поставщик лаборатории	Разбавление NaOCl для профилактической промывки.
Спиртовые салфетки, 70%-й изопропиловый спирт или 70%-й этиловый спирт	VWR, № по каталогу: 95041-714, или эквивалент Основной поставщик лаборатории	Компоненты, используемые при очистке перед циклом и с общими целями.
Одноразовые перчатки, неопудренные	Основной поставщик лаборатории	Общего назначения.
Лабораторные низковорсные салфетки	VWR, № по каталогу: 21905-026, или эквивалент	Протирание насухо площадки проточной кюветы и любое другое протирание.
Пробирка для микроцентрифуги, 1,5 мл	VWR, № по каталогу 20170-038 или эквивалент	Объединение объемов NaOH и библиотеки в процессе разбавления.
NaOCl, 5 %	Sigma-Aldrich, № по каталогу 239305	Выполнение профилактической промывки.
Tween 20	Sigma-Aldrich, № по каталогу P7949	Выполнение профилактической промывки.
Вода лабораторного класса	Основной поставщик лаборатории	Разбавление NaOH для денатурирования библиотек. Разбавление препарата Tween 20 и гипохлорита натрия для профилактической промывки.
[Дополнительно.] PhiX Control v3	Illumina, номер по каталогу FC-110-3001	Обогащение в контроле 1 % PhiX.

Указания в отношении воды лабораторного класса

При работе с прибором используйте только воду лабораторного класса или деионизированную воду. Запрещается использовать водопроводную воду. Разрешается использовать только воду следующих классов (или эквивалентного качества).

- ▶ Деионизированная вода
- ▶ Очищенная вода Illumina PW1
- ▶ Вода с сопротивлением 18 МОм (мегаом)
- ▶ Вода Milli-Q
- ▶ Вода Super-Q
- ▶ Вода для молекулярно-биологических задач

Оборудование, приобретаемое пользователем

Элемент	Источник
Морозильная камера, от –25 до –15 °С	Основной поставщик лаборатории
Емкость для льда	Основной поставщик лаборатории
Пипетки одноканальные, 20 мкл	Основной поставщик лаборатории
Пипетки одноканальные, 200 мкл	Основной поставщик лаборатории
Пипетки одноканальные, 1000 мкл	Основной поставщик лаборатории
Холодильник, от 2 до 8 °С	Основной поставщик лаборатории
Ванна для водяной бани *	Основной поставщик лаборатории

* Используйте ванну, в которой помещаются два картриджа с реактивами и обеспечивается соответствующий уровень воды. Например, 61 × 91,4 × 25,4 см (24 × 36 × 10 дюймов).

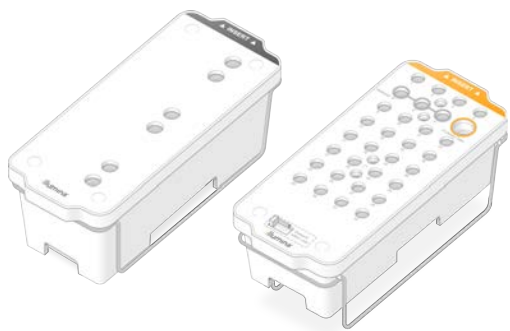
Глава 3 Подготовка расходных материалов

Размораживание картриджей SBS и кластерных картриджей	20
Объединение и денатурирование библиотек для секвенирования	21

Размораживание картриджей SBS и кластерных картриджей

Размораживание картриджей SBS и кластерных картриджей выполняют с помощью одного из двух методов: четырехчасовым размораживанием на водяной бане или размораживанием в холодильнике в течение ночи с последующим размораживанием на водяной бане. Проволочные сетки для размораживания, которые входят в комплект прибора, удерживают картриджи с реактивами от перевертывания во время размораживания на водяной бане. Если требуется повторная заморозка реактивов, она должна быть произведена сразу после размораживания.

Рисунок 9 Картриджи с реактивами в проволочных сетках для размораживания



- 1 Для размораживания реактивов в течение 4 часов выполните следующие действия.
 - a Извлеките картридж SBS и кластерный картридж из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.
 - b Поместите каждый картридж в проволочную сетку для размораживания.
 - c Размораживайте на водяной бане при комнатной температуре (19 – 25 °C) в течение 4 часов. Погрузите их примерно до половины.
 - d Вытрите основание картриджей бумажным полотенцем. Вытрите насухо пространство между лунками, удалив всю воду.
 - e Осмотрите укупорку из фольги: она должна быть сухой. Если на фольге есть вода, промокните ее насухо безворсовой салфеткой.
- 2 Для того чтобы разморозить реактивы за ночь, выполните следующие действия.
 - a Извлеките картридж SBS из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.
 - b Размораживайте в холодильнике (при температуре 2 – 8 °C) по меньшей мере в течение 14 часов.
 - c Выньте картридж SBS из холодильника, а картридж кластера из морозильной камеры с температурой от -25 до -15 °C.
 - d Поместите каждый картридж в проволочную сетку для размораживания.
 - e Размораживайте на водяной бане при комнатной температуре (19 – 25 °C) в течение 2 часов. Погрузите их примерно до половины.

- f Вытрите основание картриджа бумажным полотенцем. Вытрите насухо пространство между лунками, удалив всю воду.
 - g Осмотрите укупорку из фольги: она должна быть сухой. Если на фольге есть вода, промокните ее насухо безворсовой салфеткой.
- 3 Если реактивы нельзя будет загрузить в прибор в течение 4 часов, их можно будет хранить при температуре от 2 до 8 °C в течение 24 часов.

Объединение и денатурирование библиотек для секвенирования

Воспользуйтесь приведенными ниже инструкциями для подготовки пула библиотек, а затем денатурируйте его и необязательный контроль PhiX для проведения цикла секвенирования. Инструкции относятся к поддерживаемым методам подготовки библиотек и предполагают, что размер вставки типичен для приложений, поддерживаемых системой NovaSeq 6000.

- ▶ Для получения лучших результатов формирование пула и денатурирование библиотек следует выполнять непосредственно перед секвенированием.
- ▶ Разбавьте библиотеку до загрузочной концентрации, соответствующей конкретному приложению. Слишком низкая или слишком высокая загрузочная концентрация отрицательно влияет на долю кластеров, проходящих через фильтр (%PF). При низкой концентрации библиотеки возрастает количество секвенируемых дубликатов.
- ▶ Для достижения оптимального значения %PF необходимы точное количественное оценивание библиотеки и надлежащий контроль качества. Рекомендации приведены в документации к используемому комплекту для подготовки библиотек.
- ▶ Удостоверьтесь в том, что объем библиотеки точно отмерен и перенесен в пробирку с библиотекой, входящую в состав комплекта. Система переносит реактивы в пробирку с библиотекой для перемешивания внутри системы до начала секвенирования, поэтому при неверном объеме библиотеки на этапе кластеризации могут происходить ошибки или неисправности.

Список того, что необходимо для объединения библиотек в пул и для его денатурации, приведен в разделе *Расходные материалы и оборудование* на стр. 17.

Создание пула нормализованных библиотек

Воспользуйтесь следующими инструкциями для нормализации библиотек по меньшей мере до уровня 1 нмоль/л, а затем объедините их. Библиотеки, загруженные в проточную кювету S2, нужно скомбинировать в один нормализованный пул общим объемом 150 мкл.

Нормализация библиотек для их объединения

- 1 Определите требуемую концентрацию объединяемых библиотек на основании желаемой окончательной загрузочной концентрации. См. раздел *Рекомендуемые загрузочные концентрации*.

Таблица 6 Одна проточная кювета S2

Окончательная загрузочная концентрация (пМ)	Концентрация смешанных библиотек (нМ)	Общий объем (мкл)
200	1	150
250	1,25	150

Окончательная загрузочная концентрация (пМ)	Концентрация смешанных библиотек (нМ)	Общий объем (мкл)
300	1,5	150
350	1,75	150
400	2	150
450	2,25	150
500	2,5	150
550	2,75	150
600	3	150

- Нормализуйте библиотеки до желаемой загрузочной концентрации объединенной библиотеки при помощи Tris-HCl буфера с pH 8,5 с концентрацией 10 ммоль/л .

Чтобы правильно разбавить библиотеки до соответствующей концентрации, воспользуйтесь калькулятором объединения библиотек, который находится здесь: support.illumina.com/help/pooling-calculator/pooling-calculator.html.

Рекомендуемые загрузочные концентрации

Оптимальная загрузочная концентрация ДНК зависит от типа библиотеки и размера вставки. В таблице ниже приведены загрузочные концентрации ДНК, рекомендуемые в предположении о том, что библиотеки Illumina имеют размер вставки вплоть до 450 пар оснований. При загрузке библиотек с меньшим размером вставки используйте концентрации, близкие к нижнему диапазону рекомендованных значений. Если размеры вставок в библиотеках превышают 450 пар оснований, могут понадобиться более высокие загрузочные концентрации.

Тип библиотеки	Окончательная загрузочная концентрация (пМ)	Загрузочная концентрация смешанных библиотек (нМ)
PhiX *	300	1,5
Пул библиотек с ДНК без ПЦР	250–350	1,25–1,75
Пул библиотек с ДНК с ПЦР-усилением	450–600	2,25–3,0

* Для цикла только с применением Phi-X.

Если у вас есть оптимальная загрузочная концентрация для системы HiSeq X[®], HiSeq[®] 4000 или HiSeq 3000, вы можете умножить ее на 1,5 и получить загрузочную концентрацию для системы NovaSeq 6000. Например, если загрузочная концентрация для HiSeq X составляет 200 пМ, для загрузки в систему NovaSeq 6000 воспользуйтесь концентрацией 300 пМ.

Объединение нормализованных библиотек и добавление контрольного образца PhiX (дополнительно)

- Поместите необходимые объемы каждой нормализованной библиотеки ≥ 1 нМ в новую микроцентрифужную пробирку таким образом, чтобы общий объем смеси составлял 150 мкл. Например, в случае шестикратного объединения библиотек соедините по 25 мкл каждой из библиотек, нормализованной до одной и той же концентрации.
- [Дополнительно.] Храните оставшиеся количества **отдельных** библиотек ≥ 1 нМ при температуре от -25 до -15 °C.

- 3 [Дополнительно.] Добавьте 1%-ный раствор неденатурированного PhiX, как показано ниже.
 - a Разбавьте 10 нМ PhiX до концентрации 2,5 нМ с помощью буфера Tris-HCl с pH 8,5 и концентрацией 10 мМ.
 - b Добавьте 0,9 мкл PhiX с концентрацией 2,5 нМ в пробирку, содержащую 150 мкл объединенной библиотеки, не проходившей денатурацию.



ПРИМЕЧАНИЕ

При обогащении PhiX уровень 1 % является рекомендованным количеством для сбалансированных библиотек. Для библиотек с малым разнообразием может потребоваться больше добавки контроля. Свяжитесь с отделом технической поддержки компании Illumina, чтобы получить рекомендации по тому, как использовать контрольную библиотеку PhiX в случае, если для рабочих библиотек характерно низкое разнообразие.

Подготовка свежего раствора гидроксида натрия (NaOH)

Подготовьте **свежий** разбавленный раствор NaOH концентрацией 0,2 н для секвенирования. Во избежание небольших ошибок пипетирования, которые могут повлиять на конечную концентрацию NaOH, подготовьте по меньшей мере 50 мкл разбавленного NaOH для каждой кюветы. В случае цикла с двойной проточной кюветой используйте 100 мкл разбавленного раствора NaOH.



ОСТОРОЖНО!

Наличие свежеприготовленного NaOH концентрацией 0,2 н является обязательным для процесса денатурации. Неправильная денатурация может снизить выход оснований.

- 1 Чтобы разбавить 1 н NaOH до 0,2 н, соедините в пробирке для микроцентрифуги следующие количества реактивов.

Реактив	Объем для одной проточной кюветы (мкл)	Объем для двух проточных кювет (мкл)
Вода лабораторного класса	40	80
Основной раствор 1 н NaOH	10	20

Сочетание этих объемов приведет к получению 50 мкл 0,2 н раствора NaOH для одной проточной кюветы или 100 мкл 0,2 н раствора NaOH для двух проточных кювет.

- 2 Переверните несколько раз или взболтайте, чтобы тщательно перемешать. Закройте пробирку крышкой и используйте в течение следующих **12 часов**.

Денатурирование объединенных библиотек и добавление контрольного образца PhiX (дополнительно)

- 1 Добавьте 37 мкл 0,2 н NaOH в пробирку с неденатурированным пулом библиотек в объеме 150 мкл и PhiX (дополнительно).
Итоговый объем составит 187 мкл или 187,9 мкл с PhiX.
- 2 Закройте колпачком и быстро взболтайте.
- 3 Центрифугируйте при 280 ×g на протяжении 1 минуты.
- 4 Инкубируйте при комнатной температуре в течение 8 минут.

- 5 Добавьте 38 мкл раствора трис-HCl в концентрации 400 ммоль/л с уровнем pH 8,0. Итоговый объем составит 225 мкл или 225,9 мкл с PhiX.
- 6 Закройте колпачком и быстро взболтайте.
- 7 Центрифугируйте при 280 ×g на протяжении 1 минуты.
- 8 Перенесите 225 мкл денатурированной библиотеки или 225,9 мкл денатурированной библиотекой и PhiX в пробирку с библиотекой, поставляемую с комплектом.



ОСТОРОЖНО!

Немедленно переходите к этапу загрузки пробирки с библиотекой в картридж кластера и приступайте к настройке цикла. Картриджи с реактивами, включая пробирку с библиотекой, должны быть загружены в прибор в течение **30 минут**.

- 9 [Дополнительно.] Если вы не можете приступить к работе немедленно, закройте пробирку с библиотекой колпачком и храните при температуре от -25 °C до -15 °C до трех недель. После размораживания не замораживайте повторно.



ОСТОРОЖНО!

Хранить пробирку с библиотекой следует только в случае крайней необходимости. Длительное хранение может привести к увеличению количества дублирований, что снижает выход.

Загрузка пробирки с библиотекой

- 1 Не встряхивая библиотеки, собранные в нижней части пробирки, вставьте пробирку с библиотеками без колпачка в положение **Library Tube** (Пробирка с библиотекой) № 8 кластерного картриджа.

Рисунок 10 Пробирка с библиотекой без колпачка загружена в положение № 8



Глава 4 Секвенирование

Число циклов в одном считывании	25
Настройка цикла секвенирования	25
Отслеживание выполнения цикла	33
Удаление цикла	34
Отсоединение положения № 30	34
Автоматическая промывка после цикла	35

Число циклов в одном считывании

Количество вложенных циклов, выполненных в считываниях Read 1 и Read 2 во время цикла секвенирования, превышает количество проанализированных вложенных циклов на единицу. Например, для выполнения 150-циклового цикла секвенирования парных концевых фрагментов введите в поля Read 1 и Read 2 значения 151, что составит в общей сложности 302 вложенных цикла (2×151). В конце цикла секвенирования будет проанализировано 2×150 вложенных циклов. Дополнительный вложенный цикл в каждом считывании используется для расчетов фазирования и предварительного фазирования.

Для каждого индексного считывания программное обеспечение позволяет выполнять до 20 циклов. Однако общее количество циклов для считываний Read 1, Read 2 и индексных считываний не может превышать количество циклов, предусмотренное для комплекта (300, 200 или 100), плюс 25.

Настройка цикла секвенирования

- 1 Извлеките упаковку с новой проточной кюветой из места хранения с температурой от 2 до 8 °С.
- 2 Оставьте невскрытую упаковку на 10–15 минут при комнатной температуре во избежание конденсации.
- 3 Подготовьте картридж SBS и кластерный картридж, как указано ниже.
 - a Осмотрите нижнюю сторону каждого картриджа и удостоверьтесь, что там нет льда — это будет означать, что все реактивы полностью оттаяли.
 - b Переверните каждый картридж 10 раз для перемешивания реактивов.
 - c Осторожно постучите дном каждого картриджа по рабочему столу, чтобы выпустить и разбить воздушные пузырьки.
- 4 Снимите все посторонние предметы с поверхности прибора.
Все поверхности во время цикла секвенирования должны оставаться чистыми; не опирайтесь на прибор. Давление на дверцу проточной кюветы может привести к ее открытию, что станет причиной остановки цикла.
- 5 На главной странице выберите опцию **Sequence** (Секвенирование), а затем выберите цикл с одной проточной кюветой или двумя.
 - ▶ **A + B** — цикл с двумя проточными кюветами.
 - ▶ **A** — цикл с одной проточной кюветой на стороне А.
 - ▶ **B** — цикл с одной проточной кюветой на стороне Б.Программное обеспечение иницирует серию страниц настройки цикла, начиная со страницы Load (Загрузка).



ПРИМЕЧАНИЕ

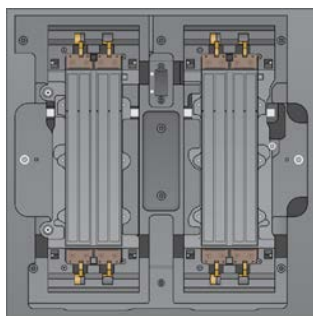
Можно назначить друг за другом два цикла с отдельными проточными кюветами. Инструкции см. в разделе *Циклы ступенчатого удлинения для проточных кювет А и В* на стр. 39.

- 6 Выберите **ОК**, чтобы принять предупреждение к сведению и открыть дверцу проточной кюветы.

Загрузка проточной кюветы

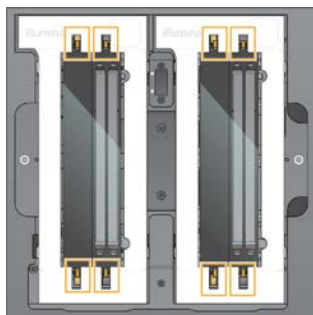
- 1 Наденьте новую пару неопудренных перчаток во избежание загрязнения стеклянной поверхности проточных кювет.
- 2 Положив упаковку на плоскую поверхность, вскройте упаковку со стороны шва запечатывания.
- 3 Извлеките двусторонний футляр из упаковки из фольги.
- 4 Откройте двусторонний футляр и достаньте проточную кювету. Захватите проточную кювету по бокам, не касаясь стекла или уплотнителей со стороны основания картриджа.
- 5 Если на какой-либо из сторон стеклянной поверхности кюветы будут видны посторонние частицы, очистите поверхность, на которой видны посторонние частицы, смоченным спиртом тампоном из безворсовой ткани и просушите безворсовой лабораторной салфеткой.
- 6 Если в приборе есть кювета от предыдущего цикла, выньте ее.
- 7 Если посторонние частицы видны на площадке для проточных кювет, воспользуйтесь тампоном, смоченным спиртом, захватывая при этом стеклянную поверхность мишени оптического совмещения. Просушите безворсовой салфеткой для удаления остатков спирта.

Рисунок 11 Площадка проточной кюветы



- 8 Выровняйте проточную кювету по четырем поднятым зажимам и поместите ее на площадку проточной кюветы.

Рисунок 12 Загружаемые проточные кюветы выравнивают по зажимам



- 9 Нажмите **Close Flow Cell Door** (Закреть дверцу проточной кюветы). Дверца проточной кюветы закроется, датчики и RFID будут проверены, на экране появится идентификационный номер проточной кюветы.

Загрузка картриджей SBS и кластерных картриджей

- 1 Откройте створчатую дверцу отделения для жидкостей, а затем откройте дверцу холодильника реактивов.
- 2 Извлеките использованный картридж SBS и кластерный картридж. У использованных картриджей закрывающая фольга проколота.
- 3 Утилизируйте неизрасходованное содержимое в соответствии с применимыми стандартами. О том, как безопасно утилизировать резервуар в положении № 30 кластерного картриджа, см. в разделе *Отсоединение положения № 30* на стр. 34.
- 4 Загрузите подготовленные картриджи в ящик холодильника для реактивов так, чтобы этикетки с надписью **Insert** (Вставить) были направлены к задней части прибора.
 - ▶ Поместите картридж SBS (серая бирка) в левое положение.
 - ▶ Поместите кластерный картридж (оранжевая бирка), содержащий пробирку библиотеки без колпачка, в правое положение.

Рисунок 13 Загруженные картриджи с реактивами

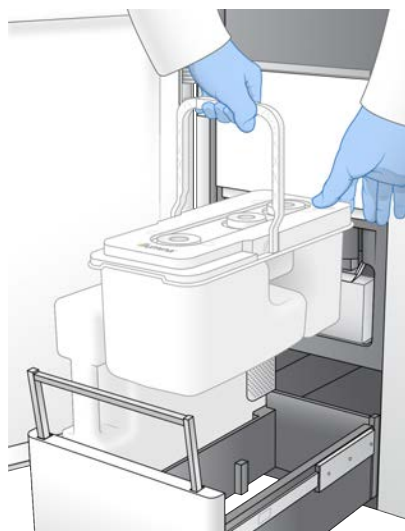


- 5 Вставьте ящик в холодильник, а затем закройте дверцу холодильника для реактивов. Проверятся датчики и RFID. На экране будут отображены ID пробирки с библиотекой и двух картриджей.

Загрузка картриджа с буфером

- 1 Потяните за металлическую ручку, чтобы открыть ящик для буферных растворов.
- 2 Выньте использованные картриджи с буферными растворами с правой стороны ящика для буферных растворов.
У использованных картриджей с буфером закрывающая фольга проколота.
- 3 Поместите новый картридж с буфером в ящик для буферных растворов таким образом, чтобы бирки **Illumina** были обращены к передней части прибора. Выставьте картриджи по приподнятым направляющим на полу ящика и по его сторонам.
При правильной загрузке картриджи с буфером располагаются равномерно и ящик можно закрыть.

Рисунок 14 Загрузка картриджа с буфером



Слив из бутылей для использованных реактивов

Бутыли с использованными реактивами необходимо опорожнять при **каждом** цикле секвенирования. При выполнении этого действия руководствуйтесь следующей инструкцией. Даже если система сконфигурирована для вывода использованных реактивов наружу, использованные реактивы будут собираться в малой бутыли, а большая бутыль также должна быть установлена.



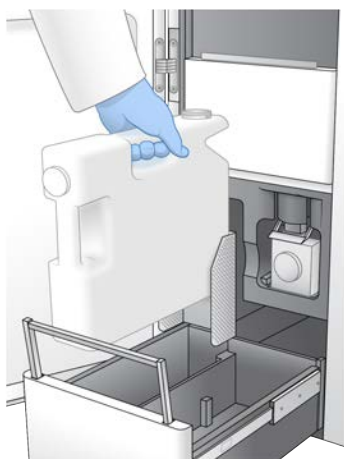
ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Этот комплект реактивов содержит потенциально опасные химикаты. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Используйте соответствующие опасности средства индивидуальной защиты, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат. К использованным реактивам нужно относиться как к химическим отходам и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, национальными и местными законодательными и нормативными актами. Подробную информацию об окружающей среде, охране здоровья и технике безопасности см. в паспорте безопасности на веб-сайте support.illumina.com/sds.html.

- 1 Извлеките и опорожните малую бутылку для использованных реактивов, как указано ниже.
 - a Поднимите рычаг и извлеките малую бутылку для использованных реактивов из углубления. Возьмите бутылку за бока.
 - b Снимите винтовой колпачок с держателя колпачка, расположенного в передней части бутылки.
 - c Закройте горлышко бутылки винтовым колпачком во избежание разливов.
 - d Не допускайте перемешивания содержимого бутылки с содержимым других бутылей для отходов, утилизируйте его в соответствии с действующими стандартами.
 - e Вновь установите бутылку без колпачка в углубление и опустите рычаг. Колпачок бутылки храните в держателе для колпачков.

- 2 Извлеките и опорожните большую бутылку для использованных реактивов, как указано ниже.
 - a При помощи верхнего рычага извлеките большую бутылку для использованных реактивов, расположенную слева в ящике для буферных растворов.
 - b Снимите винтовой колпачок с держателя колпачка, расположенного в передней части бутылки.
 - c Наденьте на горлышко бутылки винтовой колпачок во избежание разливов.
 - d Утилизируйте содержимое в соответствии с применимыми стандартами. При опорожнении сжимайте обе рукоятки.
 - e Верните бутылку без колпачка в ящик для буферных растворов. Колпачок бутылки храните в держателе для колпачков.

Рисунок 15 Возврат пустой бутылки



- 3 Наденьте новую пару неопудренных перчаток во избежание загрязнения поверхности прибора.
- 4 Закройте ящик буферного отсека и задвиньте дверцу отсека для жидкостей. Начнется проверка датчиков и RFID, на экране появится идентификационный номер картриджа с буфером.
- 5 Поставьте отметку возле опции, удостоверяющей, что обе бутылки для использованных реактивов пусты.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Если не выполнить опорожнение бутылей для использованных реактивов, цикл может быть прерван и может произойти переполнение, приводящее к повреждению прибора и создающее угрозу безопасности.

- 6 Выберите доступную кнопку.
 - ▶ **Log In** (Вход) — открывает страницу входа в хаб секвенирования BaseSpace. Выполняет переход к *Вход в хаб секвенирования BaseSpace* (Войти в).
 - ▶ **Run Setup** (Настройка цикла) — пропускает работу с хабом секвенирования BaseSpace и открывает страницу настройки цикла для ввода параметров цикла. Выполняет переход к *Ввод параметров цикла на стр. 31*.

Доступность кнопок зависит от того, как система сконфигурирована для использования хаба секвенирования BaseSpace.

Вход в хаб секвенирования BaseSpace

- 1 [Дополнительно.] Обновление настроек хаба секвенирования BaseSpace для текущего цикла.
 - ▶ Для прекращения использования хаба секвенирования BaseSpace снимите флажок **BaseSpace Sequence Hub** (Хаб секвенирования BaseSpace), а затем выберите **Run Setup** (Настройка цикла), чтобы продолжить работу без входа в систему.
 - ▶ Чтобы отправить данные цикла секвенирования в хаб секвенирования BaseSpace для дистанционного мониторинга и анализа данных, выберите **Run Monitoring and Storage** (Отслеживание и хранение цикла). Для этого варианта необходимо наличие протокола анализа.
 - ▶ Чтобы отправить в хаб секвенирования BaseSpace только файлы InterOp для дистанционного мониторинга, выберите **Run Monitoring Only** (Только отслеживание цикла).
- 2 Введите свои имя пользователя и пароль хаба секвенирования BaseSpace, затем выберите **Sign In** (Войти в).
- 3 Если будет предложено, выберите рабочую группу, чтобы загрузить в нее данные цикла, а затем выберите **Run Setup** (Настройка цикла).
Предложение будет показано только тем пользователям, которые относятся к нескольким рабочим группам.

Ввод параметров цикла

- 1 В поле Run Name (Название цикла) введите желаемое название, позволяющее идентифицировать текущий цикл.
Название цикла может содержать буквенно-цифровые символы, дефисы и подчеркивания.
- 2 Введите число циклов для каждого считывания в цикле секвенирования.
 - ▶ **Read 1** (Считывание 1) — введите значение до 151 цикла.
 - ▶ **Index 1** (Индексирование 1) — введите значение до 20 циклов для праймера Index 1 (i7).
 - ▶ **Index 2** (Индексирование 2) — введите значение до 20 циклов для праймера Index 2 (i5).
 - ▶ **Read 2** (Считывание 2) — введите значение до 151 цикла. Это значение, как правило, не отличается от значения для параметра Read 1 (Считывание 1).
- 3 Нажмите **Advanced Options** (Дополнительные возможности), чтобы применить настройки для текущего цикла. Эти настройки являются дополнительными, если не указано иное.
 - ▶ **Custom Primers (Пользовательские праймеры)** — установите флажок **Custom Primers** (Пользовательские праймеры), а затем установите соответствующие флажки.
 - ▶ **Read 1** (Считывание 1) — использовать пользовательский праймер для Read 1 (Считывание 1).
 - ▶ **Read 2** (Считывание 2) — использовать пользовательский праймер для Read 2 (Считывание 2).
 - ▶ **Custom Index** (Пользовательский индекс) — использовать пользовательский праймер для Index 1 (Индексирование 1).
 - ▶ **Output Folder** (Папка выходных данных) — выберите опцию **Browse** (Обзор) для изменения местоположения папки выходных данных для текущего цикла. Папка выходных данных необходима, если цикл не связан с хабом секвенирования BaseSpace для хранения.

- ▶ **Attachment** (Приложение) — выберите **Browse** (Обзор), чтобы выгрузить протокол анализа, что требуется при использовании хаба секвенирования BaseSpace для отслеживания и хранения цикла, или другой файл .csv. Файл CSV копируется в папку выходных данных и не влияет на параметры цикла.

4 Выберите **Review** (Просмотр).

Программное обеспечение подтверждает, что указанные параметры соответствуют набору параметров.

Подтверждение параметров цикла

- 1 Подтвердите параметры цикла, отображаемые на экране Review (Проверка).
- 2 [Дополнительно.] Выберите вариант **Back** (Назад) и вернитесь на страницу настройки цикла, чтобы отредактировать параметры цикла.
- 3 Выберите **Start Run** (Запустить цикл).
Автоматически начнется серия проверок перед циклом.

Обзор проверок перед циклом

Цикл секвенирования запускается автоматически после успешного окончания проверки перед циклом, которая обычно занимает 5 минут. Любые ошибки требуют устранения, прежде чем цикл может быть запущен. См. раздел *Ошибки проверок перед циклом на стр. 40*.



ПРИМЕЧАНИЕ

Чтобы избежать переполнения жесткого диска, не копируйте данные на диск C:\ после запуска циклов.

- 1 Если проверки перед циклом заканчивались сбоем, выберите опцию **Retry** (Повтор) для повторного проведения проверки, закончившейся сбоем, или **Retry All** (Повторить все), чтобы повторно выполнить все проверки. Нажмите значок **Error** (Ошибка), чтобы увидеть подробные сведения об ошибке.
- 2 Если сбоем окончилась проверка соосности, выполните устранение ошибки по следующей схеме.
 - a Выберите опцию **Reload** (Повторная загрузка), а затем **OK** для подтверждения возврата на экран загрузки.
 - b Уберите все посторонние предметы с верхней крышки прибора и нажмите **OK**.
 - c Загрузите проточную кювету и затем выберите опцию **Run Setup** (Настройка цикла).
 - d Переходите по всем экранам, чтобы повторно считать каждый RFID, и вернитесь на экран проверок перед циклом.
 - e Повторите проверку.

Отслеживание выполнения цикла

- 1 Отслеживание выполнения цикла, интенсивности и баллы за качество отображаются на экране в виде числовых показателей цикла.
Дополнительную информацию о числовых параметрах цикла см. в разделе *Анализ в реальном времени на стр. 44*.

Рисунок 16 Выполнение и числовые показатели цикла секвенирования



- A **Time to completion** (Время до завершения) — показывает дату и время завершения цикла (гггг-мм-дд чч:мм).
- B **Run progress** (Прогресс выполнения) — текущий этап цикла. Изменение индикатора выполнения непропорционально скорости выполнения каждого этапа цикла.
- C **Q-scores** (Q-оценки) — распределение оценок качества (Q-scores).
- D **Intensity** (Интенсивность) — служит для отображения значения интенсивностей кластера 90-го процентиля для каждой плитки. Цвета графика указывают на данные из зеленого или красного каналов.
- E **Clusters passing filter (%)** (Кластеры, проходящие фильтр [%]) — показывает долю кластеров, проходящих фильтр.
- F **Estimated yield (Gb)** (Оценка выхода [Gb]) — число оснований, распознанных в цикле секвенирования.
- G **Q30** — доля распознавания оснований с оценкой Q-score ≥ 30 .

Числовые показатели цикла

Программное обеспечение отображает численные показатели, создаваемые для каждого цикла. Числовые показатели отображаются в виде графиков, графов и таблиц, основанных на данных, созданных RTA3 и записанных в файлы InterOp.

Кластеризация занимает около 2 часов; затем начинается секвенирование с 1-го вложенного цикла. Количественные показатели обновляются по мере продвижения секвенирования. После 26-го вложенного цикла отображаются значения кластеров, прошедших фильтр, выход и оценки качества.

Статус обработки

Экран Process Management (Управление процессом) содержит списки состояний по каждому циклу. В основном меню выберите опцию **Process Management** (Управление процессом).

Для каждого названия цикла на экране управления процессом выведен статус следующих процессов.

- ▶ **Run status** (Статус цикла) — на основании обработки файлов CBCL.
- ▶ **Network** (Сетевая копия) — на основании передачи файлов с помощью универсальной службы копирования.
- ▶ **BaseSpace** (Загрузка в BaseSpace) — на основании загрузок, сделанных в хаб секвенирования BaseSpace, если это практикуется.

Когда процесс завершается, он обозначается зеленой отметкой. Дополнительную информацию см. в разделе *Управление процессом* на стр. 8.

Удаление цикла

По завершении передачи данных можно удалить текущий цикл, чтобы освободить память для последующего цикла. Удаление циклов позволяет очистить SE и C:\ без удаления файлов обслуживания системы или влияния на сеть или на экземпляр, хранящийся в хабе секвенирования BaseSpace. Циклы выполняющегося секвенирования удалить нельзя.

- 1 В основном меню выберите опцию **Process Management** (Управление процессом).
- 2 [Дополнительно.] Убедитесь, что у каждого процесса в цикле отображается зеленая отметка, указывающая на завершение переноса данных.
Пользователь может удалить цикл, перенос которого в сетевое расположение или хаб секвенирования BaseSpace не завершен, но все данные цикла при этом будут потеряны.
- 3 Выберите опцию **Delete Run** (Удалить цикл), а затем выберите **Yes** (Да), чтобы подтвердить действие.
- 4 Нажмите **Done** (Готово).

Отсоединение положения № 30

В положении № 30 кластерного картриджа имеется емкость с формамидом. Она извлекается из использованного кластерного картриджа и утилизируется отдельно.



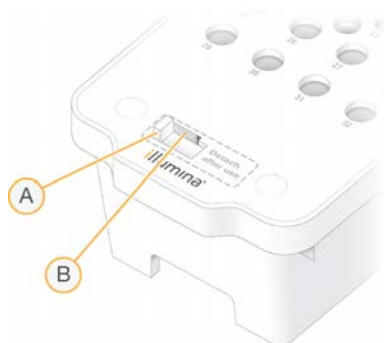
ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Этот комплект реактивов содержит потенциально опасные химикаты. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Используйте соответствующие опасности средства индивидуальной защиты, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат. К использованным реактивам нужно относиться как к химическим отходам и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, национальными и местными законодательными и нормативными актами. Подробную информацию об окружающей среде, охране здоровья и технике безопасности см. в паспорте безопасности на веб-сайте support.illumina.com/sds.html.

- 1 Надев перчатки, нажмите на белый пластиковый выступ с надписью **Detach after use** (Отсоединить после использования) и сдвиньте его вправо.

- Удерживая руку под резервуаром или положив его на поверхность, нажмите на прозрачный пластмассовый выступ по направлению к бирке Illumina, чтобы высвободить резервуар из кластерного картриджа.

Рисунок 17 Положение № 30



- A Белый пластиковый выступ — отсоединение
- B Прозрачный пластиковый выступ — высвобождение

- Утилизируйте емкость в соответствии с применимыми стандартами.

Автоматическая промывка после цикла

Когда секвенирование завершается, программное обеспечение инициирует автоматическую промывку после цикла, которая длится около 80 минут. Системный насос выкачивает 0,24%-ный раствор гипохлорита натрия (NaOCl) из положения № 17 и обеспечивает его разбавление до 0,12 %. Раствор 0,12 % NaOCl закачивается в положения реактива ExAmp и библиотеки, проходит через проточную кювету, а затем попадает в бутылки для использованных реактивов. В ходе промывки шаблон удаляется из системы во избежание перекрестного загрязнения.

Когда промывка завершается, система переходит в безопасное состояние и делает активной кнопку Home (Исходное состояние). Оставьте расходные материалы на месте до следующего цикла. После промывки сипперные трубки остаются в картридже SBS и кластерном картридже во избежание попадания воздуха в систему. Сипперные трубки в буферном картридже поднимаются настолько, чтобы можно было опорожнить бутылки для использованных реактивов.

Глава 5 Техническое обслуживание

Профилактическое техническое обслуживание	36
Выполнение профилактической промывки	36
Циклы ступенчатого удлинения для проточных кювет А и В	39

Профилактическое техническое обслуживание

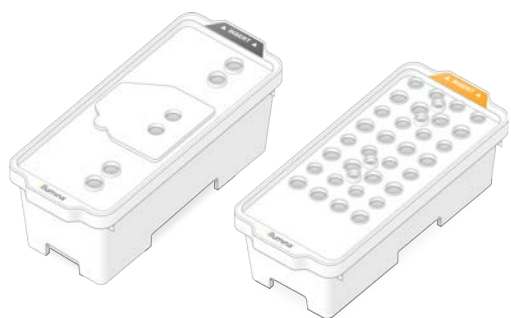
Компания Illumina рекомендует запланировать ежегодное проведение профилактического технического обслуживания. Если у вас нет контракта на обслуживание, свяжитесь с территориальным специалистом по работе с клиентами или со службой технической поддержки компании Illumina и организуйте платный сеанс профилактического технического обслуживания.

Выполнение профилактической промывки

Программное обеспечение каждые 14 дней напоминает о необходимости выполнения технологической промывки, в ходе которой система промывается разбавленными пользователем препаратами Tween 20 и NaOCl. Промывка длится примерно 80 минут.

Для выполнения технологической промывки нужны картридж с буфером, картридж SBS, кластерный картридж для промывки и четырехдорожечная промывная проточная кювета, которая поставляется с прибором. Как и в случае с картриджами реактивов, промывочные картриджи имеют цветовую маркировку, предотвращающую ошибки при загрузке. Центральная лунка промывочного картриджа SBS предназначена для разбавленного раствора Tween 20. Разбавленный раствор NaOCl вносят в резервуар кластерного картриджа для промывки. Разбавленные растворы откачивают из промывного картриджа в проточную кювету, в отсек для использованных реактивов и в резервуар каждого картриджа, промывая все сипперные трубки.

Рисунок 18 Промывочный картридж SBS (слева) и кластерный картридж для промывки (справа)



Приготовление промывочного раствора

- 1 Добавьте 400 мл воды лабораторного класса в бутылку для центрифугирования объемом 500 мл.
- 2 Добавьте 0,2 мл 100%-ного препарата Tween 20 и получите по меньшей мере 400 мл 0,05%-ного промывного раствора Tween 20.
Если используется свежеприготовленный разбавленный раствор Tween 20, то проникновение микроорганизмов в жидкостную систему предотвращается.
- 3 Переверните для перемешивания содержимого.
- 4 Снимите крышку с центрального углубления промывного картриджа SBS.

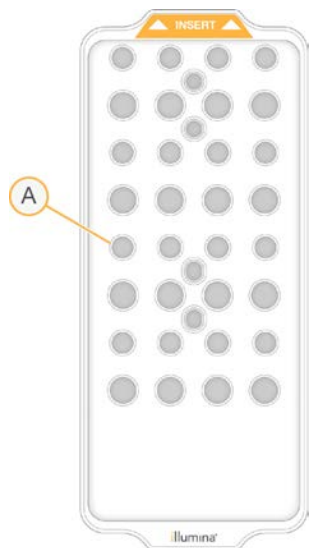
- Влейте 400 мл промывочного раствора в центральную лунку. Заполните ее по крайней мере до линии заполнения, указывающей минимальный необходимый объем. Остальные резервуары остаются пустыми.

Рисунок 19 Центральная лунка заполнена до объема 400 мл



- Для приготовления 20 мл 0,25 % NaOCl объединяют следующие объемы в пробирке для центрифугирования объемом 30 мл:
 - ▶ 5 % NaOCl (1 мл);
 - ▶ деионизированная вода (19 мл).
- Переверните для перемешивания содержимого.
- Добавьте 5 мл 0,25 % раствора NaOCl в кластерный картридж для промывки. Правильная емкость эквивалентна положению **№ 17** в предварительно заполненном картридже реактива. Все остальные резервуары остаются пустыми.

Рисунок 20 Положение для 0,25 % NaOCl



Загрузите промывную проточную кювету

- Снимите все посторонние предметы с поверхности прибора. Все поверхности во время профилактической промывки должны оставаться чистыми; не опирайтесь на прибор. Давление на дверцу проточной кюветы может привести к ее открытию, что станет причиной остановки промывки.

- 2 На главной странице выберите **Wash** (Промывка), а затем выберите, какую из сторон промывать.
 - ▶ **A + B** — промывайте обе стороны одновременно.
 - ▶ **A** — промывайте только сторону A.
 - ▶ **B** — промывайте только сторону B.Программное обеспечение откроет ряд экранов промывки.
- 3 Выберите **OK**, чтобы принять предупреждение к сведению и открыть дверцу проточной кюветы.
- 4 Если там нет промывной проточной кюветы, вставьте ее.
- 5 Нажмите **Close Flow Cell Door** (Закреть дверцу проточной кюветы). Дверца закроется, датчики и RFID будут проверены, на экране появится идентификационный номер проточной кюветы .

Загрузка промывочных картриджей

- 1 Откройте створчатую дверку отделения для жидкостей, а затем откройте дверцу холодильника реактивов.
- 2 Извлеките использованный картридж SBS и картридж с реактивами для получения кластеров. Утилизируйте неизрасходованное содержимое в соответствии с применимыми стандартами. О том, как безопасно утилизировать резервуар в положении № 30 кластерного картриджа, см. в разделе *Отсоединение положения № 30 на стр. 34*.
- 3 Загрузите промывочные картриджи в ящик холодильника для реактивов так, чтобы этикетки с надписью **Insert** (Вставить) были направлены к задней части прибора.
 - ▶ Поместите картридж SBS (серая бирка) в левое положение.
 - ▶ Поместите кластерный картридж (оранжевая бирка) в правое положение.
- 4 Вставьте ящик в холодильник, а затем закройте дверцу холодильника для реактивов. Проверятся датчики, и RFID каждого из картриджей сканируется и отображается на экране.
- 5 Откройте ящик для буферных реактивов.
- 6 Если картридж с буфером пока не загружен, загрузите его.

Слив из бутылей для использованных реактивов

Бутыли с использованными реактивами необходимо опорожнять при **каждой** профилактической промывке. При выполнении этого действия руководствуйтесь следующей инструкцией. Даже если система сконфигурирована для вывода использованных реактивов наружу, использованные реактивы будут собираться в малой бутылки, а большая бутылка также должна быть установлена.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Этот комплект реактивов содержит потенциально опасные химикаты. Существует опасность нанесения вреда здоровью при вдыхании, приеме внутрь, попадании на кожу или в глаза. Используйте соответствующие средства индивидуальной защиты, включая защитные очки, перчатки и лабораторный халат. К использованным реактивам нужно относиться как к химическим отходам и утилизировать их в соответствии с действующими региональными, национальными и местными законодательными и нормативными актами. Подробную информацию об окружающей среде, охране здоровья и технике безопасности см. в паспорте безопасности на веб-сайте support.illumina.com/sds.html.

- 1 Снимите малую бутылку с использованными реактивами и утилизируйте содержимое согласно применимым стандартам. Содержимое этого резервуара нельзя смешивать с содержимым других бутылок.
- 2 Вставьте малый контейнер для использованного реактива в углубление.
- 3 Снимите большую бутылку с использованными реактивами и утилизируйте содержимое согласно применимым стандартам.
- 4 Вставьте большую бутылку для использованных реактивов в ящик для буферных растворов.
- 5 Наденьте новую пару неопудренных перчаток.
- 6 Закройте ящик буферного отсека и задвиньте дверцу отсека для жидкостей.
Проверяются датчики и RFID. На экране появятся идентификационные номера каждого из компонентов для промывки.

Запуск промывки

- 1 Установите флажок, подтверждающий опорожнение обеих бутылок для использованных реактивов, затем нажмите **Start Wash** (Начать промывку).
Начнется промывка, и на дисплее отобразится примерное время промывки.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Если не выполнить опорожнение бутылок для использованных реактивов, промывка может быть прервана и может произойти переполнение, приводящее к повреждению прибора и создающее угрозу безопасности.

- 2 По завершении промывки выберите **Home** (Главная страница).
- 3 Оставьте расходные материалы на месте до следующего цикла.
Сипперные трубки остаются в картридже SBS и кластерном картридже во избежание попадания воздуха в систему. Сипперные трубки в буферном картридже поднимаются настолько, чтобы можно было опорожнить бутылки для использованных реактивов.

Циклы ступенчатого удлинения для проточных кювет А и В

Программное обеспечение позволяет проводить ступенчатое удлинение циклов для проточных кювет А и В. При настройке пользователем нового цикла программное обеспечение автоматически приостанавливает и вновь запускает цикл на соседней проточной кювете, если требуется. Во время паузы система автоматически перейдет в безопасное состояние.

- 1 На экране Home (Главная страница) выберите **Sequence** (Секвенирование), а затем определите, **A** или **B**.
- 2 Дождитесь приостановки цикла на соседней проточной кювете. Чтобы отменить новый цикл и предотвратить паузы, выберите **Cancel** (Отмена).
Если соседним циклом выполняется генерация кластера, ресинтез парных концевых фрагментов, визуализация или промывка, программное обеспечение завершает текущий этап до паузы.
- 3 Когда соседний цикл приостанавливается и дверца проточной кюветы открывается, настройте новый цикл.
Когда новый цикл начнется, приостановленный цикл автоматически возобновится вместе с началом нового цикла.

Приложение А Поиск и устранение неисправностей

Ресурсы поиска и устранения неисправностей	40
Файлы поиска и устранения неисправностей	40
Ошибки проверок перед циклом	40
Управление процессом: поиск и устранение неисправностей	41
Неудача цикла до кластеризации	42
Окончание цикла	43
Выключение прибора	43

Ресурсы поиска и устранения неисправностей

Ответы на вопросы технического характера можно найти на страницах поддержки системы секвенирования NovaSeq 6000 на веб-сайте компании Illumina. Страницы поддержки обеспечивают доступ к документации, загрузкам и часто задаваемым вопросам. Чтобы получать бюллетени поддержки, зарегистрируйте учетную запись в службе MyIllumina.

В случае проблем с качеством или показателями работы цикла обращайтесь в отдел технической поддержки компании Illumina. См. раздел *Техническая помощь на стр. 61*. Чтобы облегчить поиск и устранение неисправностей, не забудьте предоставить отделу технической поддержки компании Illumina ссылку на сводку по циклу в хэбе секвенирования BaseSpace.

Файлы поиска и устранения неисправностей

Основной файл	Папка	Описание
Файл с информацией о цикле (RunInfo.xml)	Корневой каталог	Содержит настройки цикла: <ul style="list-style-type: none">• число циклов в цикле секвенирования;• число считываний в цикле секвенирования;• индексировано ли считывание;• число полос и плиток в проточной кювете.
Файл параметров цикла (RunParameters.xml)	Корневой каталог	Содержит название цикла и информацию о параметрах и компонентах цикла, включая следующую информацию о RFID: серийные номера, номера партий, срок годности и номера по каталогу.
Файлы InterOp (*.bin)	InterOp	Бинарные файлы отчета, используемые программой Sequencing Analysis Viewer. Файлы InterOp обновляются по мере выполнения цикла.
Файлы журнала	Журналы	Файлы журналов описывают каждый шаг, выполненный прибором для каждого цикла, включая то, какие реактивы использовались, и содержат список версий программного и аппаратного обеспечения, использовавшихся для цикла. Файл с именем [НазваниеПрибора]_CurrentHardware.csv содержит список серийных номеров компонентов прибора.

Ошибки проверок перед циклом

Если во время проверок перед циклом возникает ошибка, примите следующие меры для ее устранения. Если вы настроили цикл с двойной проточной кюветой и одна сторона не отработала как следует, вы можете отменить работу со сбойной стороной кюветы и продолжить цикл для той стороны, которая отработала нормально.

Если система не проходит проверку перед циклом, то RFID проточной кюветы, реактивов и буферных растворов не блокируются, то есть вы сможете использовать расходные материалы в следующем цикле. Когда цикл начинается, сипперные трубки пробивают крышки из фольги на картриджах реактивов, после чего все RFID блокируются.

Проверка системы	Причина сбоя	Рекомендованное действие
Датчики	Дверь отсека открыта, расходный материал загружен ненадлежащим образом, или по меньшей мере один датчик не работает.	Выберите Retry (Повтор) и выполните действия согласно возникающим на экране подсказкам, чтобы устранить ошибку.
Дисковое пространство	Дискового пространства не хватает, поскольку в указанном для хранения выходного файла месте память переполнена.	Воспользуйтесь экраном управления процессом для очистки дискового пространства в указанном местоположении папки выходных данных.
Связь в системе	Связь с RTA3, жидкостной системой или другая связь в системе прервана.	Выберите Retry (Повтор) и выполните действия согласно возникающим на экране подсказкам, чтобы устранить ошибку.
Соосность	Положение проточных кювет не позволяет их визуализировать.	Следуйте экранным подсказкам и перезагрузите проточную кювету.

Поддон для сбора утечек

Поддон для сбора утечек встроен в основание прибора. Он предназначен для сбора подтекающих реактивов или охлаждающего агента, а также собирает переливающуюся жидкость из бутылей использованных реактивов. При нормальных условиях в поддоне для сбора утечек не должно быть жидкостей. Утечка означает, что прибор работает с нарушениями, а перелив означает, что бутылки с использованными реактивами опорожняются нерегулярно.

Во время проверки перед циклом датчики определяют, есть ли жидкость в поддоне для сбора утечек.

- ▶ Если поддон содержит жидкость, но не заполнен полностью, это не мешает приступить к выполнению цикла, но вам нужно будет обязательно связаться с отделом технической поддержки компании Illumina.
- ▶ Если поддон полон, это не позволит приступить к выполнению цикла и вам нужно будет обязательно связаться с отделом технической поддержки компании Illumina.



ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ

Бутылки для использованных реактивов нужно опорожнять **при каждом цикле**. Если малая бутылка использованного реактива будет заполнена, циклы остановятся. Перелив из большой бутылки использованных реактивов приведет к повреждению прибора, что потребует посещения места установки прибора представителем Illumina и создаст угрозу безопасности.

Управление процессом: поиск и устранение неисправностей

В следующей таблице приведены варианты поиска и устранения неисправностей в том случае, если на странице экрана Process Management (Управление процессом) появляется значок «Не применимо».

- ▶ Значок «Не применимо» отображается в столбце BaseSpace, и цикл сконфигурирован таким образом, чтобы файлы выгружались в хаб секвенирования BaseSpace.

- ▶ Значок «Не применимо» отображается в столбце Network (Сеть), и цикл сконфигурирован таким образом, чтобы файлы выгружались в папку выходных данных в сетевом расположении.

Статус цикла	Действие по устранению неисправности
Цикл выполняется.	Закройте страницу управления процессами, выждите около 5 минут и снова откройте страницу.
Цикл не выполняется.	Остановите прибор и перезапустите его, а затем снова откройте страницу управления процессами.

Если значок «Не применимо» по-прежнему отображается после того, как вы выполнили все действия по устранению неисправности, обратитесь в службу технической поддержки компании Illumina.

Неудача цикла до кластеризации

Если программное обеспечение выявило неудачу цикла до начала кластеризации, можно сохранить картриджи реактивов и пробирку библиотеки для нового цикла. Если кластеризация уже началась, укупорочная фольга будет проткнута сипперными трубками, после этого реактивы и библиотеку уже нельзя использовать для другого цикла.

Существуют два варианта подготовки нового цикла с использованием картриджа реактивов и пробирки с библиотекой, сохраненных после неудачного цикла.

- ▶ **Настройка нового цикла немедленно** — настройка нового цикла в течение 4 часов после неудачного цикла. Картриджи реактивов и пробирка библиотеки остаются загруженными.
- ▶ **Настройка нового цикла позднее** — настройка нового цикла в течение трех недель после неудачного цикла. Картриджи реактивов и пробирку библиотеки выгружают из прибора и помещают на хранение.

Настройка нового цикла немедленно

- 1 При неудаче цикла выберите **Home** (Исходное состояние).
- 2 Настройте новый цикл.
- 3 При появлении предложения загрузите новую проточную кювету.
- 4 Откройте и закройте дверцу холодильника реактивов и ящика буферных растворов, чтобы сообщить управляющему программному обеспечению о необходимости повторно считать RFID картриджа реактивов.
Картриджи и пробирка библиотек могут оставаться в приборе до истечения 4 часов после неудачного цикла.
- 5 Опорожните бутылки для использованных реактивов и вновь установите их в прибор.
- 6 Перейдите к настройке цикла.

Настройка нового цикла позднее

- 1 При неудаче цикла выберите **Home** (Исходное состояние).
- 2 Чтобы извлечь расходные материалы из прибора, настройте новый цикл или профилактическую промывку.

- 3 При появлении сообщения извлеките и сохраните следующие расходные материалы.
 - ▶ Закройте пробирку с библиотекой и храните при температуре от -25 до -15 °C до трех недель.
 - ▶ Верните картридж SBS и кластерный картридж в морозильную камеру с температурой от -25 до -15 °C.
 - ▶ Верните картридж с буфером в место хранения с комнатной температурой, защищенное от действия света.
- 4 Выберите **End** (Конец), чтобы отменить цикл или профилактическую промывку, затем выберите **Yes** (Да) для подтверждения команды.

Окончание цикла

Если прибор NovaSeq 6000 завершает цикл, это **окончательно**. Программное обеспечение не может возобновить цикл или сохранить данные секвенирования, невозможно будет также повторно использовать расходные материалы.

- 1 Выберите вариант **End** (Завершить цикл), а затем выберите **Yes** (Да), чтобы подтвердить команду.

Если цикл завершен после этапа Read 1, программное обеспечение начнет автоматическую промывку после цикла.
- 2 Если будет предложено, следует выбрать возможный вариант промывки.
 - ▶ **End Run Without Wash** (Завершить цикл без промывки) — завершение цикла и инициирование профилактической промывки.
 - ▶ **End Run and Wash** (Завершить цикл и промыть) — завершение цикла и выполнение автоматической промывки после цикла.
 - ▶ **Cancel** (Отмена) — продолжение текущего цикла.

Если завершение цикла приходится на промежуток между окончанием кластеризации и завершением считывания Read 1, то программное обеспечение отображает опцию промывки. В иных случаях программное обеспечение начнет автоматическую промывку после цикла.
- 3 Если вы выбрали окончание цикла без промывки, выполните команды, предлагаемые программным обеспечением с целью настройки профилактической промывки.

Выключение прибора

При останове прибора все программное обеспечение безопасным образом отключается, а питание прибора выключается. Полоса отображения состояния из зеленой становится белой, указывая на то, что идет процесс останова.

При обычных условиях выполнять выключение прибора не требуется.

- 1 В основном меню выберите **Shutdown Instrument** (Остановить прибор).
- 2 Переведите переключатель питания в задней части прибора в положение ВЫКЛ.
- 3 Подождите не менее минуты, прежде чем снова включать прибор.



ОСТОРОЖНО!

Запрещается перемещать прибор. Неправильное перемещение может повлиять на соосность оптики устройства и нарушить целостность данных. Если вам нужна помощь в вопросе перемещения устройства, свяжитесь с вашим представителем компании Illumina.

Приложение В Анализ в реальном времени

Обзор программного обеспечения Real-Time Analysis	44
Рабочий процесс анализа в режиме реального времени	46

Обзор программного обеспечения Real-Time Analysis

Система секвенирования NovaSeq 6000 использует RTA3, вариант программного обеспечения анализа в режиме реального времени (Real-Time Analysis) на вычислительном ядре прибора (CE). RTA3 извлекает значения интенсивности из изображений, полученных с камеры, выполняет распознавание оснований, присваивает распознанным основаниям баллы качества, сводит результаты с PhiX и создает отчеты в файлах InterOp для их просмотра в программе просмотра анализов секвенирования.

С целью оптимизации времени обработки данных RTA3 сохраняет информацию в памяти. Если прекратить работу программы RTA3, обработка не восстановится и данные цикла не будут сохранены.

Входные данные для RTA3

Для работы RTA3 необходимы изображения плиток, содержащиеся в памяти локальной системы. RTA3 получает информацию цикла и команды от управляющего программного обеспечения.

Файлы выводимых данных RTA3

Изображения по каждому цветовому каналу переносятся в память для RTA3 по плиткам. Из этих изображений средствами RTA3 создаются файлы распознавания оснований с оценкой качества и файлы фильтра. Все остальные файлы результатов представляют собой вспомогательные файлы.

Тип файла	Описание
Файлы распознанных оснований	Каждая плитка, которая анализируется, включается в файл связанных результатов распознавания оснований (*.cbcl). Плитки, принадлежащие одной и той же дорожке и поверхности, агрегируются в один и тот же файл *.cbcl для каждой дорожки и поверхности.
Файлы фильтра	Каждой плитке соответствует файл фильтра (*.filter), в котором указывается, проходит ли кластер через фильтры.
Файлы расположения кластера	Файлы расположения кластера (*.locs) содержат координаты X, Y каждого кластера в плитке. Местоположение кластеров генерируется для каждого цикла.

Выходные файлы используются для последующего анализа в хабе секвенирования BaseSpace. Кроме того, можно использовать программное обеспечение конвертации bcl2fastq для преобразования FASTQ и применения сторонних средств анализа. Для файлов NovaSeq необходимо программное обеспечение bcl2fastq2 Conversion Software v2.19 или более поздней версии. Последние по времени версии ПО bcl2fastq2 можно найти на странице системы секвенирования [NovaSeq 6000 — материалы для скачивания](#) на веб-сайте Illumina.

RTA3 обеспечивает получение показателей качества цикла в реальном времени, которые хранятся как файлы InterOp — двоичные выходные файлы, содержащие параметрические сведения о плитке, цикле и уровне считывания. Просмотр числовых показателей, полученных в реальном времени с помощью программы просмотра анализов секвенирования, требует наличия файлов InterOp. Последние по времени версии программы просмотра анализов секвенирования можно найти на странице [Sequencing Analysis Viewer — материалы для скачивания](#) на веб-сайте Illumina.

Обработка ошибок

Программное обеспечение RTA3 создает файлы журнала и записывает их в папку Logs. Ошибки записываются в текстовый файл в формате *.log.

В конце обработки в окончательное место расположения выходных данных переносятся следующие файлы журнала:

- ▶ info_00000.log — сводка важных событий в цикле;
- ▶ error_00000.log — список ошибок, возникших в ходе цикла;
- ▶ warning_00000.log — содержит предупреждения, выданные в ходе цикла.

Плитки проточной кюветы

Плитки — это небольшие участки визуализации на поверхности проточной кюветы. Камера делает один снимок каждой полосы, а программное обеспечение разбивает ее на плитки для обработки в RTA3. Общее количество плиток зависит от числа дорожек, полос и поверхностей, которые визуализируются.

Проточная кювета S2 содержит в общей сложности 1408 плиток. Каждая из двух дорожек содержит четыре полосы на каждой поверхности, в каждой из которых по 88 плиток. Визуализируются обе поверхности проточной кюветы, что составляет в общей сложности две поверхности.

Таблица 7 Плитки проточной кюветы

Компонент проточной кюветы	S2	Описание
Дорожки	2	Дорожка — это физический канал с портами входа и выхода.
Поверхности	2	Проточная кювета визуализируется по двум поверхностям: верхней и нижней. Вначале выполняется визуализация верхней поверхности плиток.
Полос на дорожку	4	Полоса — это столбец в дорожке проточной кюветы, изображение которого захватывается камерой при получении одного снимка.
Плиток на полосу	88	Плитка — это часть полосы, она составляет визуализируемую площадь проточной кюветы.
Общее количество создаваемых плиток	1408	Общее количество плиток равно произведению количества дорожек на количество поверхностей, на количество полос и на количество плиток в полосе.

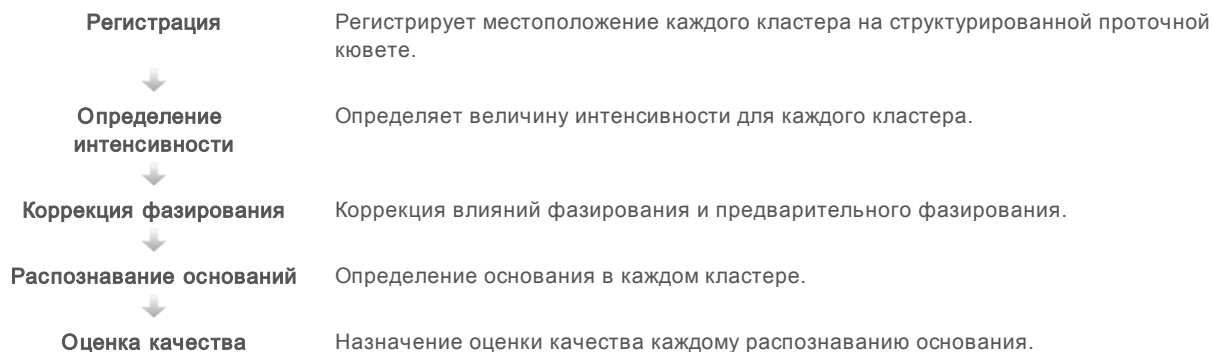
Присвоение названий плиткам

Название плитки представляет собой пятизначный номер, который соответствует положению плитки на проточной кювете.

- ▶ Первая цифра представляет собой номер дорожки: 1 или 2.
- ▶ Вторая цифра обозначает поверхность: 1 — верхняя, 2 — нижняя.
- ▶ Третья цифра обозначает номер полосы: 1, 2, 3 или 4.
- ▶ Последние две цифры обозначают номер плитки: от 01 до 88. Нумерация начинается с 01 на выходном конце проточной кюветы и заканчивается 88 на входном конце.

Например, название плитки 1_1205 означает, что она расположена на дорожке 1 верхней поверхности, полосе 2 и имеет номер плитки 5.

Рабочий процесс анализа в режиме реального времени



Регистрация

Регистрация привязывает изображение к гексагональной схеме нанолунок на структурированной проточной кювете. Из-за упорядоченного характера расположения нанолунок координаты X и Y для каждого кластера заданы заранее. Положения кластеров записываются в файл расположения кластеров (*.locs) для каждого цикла секвенирования.

Если происходит ошибка регистрации для любого изображения в цикле, для этой плитки в данном цикле распознавание оснований не производится. Воспользуйтесь программой просмотра анализов для определения того, какие изображения не удалось зарегистрировать.

Определение интенсивности

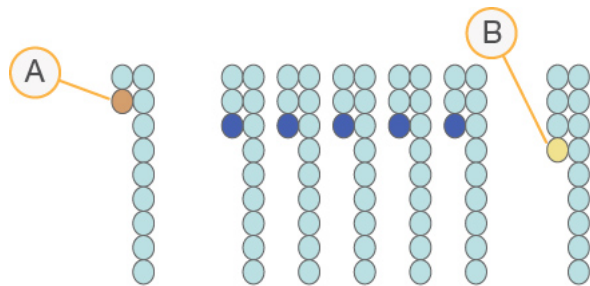
После регистрации функция определения интенсивности выполняет вычисление интенсивности для каждой нанолунки на данном изображении. Если регистрация прошла неудачно, интенсивность сбойного участка не определяется.

Коррекция фазирования

Во время реакции секвенирования каждая нить ДНК в кластере удлиняется на одно основание в цикл. Фазирование и предварительное фазирование происходят, когда нить выбивается из фазы текущего цикла встраивания оснований.

- ▶ Фазирование происходит, когда длина цепочки оснований отстает.
- ▶ Предварительное фазирование происходит, когда к цепочке присоединяются лишние основания.

Рисунок 21 Фазирование и предварительное фазирование



- A Считывание с основанием в случае фазирования
- B Считывание с основанием в случае предварительного фазирования.

Программа RTA3 позволяет исправлять эффекты фазирования и предварительного фазирования, что повышает качество данных на каждом отдельном цикле на протяжении общего цикла секвенирования.

Распознавание оснований

В процессе распознавания оснований определяется основание (A, C, G или T) для каждого кластера данной плитки в указанном цикле. В системе секвенирования с применением системы NovaSeq 6000 используется двухканальное секвенирование, для которого нужны только два изображения для кодирования всех четырех оснований ДНК: одно изображение из красного канала и одно из зеленого.

Нераспознанные основания идентифицируются буквой N. Нераспознавание имеет место, если кластер не проходит фильтр, происходит сбой в регистрации или кластер сдвинут с изображения.

Значения интенсивности для каждого кластера извлекаются из красного и зеленого изображений и сравниваются друг с другом, что позволяет получить четыре четко отличающиеся популяции. Каждая популяция соответствует основанию. Процесс распознавания нуклеотидных оснований определяет, к какой популяции принадлежит каждый кластер.

Рисунок 22 Визуализация интенсивностей кластера

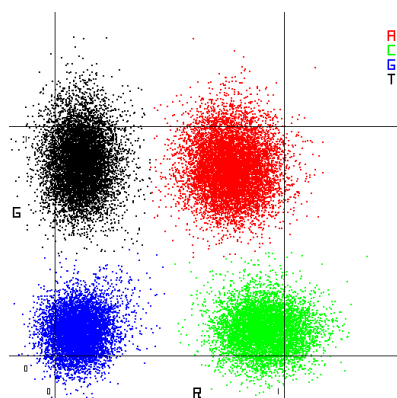


Таблица 8 Распознавание оснований при двухканальном секвенировании

Основание	Красный канал	Зеленый канал	Результат
A	1 (есть)	1 (есть)	Кластеры, дающие интенсивный сигнал и в красном, и в зеленом каналах.
C	1 (есть)	0 (нет)	Кластеры, дающие интенсивный сигнал только в красном канале.
G	0 (нет)	0 (нет)	Кластеры, не дающие интенсивного сигнала в известном положении кластера.
T	0 (нет)	1 (есть)	Кластеры, дающие интенсивный сигнал только в зеленом канале.

Кластеры, проходящие фильтр

Во время цикла RTA3 отфильтровывает исходные данные, удаляя результаты считывания, не соответствующие порогу качества данных. Перекрывающиеся кластеры и кластеры низкого качества удаляются.

Для двухканального анализа при определении чистоты распознавания нуклеотидов (измерении чистоты интенсивности) RTA3 использует систему на популяционной основе. Кластеры проходят фильтр (PF), если в первых 25 вложенных циклах не более одного основания распознано с чистотой ниже заданного порога. Сверка по PhiX выполняется во вложенном цикле номер 26 для подгруппы плиток тех кластеров, которые прошли через фильтр по качеству. Кластеры, не прошедшие через фильтр, не подвергаются распознаванию оснований, и сверка по ним не производится.

Показатели качества

Оценка качества (Q-score) является прогнозом вероятности неточного распознавания основания. Чем выше балл Q-score, тем выше качество распознавания основания и тем вероятнее, что основание будет распознано правильно. После определения баллов Q-score результаты регистрируются в файлах распознавания оснований (*.cbcl).

В баллах Q-score в краткой форме представлены вероятности малых ошибок. Показатели качества имеют вид Q (X), где X — это балл. В приведенной ниже таблице показана связь между показателем качества и вероятностью ошибки.

Q-Score Q (X)	Вероятность ошибки
Q40	0,0001 (1 к 10 000)
Q30	0,001 (1 к 1000)
Q20	0,01 (1 к 100)
Q10	0,1 (1 к 10)

Оценка качества

При оценке качества вычисляется набор предикторов для каждого распознавания оснований, а затем значения предикторов используются для определения Q-score по таблице качества. Таблицы качества были созданы для обеспечения оптимально точного прогноза качества для циклов секвенирования, выполняемых с использованием конкретных конфигураций платформ секвенирования и версий реактивов.



ПРИМЕЧАНИЕ

Оценка качества основана на модифицированной версии алгоритма Phred.

Отчетность о баллах оценки качества

RTA3 назначает каждому распознанному основанию одну из трех оценок качества в зависимости от надежности его распознавания. Эта модель отчетности по оценкам Q-score уменьшает требования к полосе пропускания и необходимому количеству памяти для хранения данных, но при этом не влияет на точность или рабочие показатели процесса.

Дополнительные сведения о назначении оценок Q-score см. в *Reducing Whole-Genome Data Storage Footprint* (публ. № 970-2012-013).


Приложение С Выходные папки и файлы

Структура папок выходных данных секвенирования	50
Выходные файлы секвенирования	51

Структура папок выходных данных секвенирования

Управляющее программное обеспечение создает название папки выходных данных автоматически.


 **Config** — настройки конфигурации цикла.

 **Logs** — файлы журнала, которые описывают эксплуатационные действия, аналитику прибора и события RTA3.

 **Data**

 **Intensities**

 **BaseCalls**


 **L00[X]** — файлы распознавания оснований (*.cbcl), агрегированные по одному файлу на каждую дорожку, поверхность и цикл.

 S.locs — местоположения файлов кластеров для цикла.

 **InterOp** — бинарные файлы отчета, используемые программой Sequencing Analysis Viewer.

 **Recipe** — файл с набором параметров, характерным для данного цикла.

 **Thumbnail Images** — миниатюры изображений каждой 10-й плитки.

 **LIMS** — файл настройки цикла (*.json), если применимо.

 RTA3.cfg

 RunInfo.xml

 RunParameters.xml

 RTAComplete.txt

 CopyComplete.txt

 Samplesheet.csv — протокол анализа или иной прикрепленный файл, если применимо.

 SequenceComplete.txt

Выходные файлы секвенирования

Тип файла	Описание, место расположения и название файла
Файлы распознанных оснований	Каждый анализируемый кластер включает файл распознанных оснований, агрегированный в один файл по каждому циклу, дорожке и поверхности. Объединенные файлы содержат информацию о распознавании основания и закодированной оценке качества для каждого кластера. Файлы распознавания оснований используются хабом секвенирования BaseSpace или bcl2fastq2. Data\Intensities\BaseCalls\L001\C1.1 L[дорожка]_[поверхность].cbcl, например L001_1.cbcl
Файлы расположения кластера	Бинарный файл локализации кластеров для каждой проточной кюветы содержит координаты X, Y кластеров в заголовке. Координаты определяются по сетке шестиугольников, соответствующей схеме расположения нанолунок проточной кюветы. Data\Intensities s_[Дорожка].locs
Файлы фильтра	Файлы фильтра определяют кластеры, прошедшие через фильтры. Файлы фильтра создаются на 26-м цикле с использованием данных 25 циклов. Для каждой плитки генерируется один файл фильтра. Data\Intensities\BaseCalls\L001 s_[дорожка]_[плитка].filter
Файлы InterOp	Бинарные файлы отчета, используемые программой Sequencing Analysis Viewer. Файлы InterOp обновляются по мере выполнения цикла. Папка InterOp
Файл с информацией о цикле	Перечисляет название цикла секвенирования, количество циклов для каждого считывания, указывает, когда считывание является индексированным считыванием, а также число полос и плиток проточной кюветы. Файлы сведений о цикле секвенирования создаются в начале секвенирования. [Корневая папка] , RunInfo.xml
Файлы миниатюр	Когда возможность работы с файлами миниатюр включена, создается миниатюрное изображение каждой 10-й плитки каждого цветового канала (красного и зеленого). Thumbnail_Images\L001\C[X.1] — файлы для каждого большого цикла хранятся в отдельных подпапках. S_[дорожка]_[плитка]_[канал].jpg — изображение-миниатюра включает номер плитки.

Приложение D Безопасность Windows

Конфигурации безопасности для системы NovaSeq 6000	52
Требования к паролям	52
Брандмауэр Windows	53
Набор технических средств для расширения возможностей по смягчению последствий	53
Правила, ограничивающие использование программного обеспечения, для Windows.	53

Конфигурации безопасности для системы NovaSeq 6000

Операционная система Windows, которая обеспечивает работу управляющего компьютера прибора, имеет настройки безопасности, которые не позволяют нежелательному программному обеспечению работать. Информация, приведенная в данном приложении, описывает соответствующие настройки и то, каким образом их можно привести в соответствие с вашими потребностями.

При нормальных условиях работы Нет необходимости менять принятые по умолчанию настройки безопасности. Если такие изменения все же будут необходимы, удостоверьтесь в том, что изменения проводит опытный системный администратор и что он тщательно спланировал процесс.



ОСТОРОЖНО!

Поскольку эти настройки влияют на рабочие параметры системы и могут ухудшить безопасность системы, обращайтесь в службу технической поддержки компании Illumina, если неясно, нуждаются ли настройки в редактировании, или когда воздействие изменений неизвестно.

Требования к паролям

В следующей таблице приводятся требования к заданию паролей, необходимые для управляющего компьютера. При первом входе в систему программное обеспечение попросит вас изменить пароль.

Таблица 9 Правила задания паролей, принятые по умолчанию

Правило	Настройка безопасности
Включить запоминание паролей	Запоминание 5 паролей
Максимальный срок действия паролей	180 дней
Минимальный срок действия паролей	0 дней
Минимальная длина пароля	10 символов
Пароль должен соответствовать требованиям сложности	Выключено
Сохранение пароля с использованием обратимого шифрования	Выключено

Брандмауэр Windows

Брандмауэр Windows служит для защиты управляющего компьютера посредством фильтрации входящего трафика и удаления из него потенциальных угроз. Брандмауэр по умолчанию блокирует все входящие соединения. Оставляйте брандмауэр включенным и разрешите исходящие соединения. Для получения дополнительных сведений об исходящих соединениях см. *Руководство по подготовке рабочего места для системы серии NovaSeq* (документ № 1000000019360).

Набор технических средств для расширения возможностей по смягчению последствий

Набор технических средств для расширения возможностей по смягчению последствий (Enhanced Mitigation Experience Toolkit, EMET) предотвращает возможность воспользоваться уязвимыми местами в программном обеспечении и предоставляет доверенный сертификат. Эта функция выявляет и прекращает атаки, в которых используются вредоносные сертификаты.

Правила, ограничивающие использование программного обеспечения, для Windows.

Правила Windows, ограничивающие использование ПО, представляют собой список правил, которые позволяют работать только определенным видам ПО. Для системы NovaSeq 6000 правила ограничения могут опираться на расширение файла, наличие сертификата или на директорию.

Правила, ограничивающие использование программного обеспечения, включены по умолчанию с тем, чтобы предотвратить работу нежелательного ПО на управляющем компьютере. Вы можете добавлять и убирать правила, чтобы настроить уровень безопасности так, как вам нужно. При некоторых обстоятельствах вы можете отключить правила, ограничивающие использование программного обеспечения.



ОСТОРОЖНО!

Отключение правил, ограничивающих использование программного обеспечения, снимает защиту, которую эти правила обеспечивают. Изменение правил приводит к тому, что выставленная по умолчанию защита будет обойдена.

По умолчанию в схеме, ограничивающей использование программного обеспечения, используются следующие правила.

Названия файлов	Сертификаты
Portmon.exe	DigitalSystems
Procmon.exe	Illumina, Inc.
Procmon64.exe	
Tcpview.exe	
Расширения файлов	Директории
*.bin	%HKEY_LOCAL_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows\CurrentVersion\ProgramFilesDir%
*.cbcl	%HKEY_LOCAL_MACHINE\SOFTWARE\Microsoft\Windows NT\CurrentVersion\SystemRoot%
.cfg	C:\CrashDumps
.config	C:\Illumina
.csv	C:\Illumina Maintenance Logs
.dat	C:\LocalSymbols
.focus	C:\Program Files (x86)\Chromium\Application
.imf1	C:\Program Files (x86)\EMET 5.5
.ims	C:\Program Files (x86)\Illumina
.jpg	C:\Program Files (x86)\Internet Explorer
.json	C:\Program Files (x86)\LibreOffice 5
.lnk	C:\Program Files\Illumina
.locs	C:\ProgramData\Illumina
.log	C:\ProgramData\Package Cache
.manifest	C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\Citrix
.sdf	C:\Users\sbsuser\AppData\Local\Temp\CitrixLogs
*.tif	C:\Users\sbsuser\Desktop\FSE turn over to customer.bat
.txt	D:\Illumina
*.xml	

Добавление правила

- 1 Нажмите **Start** (Пуск), затем **Run** (Цикл).
- 2 Наберите **secpol** и откройте вкладку Local Security Policy (Местные правила безопасности).
- 3 Выберите **Software Restriction Policies** (Правила, ограничивающие использование программного обеспечения).
- 4 Правой кнопкой нажмите на **Additional Rules** (Дополнительные правила), затем выберите опцию **New Path Rule** (Новое правило пути).
- 5 В поле Path (Путь) введите название директории или расширение файла, для которого устанавливается разрешение.
- 6 [Дополнительно.] В поле Description (Описание) укажите причину, по которой создается правило.
- 7 В списке Security level (Уровень защиты) выберите вариант **Unrestricted** (Без ограничений).
- 8 Нажмите **ОК**, и правило будет добавлено в список правил, определяющих ограничения для программного обеспечения.

Удаление правила

- 1 Нажмите **Start** (Пуск), затем **Run** (Цикл).
- 2 Наберите **secpol** и откройте вкладку Local Security Policy (Местные правила безопасности).
- 3 Выберите **Software Restriction Policies** (Правила, ограничивающие использование программного обеспечения).
- 4 Выберите опцию **Additional Rules** (Дополнительные правила).
- 5 Нажмите правой кнопкой на правило, которое хотите удалить, а затем выберите опцию **Delete** (Удалить).
- 6 Выберите **Yes** (Да), чтобы подтвердить удаление правила из списка правил, определяющих ограничения использования программного обеспечения.

Включение или выключения правил, ограничивающих применение программного обеспечения

Выключайте правила, ограничивающие применение программного обеспечения, только в том случае, если вам нужны техническая поддержка и выполнение пользовательских настроек. Например, это можно делать в случае настройки пользовательских правил безопасности или при проведении однократной установки ПО.

- 1 Перейдите в директорию <C:\Illumina\Security>.
- 2 Дважды нажмите на соответствующий файл.
 - ▶ Для включения правил, ограничивающих применение программного обеспечения, дважды нажмите на **Enable.reg**.
 - ▶ Для выключения правил, ограничивающих применение программного обеспечения, дважды нажмите на **Disable.reg**.

Алфавитный указатель

%

% PF 21
%PF 48

В

BaseSpace Enterprise 16
bcl2fastq2 17, 44

С

CE 44

Е

EMET 53
ExAmp Master Mix 2

L

LIMS 1, 14
LIMS третьих лиц 15

N

NaOCI 35-36

P

PhiX
 добавление 22
 номер по каталогу 17

R

Read 1 43
RFID 9
RunInfo.xml 40, 51

S

SRP 53

T

Tween 20 36

A

автоматические проверки 40
алгоритм Phred 48
амплификация 2
анализ 17
анализ в реальном времени 1
анализ в режиме реального времени 7

Б

белые списки 53
библиотеки
 количественная оценка 21
 контроль качества 21
 разбавление 23
 хранение 23, 42
брандмауэры 53
буферный отсек 28
бюллетени поддержки 40

В

веб-сайт, поддержка 40
визуализация 2, 10, 44-45
включение 13
вложенные циклы секвенирования 33
водяные бани 20
возобновление циклов 43
входящие соединения 53
выгрузка картриджей реактивов 27
выключение питания 43
выход 33
вычислительное ядро 8, 34, 44

Г

генерирование шаблона 46
гидроксид натрия, разбавление 23

гипохлорит натрия 35-36

Д

данные о производительности прибора 14
данные о работоспособном состоянии
 прибора 14
датчики 4, 38, 40
дверца проточной кюветы 25
двухканальное секвенирование 47
держатели крышек 28
держатель проточной кюветы 26
диагностика 4
директория безопасности 55
дисковое пространство 8, 40
длины считываний 25
длительности
 генерирование кластера 33
 технологическая промывка 36
 цикл секвенирования. 33
длительность
 автоматическая промывка после
 цикла 35
длительность цикла 33
добавление, PhiX 22
доверенный сертификат 53
документация 2, 61
домен, хаб секвенирования BaseSpace 16
дорожки 10, 45

Ж

жесткий диск 8, 14, 34
жидкостная система 6, 36
журналы ошибок 45

З

загрузочная концентрация 2
загрузочный объем 2
зажимы, проточная кювета 4
зеленый канал 47
значения интенсивности 46
значки 8
значки, мигающие 7

И

изменение места расположения прибора 43
изображения 44

индексные считывания 25
инициализация 13
интенсивность кластеров 46
использованные реактивы 27-28
используемые реактивы 6
исходящие соединения 53

К

Калькулятор пула 21
калькулятор, приготовление пула 21
камеры 1, 4, 45
картридж с буфером 28, 38
картриджи
 ступенчатая организация 11
картриджи для реактивов
 этикетки 10
картриджи реактивов
 выгрузка 27
 хранение 42
картриджи с реактивами
 подготовка 20
 хранение 9
каталожные номера комплекта 9
качество данных 48
кластерный картридж 9
кластеры, проходящие сквозь фильтр 33
кластеры, проходящие через фильтр 21
количества вложенных циклов 25
количественная оценка 21
количество циклов 31, 33
комплект программного обеспечения 7
компоненты комплекта 17
конверсия FASTQ 44
контроль качества 21
концентрация при загрузке 21
красный канал 47

М

места расположения кластеров 51
местоположение картриджей 44
метка RFID 40
методики и полезные советы 13
методы анализа 3
мигающие значки 7
миниатюры 51
мишень для проверки соосности оптики 4
мишень оптического совмещения 26

Н

- надлежащая практика 13
- название папки выходных данных 50
- нанолунки 46
- нарушение соосности 32, 40
- настройка LIMS 14
- настройка двойного цикла 25
- настройка единичного цикла 25
- настройки анализа 14
- настройки безопасности 52
- настройки по умолчанию 14, 16
- настройки цикла 14
- настройки, безопасность 52
- нераспознанные основания 47
- номера по каталогу
 - комплекты Illumina 9
 - расходные материалы, приобретаемые пользователем 17
- нормализация 21
- нуклеотиды 47

О

- область световой сигнализации 4, 43
- обучение онлайн 2
- опасные химические вещества 6
- операционная система 13, 52
- оптика 4
- отсек для жидкостей 10
- отсеки 4
- отсутствие распознавания 46
- оценка Q-scores 48
- оценки Q-scores 33, 48-49
- ошибки 7, 40
 - вероятность 48
 - проверка перед циклом 32
- ошибки проверки перед циклом 32

П

- папка выходных данных 14
- папка настройки цикла 14-15
- параметры цикла, LIMS 15
- паспорта безопасности материалов 6
- передача данных 8
- перезагрузка проточной кюветы 32
- перезапуск после завершения работы 43
- перекрестное загрязнение 6, 35
- перелив 28, 41

- перемещение приборов 43
- перенос данных 34
- перчатки, замена 28, 38
- пипетки 19
- питание 13
- плексность 21
- плитки 2, 10, 44
- площадка проточной кюветы 4, 26
- подготовка места 53
- подготовка рабочего места 2
- поддержка клиентов 61
- поддон для сбора капельных утечек 41
- положение № 30 34, 38
- положение сипперов 35, 39
- полоса отображения состояния 43
- полоса статуса 4
- полосы 2, 10, 45
- пользовательские праймеры 2, 12, 31
- помощь
 - документация 2
 - помощь, техническая 61
- порты USB 4
- послецикловые мероприятия 35
- поставщики 17
- правила задания паролей 52
- правила, ограничивающие использование программного обеспечения
 - добавление правил 54
 - удаление правил 55
- предупреждения 7
- преобразование FASTQ 17
- приготовление пула библиотек 21
- приложения 1
- приостановка циклов 39
- пробирки библиотек 42
 - хранение 42
 - хранение в картридже 42
- пробирки с библиотеками 12
 - хранение 9, 23
- проблемы с жидкостной системой 41
- проверки перед циклом 40
- проволочные сетки 20
- программа просмотра анализов секвенирования 46
- программа просмотра результатов секвенирования 44
- продолжительность кластеризации 33
- промывки
 - длительность 35-36
 - частота 36
- промывная проточная кювета 36

- промывной раствор 10
- промывные картриджи 36
- промывочные картриджи 36, 38
- прослеживание образцов 12
- протоколы анализа 16, 31
- протоколы анализов 31
- проточные кюветы
 - хранение 9, 25
 - чистка 26
- профилактические промывки 36
 - растворы для промывки 36
- профилактическое техническое обслуживание 36
- прохождение фильтра (PF) 48

Р

- разбавители 23
- разбавление библиотек 23
- разбавленный гидроксид натрия 23
- размеры вставок 22
- расположение серверов 16
- расходные материалы 36
 - вода лабораторного класса 18
 - выгрузка 34-35
 - профилактические промывки 36
 - разбавление и денатурирование 17
- расходные материалы секвенирования 17
- расходные материалы, выгрузка 39
- реактивы ExAmp 9
- реактивы для денатурирования 23
- регибридизация 15
- режимы цикла 14

С

- сбои регистрации 46
- связи в системе 40
- SE 8
- секвенирование по двухканальной схеме 2
- сетки для оттаивания 20
- сканирование 2
- служба универсального копирования 7-8, 34
- согласование PhiX 44
- сохранение картриджей реактивов 42
- сохранение пробирок библиотек 42
- справка 40
 - приготовление пула библиотек 21
- страница «Секвенирование» 33
- страницы поддержки 40
- структурированные проточные кюветы 1, 10

- ступенчатая организация картриджей 11
- считывания индекса 31

Т

- таблицы качества 48
- техническая документация 49
- техническая поддержка 61
- технические характеристики морозильной камеры 19
- технические характеристики холодильника 19
- техническое обслуживание, профилактическое 36
- технологические промывки расходные материалы 17

У

- указания в отношении воды лабораторного класса 18
- управление процессом 34
- управляющее программное обеспечение 7
- управляющий компьютер 52
- утечки 41
- утилизация использованных реактивов 6
- утилизация формамида 11, 34

Ф

- фазирование и предварительное фазирование 25, 46
- файлы
 - характерные для цикла 40
- файлы CBCL 3, 34, 48
- файлы InterOp 7, 40, 44, 51
- файлы журнала 40, 45
- файлы распознанных оснований 44, 51
- файлы фильтра 51
- файлы фильтров 44
- фильтр чистоты 48
- фильтрация кластеров 48
- формат протокола анализов 17

Х

- хаб секвенирования BaseSpace 1, 17
 - поддержка 3
 - подключение и отключение 31
- холодильник 6

- холодильник для реактивов 6
- хранение библиотек 23
- хранение данных. 31
- хранение комплектов с реактивами 9

Ц

- цвета графика 33
- цикл
 - числовые показатели 33
- циклы
 - возобновление 43
 - мониторинг 16, 31
 - приостановка 39
 - совмещение 25
 - ступенчатое исполнение 39
 - удаление 8
- циклы с одним считыванием 31
- циклы секвенирования
 - удаление 34

Ч

- числовые параметры циклов 44

Э

- этапы секвенирования 2

Техническая помощь

Для получения технической помощи свяжитесь со службой технической поддержки компании Illumina.

Веб-сайт www.illumina.com
Электронная почта techsupport@illumina.com

Номера телефонов службы поддержки клиентов Illumina

Регион	Бесплатный звонок	Региональные отделения
Северная Америка	+1 800 809-45-66	
Австралия	+1 800 775-688	
Австрия	+43 800 00-62-49	+43 1928-65-40
Бельгия	+32 8007-71-60	+32 3400-29-73
Германия	+49 800 101-49-40	+49 893 803-56-77
Гонконг	800 960-230	
Дания	+45 8082-01-83	+45 8987-11-56
Ирландия	+353 180 093-66-08	+353 016 95-05-06
Испания	+34 911 89-94-17	+34 800 30-01-43
Италия	+39 800 98-55-13	+39 236 00-37-59
Китай	400 635-98-98	
Нидерланды	+31 800 022-24-93	+31 207 13-29-60
Новая Зеландия	0800 451-650	
Норвегия	+47 800 168-36	+47 219 396-93
Сингапур	+1 800 579-27-45	
Соединенное Королевство	+44 800 012-60-19	+44 207 305-71-97
Тайвань	008 066-517-52	
Финляндия	+358 800 91-83-63	+358 974 79-01-10
Франция	+33 805 10-21-93	+33 170 77-04-46
Швейцария	+41 565 80-00-00	+41 800 20-04-42
Швеция	+46 850 61-96-71	+46 200 88-39-79
Япония	0800 111-50-11	
Другие страны	+44 1799-534-000	

Паспорта безопасности веществ (SDS) можно найти на сайте компании Illumina по адресу support.illumina.com/sds.html.

Документацию о продукции можно скачать в формате PDF с веб-сайта компании Illumina. Перейдите на веб-сайт support.illumina.com, выберите нужный продукт, затем нажмите на опцию **Documentation & Literature** (Документация и литература).



Illumina

5200 Illumina Way

San Diego, California 92122 U.S.A. (США)

+1 800-809-ILMN (4566)

+1 858 202-45-66 (за пределами Северной Америки)

techsupport@illumina.com

www.illumina.com

Исключительно для использования в научно-исследовательских целях.
Не предназначено для использования в диагностических процедурах.

© 2017 Illumina, Inc. Все права защищены.

illumina[®]